Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0

UNIVERSIDAD NACIONAL" SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
EVALUACION DE ORIGINALIDAD

INFORME DE REVISIÓN

Se ha realizado el análisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte de la Directora encargada de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien deja:

C O N S T A N C I A

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a mercurio presentes en ambientes acuáticos de Ica, Perú

Presentado por:

DIEGO MARCELO GUZMAN QUINTANA

Del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **CIENCIAS BIOLOGICAS** obteniéndose como resultado una coincidencia de **0%** otorgándosele el calificativo de:

APROBADO

Se adjunta al presenta el reporte de evaluación del software antiplagio.

Observaciones:

SE APRUEBA EL PRESENTE TRABAJO POR TENER UNA SIMILITUD MENOR O IGUAL AL LIMITE ESTABLECIDO EN EL REGLAMENTO CORRESPONDIENTE (MENOR A 20%).
Ica, 02 de Octubre de 2024

Dra. ROSA BERTHA ALTAMIRANO DIAZ
DIRECTORA (e) DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Biológicas

Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a mercurio presentes en ambientes acuáticos de Ica, Perú

Línea de Investigación

Salud pública y conservación del medio ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTOR

Bach. GUZMAN QUINTANA DIEGO MARCELO

Ica - Perú

2024

Dedicatoria

A Dios por darme la vida, salud, conocimiento y sabiduría para seguir avanzando profesionalmente. A mis padres, Roberto y Ruth, que con su esfuerzo me apoyaron en cumplir mis metas y sueños. A mi abuela Rosa, quien me acompañó y me dio su apoyo incondicional en mis años de estudiante y en la realización de la tesis y también con el inmenso apoyo durante la larga etapa de redacción de este trabajo.

Agradecimientos

A mi alma mater, Universidad Nacional San Luis Gonzaga (U.N.ICA), Facultad de Ciencias Biológicas, donde me formé como profesional. Gracias a cada docente, quienes con su apoyo y enseñanzas constituyeron la base de mi vida profesional y a todas las personas que fueron partícipes de este proceso durante los 5 años de estudio.

Al Vicerrectorado de Investigación por el apoyo financiero de la tesis según RESOLUCIÓN VICERRECTORAL Nº083-VRI-UNICA-2022.

Mi reconocimiento a mis asesores Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez y la Dra. Rosa Bertha Altamirano Díaz, por su asesoramiento, conocimiento, apoyo incondicional, confianza y paciencia durante todo el transcurso de la tesis.

Al Laboratorio de Servicios Biológicos (BioSLab) e Instituto Nacional de Salud (INS) por permitirme realizar parte de la metodología que fue necesaria para culminar la tesis.

Índice de contenido

Pág

Dedicatoria ii

Agradecimientos iii

Índice de contenido iv

Resumen vii

Abstract viii

I. INTRODUCCION 1

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA 5

1.1. Material biológico. 5

1.2. Técnica e instrumentos de investigación. 5

1.2.1. Toma de muestra. 5

1.3. Procesamiento de muestras. 5

1.3.1. Pre - enriquecimiento 5

1.4. Aislamiento y conservación de bacterias resistentes a mercurio. 5

1.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). 6

1.6. Caracterización bacteriana. 6

1.6.1. Caracterización macroscópica. 6

1.6.2. Caracterización bioquímica y fisiológica. 6

1.6.3. Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF 7

1.7.Susceptibilidad a antibióticos. 8

III. RESULTADOS 9

IV. DISCUSION 18

V. CONCLUSIONES 22

VI. RECOMENDACIONES 23

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 24

VIII. ANEXOS 32

Índice de tabla

		Pág.
Tabla 1	Significado de la puntuación del equipo MALDI – TOF…….	7
Tabla 2	Procedencia de cepas resistentes a mercurio aislados de ambientes acuáticos de la región Ica……...……	10
Tabla 3	Concentración mínima inhibitoria de $HgCl_2$ frente a cepas aisladas de laguna de oxidación de aguas municipales de la región Ica….....	11
Tabla 4	Concentración mínima inhibitoria de $HgCl_2$ frente a cepas aisladas de relaves mineros de la región Ica ……...	12
Tabla 5	Concentración mínima inhibitoria de PMA frente a cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica …...……	12
Tabla 6	Características morfológicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica……..	13
Tabla 7.	Características bioquímicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica……...……...	14
Tabla 8	Características fisiológicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica…..…….……..	15
Tabla 9	Especies bacterianas identificadas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica…….…….	16
Tabla 10	Sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.……...……..	17
Tabla 11	Tabla comparativa de medición de halos de sensibilidad antimicrobiana a distintos antibióticos ……..……..	42
Tabla 12	Lectura de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica…….	43

Índice de Figura

		Pág.
Figura 1	Muestras de ambientes acuáticos de relaves mineros de la región Ica…	32
Figura 2	Pre- enriquecimiento en caldo LB suplementado con 10 µg/mL de $HgCL_2$ aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica……	32
Figura 3	Cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica, en medio agar MacConkey procedentes de relave minero: A) I3-2; laguna de oxidación: B) C1-G (1) ……..……....	33
Figura 4	Concentración mínima inhibitoria de la cepa C1-E frente a $HgCl_2$ procedente de laguna de oxidación, por triplicado con concentraciones de $HgCl_2$ (µg/ mL): 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 150 respectivamente de izquierda a derecha……...	33
Figura 5	Agar LB suplementado con 10 µg/mL de $HgCl_2$ con cepas procedentes de lagunas de oxidación; A) Y1 -B (2), B) Y1-G*(1); relave minero, C) I 3-2……	34
Figura 6	Pruebas bioquímicas para su posterior identificación de enterobacterias aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica……...	35
Figura 7	Solubilización de fosfato de: Laguna de oxidación, A) C1-G (1), B) Y1-E, C) Y1-G*(1); relave minero, D) S1-1……..…….....	36
Figura 8	Identificación de cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica, mediante la aplicación del programa MALDI-TOF……	37
Figura 9	Reactivación de las cepas en caldo BHI aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica..……	37
Figura 10	Determinación de la concentración celular en el Nefelómetro Thermo Scientific equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland. ..……	38
Figura 11	Sensibilidad antimicrobiana de cepas procedentes de: lagunas de oxidación A) N1A-1, B) Y1-A; relave minero, C) S1-1……	38

RESUMEN

El mercurio es un metal pesado de interés mundial por su efecto tóxico a los seres vivos. Sin embargo, algunas bacterias presentan resistencia a este metal. En el presente estudio, el objetivo fue aislar y caracterizar bacterias resistentes a mercurio presentes en ambientes acuáticos de Ica. Las muestras de agua fueron sembradas en agar Luria Bertani (LB) suplementado con 10 µg/ml de cloruro de mercurio ($HgCl_2$). Se aislaron cepas bacterianas, las cuales fueron seleccionadas, caracterizadas e identificadas, mediante estudio macroscópico, pruebas bioquímicas (ureasa, TSI, lisina descarboxilasa, β-galactosidasa, indol, lactosa, citrato, reducción de nitrato a nitrito, oxidasa, catalasa, amilasa, Gelatinasa y hemolisis); fisiológicas (movilidad y solubilización de fosfato inorgánico) y por MALDI-TOF. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para compuestos de mercurio inorgánico, cloruro de mercurio ($HgCl_2$) y orgánico, acetato de fenilmercurio (PMA). Se aislaron 43 cepas y se seleccionaron 13 de ellas por presentar mayor resistencia a mercurio inorgánico ($HgCl_2$), correspondiente a los géneros *Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter* y *Citrobacter*. *Pseudomona*s fue el que presentó el más alto valor MIC; 150 µg/ml de $HgCl_2$ y 20 µg/ml de PMA. La mayoría de las cepas fueron resistentes a ampicilina, cefazolina y cefoxitina; sensibles a ceftriaxona, ceftazidima, gentamicina y meropenem. Se concluye que las cepas de *Pseudomonas* presentan una mayor resistencia al mercurio, tanto en su forma inorgánica como orgánica.

PALABRAS CLAVE: Mercurio, resistencia bacteriana, acetato de fenilmercurio, cloruro de mercurio.

ABSTRACT

Mercury is a heavy metal of global interest due to its tóxic effect on living beings; however, some bacteria have resistance to this metal. In the present study, the objective was to isolate and characterize mercury-resistant bacteria present in aquatic environments of Ica. Water samples were cultured on Luria Bertani (LB) agar supplemented with 10 µg/ml mercury chloride ($HgCl_2$). Bacterial strains were isolated, which were selected, characterized and identified, through macroscopic study, biochemical tests (urease, TSI, lysine decarboxylase, β-galactosidase, indole, lactose, citrate, reduction of nitrate to nitrite, oxidase, catalase, amylase, gelatinase and hemolysis), physiological proofs (mobility and solubilization of inorganic phosphate), and identification by MALDI-TOF assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for inorganic, mercury chloride ($HgCl_2$) and organic mercurial compounds, phenylmercury acetate (PMA). 52 strains were isolated and 13 of them were selected for its greater resistance to inorganic mercury ($HgCl_2$), corresponding to the genera *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Citrobacter*. *Pseudomonas* was the one with the highest MIC of $HgCl_2$, 150 µg/ml and PMA of 20 µg/ml. Most strains were resistant to ampicillin, cefazolin, and cefoxitin and sensitive to ceftriaxone, ceftazidime, gentamicin, and meropenem. It is concluded that *Pseudomonas* strains have greater resistance to both inorganic and organic mercury.

KEYWORDS: Mercury, bacterial resistance, phenylmercury acetate, mercury chloride.

I. INTRODUCCION

La contaminación con metales pesados se ha convertido en uno de los principales problemas del siglo XXI por su alta toxicidad e impacto sobre el medio ambiente (1). Su presencia es perjudicial para la biota y la salud humana, de forma particular los de mayor interés son el cadmio, cromo, arsénico, plomo y mercurio (2). Estos metales pesados se generan de forma natural, como en las emanaciones volcánicas, incendios forestales, erosiones y por las actividades antropogénicas, como en la industria minera, agrícola o por la quema de combustibles fósiles (3–5).

A nivel mundial, las actividades antropogénicas aportan el 75 % de mercurio al medio ambiente (6). China representa el mayor contaminante con un registro de descargas de hasta 98 toneladas por año en sus mares (7). La presencia de este metal pesado en fuentes acuáticas reduce notablemente la biodiversidad (8), generando la perdida de hábitats como ocurre en la Amazonia (9, 10). Asimismo, como consecuencia genera la perdida de los recursos hídricos, impacta en los suelos y en la atmósfera; impidiendo el desarrollo de cualquier tipo de vida en el área afectada, incluso a mínimas concentraciones (11–13), pudiendo dispersarse a miles de millas de distancia del lugar contaminado (14).

El mercurio metálico se encuentra en forma líquida a temperaturas entre 20 °C a 25 °C y es buen transportador de electricidad (15). En el ambiente se encuentra en sus diversas formas, metálico (Hg^0), inorgánico (Hg^{+2}) y orgánico (HgMe), con mayor presencia en el medio marino (16). La forma metálica es volátil y tóxica al contacto. La forma inorgánica es soluble y se desplaza por las fuentes acuáticas, la orgánica es la más tóxica y es la mayor amenaza para la biota (17). Esta lo generan diversas bacterias a partir de la forma inorgánica y es absorbida por microorganismos (18, 19), luego ingresa a la cadena trófica y se va concentrando en diferentes animales acuáticos superiores que se alimentan de estos microorganismos (20). Finalmente, llega al ser humano debido a la ingesta de animales marinos contaminados, acumulándose en diversos órganos con impactos negativos para la salud (21–23).

La biorremediación es una alternativa para tratar ambientes contaminados con metales pesados (20, 24). Esta utiliza diferentes microbios, entre ellos a las bacterias, para absorber o transformar los compuestos contaminantes con la finalidad de eliminarlos o reducir los impactos ambientales negativos. Asimismo, se utilizan como indicadores de contaminación y en procesos de bioextracción del metal (20, 25, 26). En los suelos y fuentes de aguas contaminadas, las bacterias tienen la capacidad de mineralizar compuestos complejos; transformar metales o metaloides tóxicos en menos tóxicos; e inmovilizar o volatilizar los metales y metaloides tóxicos (5, 27, 28).

Diversas especies de bacterias se han aislado de ambientes contaminados con mercurio y su presencia se debe a que han sido seleccionadas o han generado una respuesta adaptativa a la presencia del tóxico (29). La fuerte presión que ejerce el compuesto contaminante permite que

se seleccionen aquellas bacterias que desarrollan algún mecanismo de defensa para sobrevivir, tolerar y proliferar en presencia del metal tóxico y los diversos compuestos presentes en el medio (30–32). Se han estudiado los mecanismos que hacen posible la resistencia bacteriana a mercurio (33); entre ellos se mencionan la precipitación celular, la transformación por enzimas o mediante la actividad de las enzimas codificadas en el operón *mer* (1, 6, 20, 34, 35). Este último es el mecanismo más estudiado y en los últimos años se ha reportado un mayor número de bacterias que presentan el operón *mer*, proporcionando diferentes niveles de resistencia a mercurio (5).

Su capacidad bacteriana de adaptarse a condiciones extremas se debe a su plasticidad genética (36), como es el caso de los géneros *Pseudomonas* (37, 38) y *Enterobacter* (39). Estas bacterias han mostrado diversos mecanismos de resistencia que son aplicables en biorremediación. Entre ellos, tenemos la bioadsorción que es una técnica simple, flexible y su aplicación suele ser de bajo costo y muy eficiente. Por ejemplo, una cepa perteneciente al género *Enterobacter* ha sido ensayada en biorremediación de mercurio y como resultado demostró reducción en la concentración del tóxico metal y su inmovilización debido al crecimiento bacteriano (20).

La resistencia microbiana a mercurio se puede evaluar mediante su efecto en el crecimiento celular; por pruebas de resistencia frente a diversas concentraciones del metal pesado o por la determinación de biomasa mediante absorbancia y/o densidad óptica (40, 41). Diversos ensayos de resistencia frente a mercurio se han ensayado en bacterias, las cuales han mostrado diferentes valores en su respuesta (42). La resistencia depende del mecanismo involucrado y a la participación de diferentes perfiles genéticos, muchos de ellos presentes en plásmidos y en el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, se ha documentado que especies del género *Pseudomonas* pueden mostrar niveles de resistencia de hasta 400 µg/mL de mercurio (22). Asimismo, se ha logrado aislar y caracterizar cepas de *Enterobacter* que presentaron una alta resistencia a diversos metales pesados entre ellos a mercurio, llegando a un nivel de biorremediación del 99% después de un periodo de incubación de 96 horas (39).

En años recientes, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha surgido como un problema mundial y las bacterias ambientales han mostrado resistencia a diversos antibióticos de importancia clínica como β-lactámicos, glicopéptidos, macrólidos y quinolonas (43). Estas resistencias mostradas se deben a la presencia de estos compuestos en el ambiente y proceden de fuentes hospitalarias, farmacéuticas y veterinarias. Asimismo, la aparición de bacterias ambientales resistentes se debe a la movilidad genética que ocurre entre ellas con las de origen hospitalario (44). Se ha observado que existe una relación entre la resistencia a mercurio y la resistencia a diversos antibióticos (45, 46), debido que algunos genes que proporcionan la resistencia son conferidos por el mismo mecanismos (bomba de expulsión) presente en algún elemento genético móvil como los plásmidos (47).

Las bacterias resistentes a mercurio, debido a que están constantemente sometidos a fuertes presiones del tóxico metal en los ambientes acuáticos, presentan altos niveles de resistencia. Por ello, es importante realizar una correcta identificación y caracterización de las mismas, lo que permitiría utilizarlas en procesos de restauración de ecosistemas en el mismo lugar o en un biorreactor (48). La identificación bacteriana se realiza mediante la aplicación de diversos métodos; entre ellas, técnicas de evaluación de características fenotípicas, proteómica, pruebas bioquímicas, fisiológicas y moleculares (49). Para aislar bacterias resistentes a un metal es necesario que las muestras sean sembradas en medios de cultivo con una determinada concentración del metal que permita la selección de aquellas resistentes (42). La caracterización generalmente involucra determinar su respuesta a pruebas bioquímicas, fisiológicas y fenotípicas (crecimiento, morfología, tamaño, etc) (50).

La caracterización molecular, permite la clasificación e identificación de las células con base a sus características genéticas mediante estudios de ADN, ARN y proteínas (51). Entre las técnicas utilizadas para caracterizar especies con base a la expresión de proteínas se encuentra la proteómica, que estudia la estructura, función y composición de proteínas marcadoras. Este es el soporte de la identificación mediante la técnica de MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization – time off light – mass spectrometry) (49). Esta técnica permite obtener perfiles de proteínas ribosómicas del microorganismo en estudio, resultando una alternativa útil, rápida y certera al momento de identificar una amplia gama de bacterias (52).

Entre las bacterias que presentan resistencia a mercurio aisladas de ambientes acuáticos se encuentran diversos géneros que han sido aplicados en la construcción de biosensores, métodos biomédicos, biorremediación, entre otros (1, 4, 20). La mayoría de ellas corresponden al grupo de Gram negativas (53, 39) y pertenecen a los géneros *Enterobacter* (54–56), *Klebsiella* (34, 46, 54, 57, 58), *Shigella* (59–61), *Escherichia* (29, 45, 60, 62) y *Citrobacter* (5 ,63, 64). Asimismo, especies del género *Pseudomonas* (4, 12, 55, 65), como *Pseudomonas putida* (66, 67) y *Pseudomonas otitidis* (58), y también la especie *Stenotrophomonas maltophilia* (58), entre otras.

En el Perú, se han realizado aislamientos de bacterias resistentes a mercurio; entre ellas los géneros, *Escherichia* (45), *Klebsiella*, *Enterobacter* (54), *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, (68), *Proteus* y *Citrobacter* (69), las cuales han mostrado diversos niveles de resistencia (45), y se han seleccionado la más resistente por su potencial aplicación en biorremediación como una opción de respuesta frente a este fenómeno de contaminación ambiental (11).

A nivel mundial, la contaminación por mercurio de origen minero es un problema vigente. Asimismo, en el Perú se encuentran activas alrededor de 30,000 mineras, ya sea de manera ilegal o legal (70). En esta actividad económica el mercurio es utilizado para amalgamar oro, reportándose concentraciones del metal tóxico de hasta 1200 µg/g en el suelo (70, 71). Este metal, cuando se encuentra presente en las aguas residuales y lodos, representa un alto grado de

contaminación ambiental (4). Este puede acceder a la población en forma de vapor (Hg0) o sus formas solubles (Hg^{2+} y MeHg), altamente tóxicas (72). Debido a los problemas que genera el uso indiscriminado del mercurio en el ambiente, surge la necesidad de tratarlo y reducirlo a formas menos contaminantes que no se acumulen en la cadena trófica (73).

En la actualidad, se están aplicando protocolos con diversos métodos físicos y químicos para controlar los efluentes de mercurio. Sin embargo, los métodos biológicos mediante el uso de organismos resistentes a este metal tóxico son una alternativa viable y de bajo costo (5) Debido a los problemas que genera el mercurio en el ambiente, es necesario realizar propuestas para disminuir su impacto. El tratamiento de aguas y suelos contaminados mediante biorremediación por bacterias es una alternativa útil. Se ha documentado el uso de especies del género *Pseudomonas* resistentes a mercurio (120 µg/mL) para la biorremediación de aguas residuales, debido a su capacidad de inmovilizar el metal y facilitar su extracción (4). Por estas razones, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo el aislamiento y la caracterización de bacterias resistentes a mercurio inorgánico y orgánico a partir de ambientes acuáticos con una potencial aplicación en biorremediación de ambientes contaminados.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

1.1. Material biológico.

Cepas control: *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proporcionadas por el Laboratorio BioSLab.

1.2. Técnica e instrumentos de investigación.

1.2.1. Toma de muestra.

Se colectaron muestras de aguas residuales en frascos Schott de vidrio estériles de 250 mL (Anexo, figura 1).

Las muestras de aguas residuales municipales procedieron de: Ica (Cachiche, 14°07'03"S 75°43'37"W), (Yaurilla, 14°03'40" S 75°40'24" W); Nazca (14°50'10" S 74°57'11" W) y Marcona (15° 22'20" S 75°08'40" W).

Las muestras de relaves mineros procedieron de: Saramarca (14°29'34" S 75°05'53" W), Ingenio (14°37'56"S 75°03'57" W) y Marcona (15°22' 00.0" S 75°09'00.0" W).

Todas las muestras fueron debidamente rotuladas, indicando lugar, fecha, punto de muestreo, temperatura de transporte. Asimismo, se trasladaron en un conservador con gel pack, para mantener la cadena de frío, al laboratorio de Biotecnología, Biología molecular y Microbiología industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

1.3. Procesamiento de muestras.

1.3.1. Pre - enriquecimiento.

De cada muestra se inoculó 1 mL en tubos conteniendo 5 mL de caldo LB (g/L: cloruro de sodio, 1; extracto de levadura, 0.1 y peptona, 1) suplementado con 10 µg/mL de $HgCl_2$. Se incubaron por 24 h a 30 °C (74). Se seleccionaron aquellos que mostraron turbidez por el crecimiento bacteriano (Anexo, figura 2).

1.4. Aislamiento y conservación de bacterias resistentes a mercurio.

A partir de los tubos con crecimiento, se sembró una asada por estría y agotamiento en agar LB suplementado con 50 µg/mL de $HgCl_2$. Se incubaron a 24 h a 30 °C (74). Se seleccionaron las colonias por sus características macroscópicas y fueron sembradas por estría en agar MacConkey, se incubaron a 35 °C por 24 h, para aislar colonias con características tintoriales de ser Gram negativas (Anexo, figura 3). Las cepas fueron sembradas por triplicado en caldo LB y se incubaron por 24 h a 35 °C. Luego, fueron suplementadas con glicerol estéril al 30 % y se conservaron a -20 °C.

1.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

La resistencia de las cepas aisladas a mercurio fue determinada mediante el valor MIC. Esta se consideró como la concentración más baja de mercurio que impidió el crecimiento de la bacteria. Se ensayaron por triplicado los perfiles de resistencia de las cepas frente a cloruro de mercurio ($HgCl_2$) y acetato de fenilmercurio (PMA).

Los ensayos se realizaron en 2 mL de caldo LB suplementado con solución de $HgCl_2$ hasta alcanzar concentraciones (en µg/mL) de: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 y de PMA (en µg/mL): 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20. A cada tubo se inoculó 20 µL de suspensión de cultivo de 24 h, luego se incubaron a 25 °C y se midió la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro después de 24 h y 48 h (75). Se consideró como crecimiento bacteriano a las lecturas mayores a 0.05 de densidad óptica (Anexo, figura 4.).

Se utilizó como cepa control negativa a *E. coli* ATCC 25922, por no presentar resistencia a mercurio.

1.6. Caracterización bacteriana.

1.6.1. Caracterización macroscópica.

De un cultivo de 24 h se tomó una asada y se sembró por estría y agotamiento en placas con agar LB suplementadas con 10 µg/mL de $HgCl_2$ (Anexo, figura 5). Estas se incubaron a 35 °C por 24 h. Se determinaron las características culturales de las colonias entre ellas: tamaño, forma, borde y elevación.

1.6.2. Caracterización bioquímica y fisiológica.

Para la caracterización bioquímica, se consideraron las siguientes pruebas: producción de ácido sulfhídrico, producción de gas, capacidad de fermentar glucosa, lactosa y sacarosa en agar Hierro Triple Azúcar (TSI); utilización del citrato como única fuente de carbono; descarboxilación de la lisina; producción de indol; actividad de la enzima ureasa; producción de la enzima β - galactosidasa; actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa; actividad de la enzima catalasa; producción de amilasa; reducción de nitrato a nitrito; prueba de gelatinasa y producción de hemolisina (76) (Anexo, figura 6) (p. 39 - 41).

Para la caracterización fisiológica se realizó la prueba de movilidad (76) y solubilización de fosfato (77).

Se utilizó el medio NBRIP en la prueba de la solubilización de fosfato, se colocó 2 µL de inóculo al centro del medio de la placa por triplicado y se incubaron a 28 °C por espacio de 7 y 15 días hasta la observación de halos visibles alrededor de la colonia. Se realizaron las mediciones de los halos utilizando un fondo oscuro. La capacidad de solubilizar fosfato fue determinada mediante la siguiente fórmula (Anexo, figura 7):

$$S.F. = \frac{C.D. + H.D.}{C.D.}$$

S.F.: Solubilización de fosfato

C.D.: Diámetro de la colonia

H.D.: Diámetro de la zona de halo

1.6.3. Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF.

Las cepas bacterianas conservadas con glicerol al 30% se trasladaron al Laboratorio de Bacteriología clínica del Instituto Nacional de Salud (INS) en un conservador con gel pack, para mantener la cadena de frío. Los cultivos fueron reactivados en el Agar Tripticasa de Soya (TSA), incubados a 35 °C por 24 h. De cada uno de ellos se obtuvo una alícuota, utilizando un asa bacteriológica estéril, y se transfirió a un pocillo de una placa; posteriormente, se añadió 1µL de solución de matriz (agua ultra pura, ácido trifluoroacetico y acetonitrilo) sobre cada pocillos y se esperó de 15 a 20 min para que el sobrenadante se evapore (49). Transcurrido el tiempo, se colocó la placa en la cámara de Maldi Biotyper. Luego, se inició el programa FlexControl – Microflex para la selección del pocillo para la identificación bacteriana. El programa Maldi Biotyper compara el perfil de la bacteria con la base de datos de referencia (78), generando picos y los transforma en puntaciones, lo cual proporciona una gama de valores (Tabla 1). Para la identificación se utilizan algoritmos que proporcionan un valor de confianza determinado y dependiendo de ellos se puede identificar en familia, género o especie (78,79). Esta técnica es rápida y requiere mínimas cantidades de biomasa bacteriana (80) (Anexo, figura 8).

Tabla 1**.** Significado de la puntuación del equipo MALDI – TOF.

Gama de valores	Descripción
2.300 - 3.000	Alta probabilidad de la identificación de la especie.
2.000 - 2.299	Identificación según el género o probable de la especie.
1.700 - 1.999	Identificación probable del género.
0.000 - 1.699	Identidad poco fiable

1.7. Susceptibilidad a antibióticos.

Se utilizó el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco de Difusión propuesta por el INS (81). Para ello, se utilizaron cultivos de 24 h crecidos en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubados a 35°C (Anexo, figura 9). De cada uno de ellos se realizaron diluciones con solución salina estéril hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland, las mediciones se realizaron utilizando un nefelómetro (Anexo, figura 10). Con la ayuda de un hisopo de algodón estéril se sembró a partir de la suspensión bacteriana en la superficie del agar Müller-Hinton por triplicado. Se dejó por espacio de 5 a 10 minutos como máximo para que la superficie del medio se seque. Se mantuvo la tapa cerrada antes de colocar los discos de antibióticos. Estos se colocaron con ayuda de una pinza estéril de metal presionándolos ligeramente en el agar y separados a una distancia de 2.5 cm aproximadamente, para evitar superposición en las zonas de inhibición, Las placas se incubaron a 35 ℃ por 24 h. Se utilizó como organismo control a la cepa *E. coli* ATCC 25922, que presenta sensibilidad a los antibióticos.

Los discos de antibióticos utilizados fueron los siguientes: ampicilina (10 μg), cefazolina (30 μg), gentamicina (10 μg), cefoxitina (30 μg), ceftriaxona (30 μg), ceftazidima (30 μg), trimetoprima – sulfametoxazol (25 μg), meropenem (20 μg) y ciprofloxacino (5 μg).

Las lecturas se realizaron después de 24 h, utilizando un fondo oscuro bajo luz reflejada y midiendo el diámetro de la zona, incluyendo los 6 mm de los discos (82).

Los valores promedio y las desviaciones estándar de las lecturas de los halos de inhibición en los antibiogramas, se utilizaron para interpretar la sensibilidad bacteriana como: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), según los resultados independientes de cada cepa (81) (Anexo figura 11, Tabla 8, Tabla 9).

III. RESULTADOS

Tabla 2. Procedencia de cepas resistentes a mercurio aislados de ambientes acuáticos de la región Ica.

Procedencia	Lugar	Cepas					
Laguna de Oxidación	Cachiche	C1-E	C1-G (1)	C1-G (2)	C1-I (1)	C1-J (1)	C1-J (2)
	Marcona	M1A-1	M1A-2	M1C-3	M1C-3*	M1D-2	M1D-2*
		M1D-3					
	Nazca	N1A-1	N1A-2	N1A-3			
	Yaurilla	Y-01	Y1-A	Y1-B (2)	Y1-C*(1)	Y1-C*(2)	Y1-C*(3)
		Y1-D*	Y1-E	Y1-E*(1)	Y1-F	Y1-F*	Y1-G
		Y1-G*(1)	Y1-G*(2)	Y1-G*(3)	Y1-H (1)	Y1-H (2)	Y1-H*(2)
		Y1-I*(1)					
Relaves mineros	Ingenio	I3-2	I4-1	I4-2	I4-3		
	Marcona	M4-1	M6-1				
	Saramarca	S1-1	SA-2				

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de $HgCl_2$ frente a cepas aisladas de laguna de oxidación de aguas municipales de la región Ica.

Procedencia	Cepa	MIC $HgCl_2$ (µg/ml)
Cachiche	C1-E	75
	C1-G (1)	150
	C1-G (2)	75
	C1-I (1)	75
	C1-J (1)	100
	C1-J (2)	100
Marcona	M1A-1	75
	M1A-2	75
	M1C-3	75
	M1C-3*	75
	M1D-2	75
	M1D-2*	75
	M1D-3	75
Nazca	N1A-1	75
	N1A-2	75
	N1A-3	75
Yaurilla	Y-01	100
	Y1-A	75
	Y1-B (2)	75
	Y1-C*(1)	75
	Y1-C*(2)	75
	Y1-C*(3)	75
	Y1-D*	75
	Y1-E	100
	Y1-E*(1)	75
	Y1-F	150
	Y1-F*	75
	Y1-G	75
	Y1-G*(1)	100
	Y1-G*(2)	75
	Y1-G*(3)	75
	Y1-H (1)	75
	Y1-H (2)	75
	Y1-H*(2)	100
	Y1-I*(1)	75
E. coli ATCC 25922**		10

**: Control negativo

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de $HgCl_2$ frente a cepas aisladas de relaves mineros de la región Ica.

Procedencia	Cepa	MIC $HgCl_2$ (µg/ml)
Ingenio	I3-2	75
	I4-1	75
	I4-2	75
	I4-3	75
Marcona	M4-1	75
	M6-1	75
Saramarca	S1-1	75
	SA-2	75
E. coli ATCC 259222*		10

*: Control negativo

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de PMA frente a cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Procedencia	Cepa	MIC PMA (µg/ml)
Laguna de oxidación	C1-G (1)	10
	M1A-2	7.5
	N1A-1	5
	Y1-E	15
	Y1-B2	15
	Y1-F	5
	Y1-A	>20
	Y-01	7.5
	Y1-G*(1)	10
	M1C-3	5
Relaves mineros	S1-1	15
	I3-2	15
	I4-2	5
E. Coli ATCC 25922**		2.5

**: Control negativo; PMA: Acetato de fenilmercurio

Tabla 6. Características morfológicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Diámetro (mm)	Forma	Borde	Elevación
C1-G (1)	1	circular	entero	convexa
I3-2	2	circular	entero	Plana
I4-2	1	circular	entero	convexa
M1A-2	1	circular	entero	Plana
M1C-3	2	circular	entero	convexa
N1A-1	1	puntiforme	entero	Plana
S1-1	2	circular	entero	Plana
Y-01	1	ondulado	entero	Plana
Y1-A	1	circular	entero	convexa
Y1-B (2)	1	circular	entero	Plana
Y1-E	1	circular	entero	convexa
Y1-F	1	puntiforme	entero	Plana
Y1-G*(1)	1	circular	entero	Plana

Tabla 7. Características bioquímicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Ureasa	TSI	Lisina descarboxilasa	β galactosidasa	Indol	Lactosa	Citrato	Reducción de nitratos a nitritos	Hemolisina	Oxidasa	Catalasa	Amilasa	Gelatinasa
C1-G (1)	+	K/K, gas -, H_2S -	+	-	-	-	+	-	Gamma	+	+	-	-
I3-2	+	K/A, gas ++, H_2S -	-	+	-	+	+	+	Gamma	-	+	-	-
I4-2	-	K/K, gas -, H_2S -	+	-	-	-	+	-	Gamma	+	+	-	-
M1A-2	+	A/A, gas ++, H_2S -	+	+	+	+	+	+	Gamma	-	+	-	-
M1C-3	+	A/A, gas ++, H_2S -	-	+	-	+	+	+	Gamma	-	+	-	-
N1A-1	-	A/A, gas -, H_2S -	-	+	-	+	+	+	Gamma	-	+	-	-
S1-1	+	K/A, gas ++, H_2S -	-	+	-	-	+	+	Gamma	-	+	-	-
Y-01	-	A/A, gas +, H_2S -	-	+	+	+	-	+	Gamma	-	+	-	-
Y1-A	-	K/K, gas -, H_2S -	+	-	-	-	+	-	Gamma	+	+	-	-
Y1-B (2)	-	K/K, gas -, H_2S -	-	-	-	-	+	-	Gamma	+	+	-	-
Y1-E	+	K/K, gas -, H_2S -	+	-	-	-	+	-	Gamma	+	+	-	-
Y1-F	+	K/K, gas -, H_2S -	+	-	-	-	+	-	Alfa	+	+	-	-
Y1-G*(1)	+	A/A, gas -, H_2S -	-	+	-	-	+	+	Gamma	-	+	-	-
E. coli ATCC 25922**	-	A/A, gas + H_2S -	+	+	+	+	-	+	Gamma	-	+	-	-
S. aureus ATCC 25923**									Beta				

A/A: acidez / acidez; K/K: alcalinidad/alcalinidad; K/A: alcalinidad/ acidez; **: Controles; (+): positivo; (-): negativo

Tabla 8. Características fisiológicas de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Solubilización de fosfato*** (mm)	Motilidad
C1-G (1)	9	+
I3-2	-	+
I4-2	-	+
M1A-2	-	-
M1C-3	-	+
N1A-1	-	+
S1-1	-	+
Y-01	-	+
Y1-A	-	+
Y1-B (2)	-	+
Y1-E	6	+
Y1-F	-	+
Y1-G*(1)	12	+
E. coli ATCC25922**	-	+

: Control; *: Promedio por triplicado; (+): Positivo; (-): Negativo

Tabla 9. Especies bacterianas identificadas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Genero según la bioquímica y fisiología	Identificación según MALDI-TOF	
		Especie	Puntuación
C1-G (1)	*Pseudomonas*	*Pseudomonas monteilli*	2.278
I3-2	*Enterobacter*	*Enterobacter*	1.88
I4-2	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	2.277
M1A-2	*Klebsiella*	*Klebsiella oxytoca*	2.375
M1C-3	*Enterobacter*	*Enterobacter asburiae*	2.226
N1A-1	*Enterobacter*	*Citrobacter freundii*	2.447
S1-1	*Enterobacter*	*Enterobacter cloacae*	2.127
Y-01	*Escherichia*	*Escherichia coli*	2.449
Y1-A	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	2.123
Y1-B (2)	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	2.067
Y1-E	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	2.147
Y1-F	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	2.225
Y1-G*(1)	*Enterobacter*	*Enterobacter cloacae*	2.135

Valores de la identificación por MALDI - TOF: 0.000 – 1.699: poco fiable; 1.700-1.999: probable género; 2.000 – 2.299: probable especie; 2.300 – 3.000: alta probabilidad de especie.

Tabla 10. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Antibiótico (µg)								
	Ampicilina (10)	Cefazolina (30)	Cefoxitina (30)	Ceftriaxona (30)	Ceftazidima (30)	Gentamicina (10)	Trimetoprima Sulfametoxazol (25)	Meropenem (20)	Ciprofloxacino (5)
C1-G (1)	R	R	R	I	S	S	R	R	S
I3-2	R	R	R	S	S	S	S	S	S
I4-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M1A-2	I	S	S	S	S	S	S	S	S
M1C-3	S	S	S	S	S	S	R	R	S
N1A-1	R	R	R	S	S	R	S	S	I
S1-1	I	I	R	S	S	S	S	S	S
Y-01	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Y1-A	R	R	R	S	S	R	R	R	R
Y1-B (2)	R	R	R	S	S	S	R	R	S
Y1-E	R	R	R	S	S	S	R	R	S
Y1-F	R	R	R	S	S	S	R	R	S
Y1-G* (1)	R	S	I	S	S	S	S	S	I
E. coli ATCC 25922**	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente; **: Control

IV. DISCUSION

En el presente estudio se aislaron 43 cepas bacterianas resistentes a 10 µg/mL de mercurio inorgánico ($HgCl_2$) provenientes de ambientes acuáticos de la Región Ica (Tabla 2). El aislamiento de bacterias con estas características de resistencia explicaría la presencia de compuestos mercuriales en el ambiente (46). Se han documentado aislamientos de bacterias resistentes a mercurio a partir de aguas residuales (46, 54), sedimentos de playas (31, 45), lagunas (12) y ríos (60, 68). El rol ambiental de estas bacterias estaría relacionado con su participación en los procesos de microremediación natural y participación en el ciclo biogeoquímico del mercurio (45). De los aislados, 35 procedieron de lagunas de oxidación de aguas residuales municipales (Tabla 3) y 8 de relaves mineros (Tabla 4). Ambos tipos de ambientes acuáticos reciben diferentes tipos de metales pesados y entre ellos Hg, por lo que es frecuente aislar bacterias que resisten a las condiciones extremas que existen en ellos (44, 25). Asimismo, se seleccionaron 13 cepas resistentes a mercurio orgánico (PMA) (Tabla 5), lo que indica la presencia de cepas con amplio espectro de resistencia. Debido a que resisten tanto a mercurio inorgánico (Hg^{2+}) como a mercurio orgánico (HgMe), probablemente obedezca a la diversidad de contaminantes que reciben estos tipos de agua y a la presencia de microbiota generadora de formas orgánicas de mercurio (22, 39, 44, 58).

Las cepas aisladas de aguas residuales municipales presentaron mayores valores de resistencia a $HgCl_2$ (150 µg/mL) expresados en los valores MIC (Tabla 3), debido probablemente a la mayor diversidad bacteriana existente en el ambiente acuático y por estar expuestas a selección por los desechos industriales, domiciliarios y hospitalarios (30). Asimismo, la presencia de elementos de movilidad génica como transposones, plásmidos y fagos hace posible la aparición de especies con presencia de genes de resistencia transferidos de manera horizontal, un factor que promueve la diversidad genética en el microbiota acuática. Estos microorganismos son importantes debido a que participarían en la biorremediación natural de ambientes acuáticos, como ocurre en las lagunas de oxidación (39). Asimismo, este tipo de aguas son fuentes importantes para el aislamiento de bacterias resistentes a mercurio (4) y otros contaminantes que pueden ser utilizados para el tratamiento de lagunas, ríos y mares contaminados (38).

Los valores de resistencia expresados en MIC oscilaron entre 75 y 150 µg/mL de $HgCl_2$ y entre 5 y 20 µg/mL de PMA (Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5). Estos resultados son similares a aquellos documentados por otros investigadores, los cuales observaron valores de resistencia entre 50 y 100 µg/mL de $HgCl_2$ y entre 20 y 50 µg/mL de PMA (5, 75). La sobrevivencia de las bacterias en ambientes contaminados con altas concentraciones de compuestos mercuriales les permite activar mecanismos de resistencia presentes en el cromosoma o en plásmidos (31), con el objetivo de ser utilizados los compuestos organomercuriales como fuentes de energía y carbono (61).

El mecanismo de resistencia a mercurio más estudiado es mediado por la presencia del operón "*mer*", el cual contiene los genes *merA, merB, merP, merT, merR*, entre otros (66). Los genes involucrados directamente en la resistencia son *merA*, que codifica para una enzima mercurio reductasa, que reduce el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) a mercurio volátil (Hg0) y *merB*, que codifica para una enzima mercurio liasa, involucrada en la hidrólisis de mercurio orgánico (HgMe) con la liberación del mercurio inorgánico (Hg^{2+}) (1). Los que solo presentan el gen *merA* se denominan de espectro reducido y los que presentan ambos genes se denominan de amplio espectro (6,66). Algunas bacterias Gram negativas no presentan el gen *merB* (35) y sólo resisten a mercurio inorgánico, lo que explicaría la existencia de pocas cepas que mostraron resistencia a PMA (Tabla 5). Asimismo, es posible que otros mecanismos diferentes al operón *mer* también participen en la resistencia observada. Resultados similares se han reportado, donde de 80 aislados solo 18 de ellas crecieron en presencia de PMA (5).

Los mayores valores de MIC de $HgCl_2$ y de PMA se observaron frente a las cepas Y1-E y Y1-F (Tabla 3) y a las cepas Y1-A, Y1-B (2) y Y1-E, respectivamente (Tabla 5). Estas corresponden a la especie *P. putida*. Miembros del género *Pseudomonas* se aíslan con frecuencia de diferentes fuentes (4, 42, 46, 74, 83, 84) y *P. putida* se caracteriza por su versatilidad genética y metabólica, por lo que uno de los principales objetivos es explotar su potencial aplicación futura en procesos de biorremediación **(**85). Asimismo, se han reportado a especies de los géneros *Escherichia* (45), *Klebsiella* (46,60), *Shigella* (60), *Citrobacter* (63), *Serratia* (46), *Proteus* (46,56) y *Stenotrophomonas* (58) como resistentes al mercurio.

Las cepas C1-G (1) y Y1-E, que pertenecen al género *Pseudomonas* y la cepa Y1-G*(1), al género *Enterobacter*, demostraron capacidad de solubilizar fosfato inorgánico (Tabla 8). Se ha documentado que algunas especies del género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas sp.* MS16, son solubilizadoras de fosfato inorgánico (86). Esta característica indica que no solo son potenciales biorremediadores, sino que pueden ser utilizadas como promotoras de crecimiento vegetal (87), representando el 10% de bacterias con la capacidad de solubilizar el fosfato (88). También pueden participar en los ciclos biogeoquímicos (77).

La identificación bacteriana ha pasado por diferentes etapas según los avances de la ciencia. La caracterización mediante métodos bioquímicos tradicionales en la actualidad tiene muchas limitaciones y solo permite realizar una identificación parcial o preliminar. Sin embargo, cuando se trata de bacterias ambientales, donde existen condiciones extremas y se exponen a mayor variabilidad genética por la presencia de fagos y otros elementos genéticos móviles, se pueden observar variaciones en las características metabólicas y fisiológicas (36). Este puede explicar los resultados en la identificación bioquímica de la cepa Y1-E, que según MALDI-TOF corresponde a *P. putida*, pero se determinó como lisina descarboxilasa positiva (Tabla 7) y le correspondería

ser lisina descarboxilasa negativa. El cambio observado puede deberse a una mutación en el gen que codifica para la enzima u otro que no permita la expresión de la misma (65).

Por otro lado, la cepa N1A-1 fue identificada mediante la bioquímica tradicional como especie del género *Enterobacter* y mediante MALDI – TOF como *Citrobacter freundii* (Tabla 9). Este resultado variable entre la identificación bioquímica y por MALDI-TOF se debe a la ausencia de producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S), característica típica de esta especie. Sin embargo, se han determinado variantes bioquímicas en especies del género *Citrobacter* que no logran producir H_2S (89). La diferente identificación de la cepa N1A-1 mediante ambas pruebas se debe a que los resultados de muchas pruebas bioquímicas entre las especies de los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* son similares(89) La técnica MALDI-TOF, que tiene más precisión y confiablidad, ha permitido confirmar las especies *P. putida, P. monteilli*, *E. cloacae, E. asburiae*, *K. oxytoca* y *E. coli* (Tabla 9), también aisladas en otras investigaciones (54, 68).

Frente a las dificultades en la identificación bioquímica, se han establecido pruebas de caracterización molecular, las cuales han mejorado la detección e identificación de los microorganismos (76). El uso de la técnica MALDI – TOF, que se basa en la identificación de proteínas ribosómicas, es más precisa y permite la identificación a nivel de especie, esto debido a que hay un perfil de expresión característico de las especies y es comparado con un patrón de especies de referencia (78). Con los resultados se demuestra que la caracterización mediante MALDI – TOF es más confiable que la identificación bioquímica. Sin embargo, en la actualidad la identificación mediante secuenciación y comparación de genes marcadores es la de mayor confiabilidad (51).

En la caracterización de las bacterias en estudio, también se determinó la sensibilidad a diversos antibióticos. Las cepas I4-2 y Y-01 tuvieron sensibilidad a todos los antibióticos evaluados, Y1-G*(1) y M1A-2 presentaron resistencia e intermedio a ampicilina respectivamente (Tabla 10). Todas las cepas identificadas como *Pseudomonas* excepto I4-2 fueron resistentes a ampicilina y sensibles a ceftriaxona y ciprofloxacino. Otros autores citan a *Pseudomonas* con similar perfil (4, 46). Estas cepas que presentan resistencia a betalactámicos se deben a que en el ecosistema existen microorganismos que producen estos metabolitos (25). Se observó también resistencia de la cepa Y1-A a ciprofloxacino. Las cepas M1A-2, M1C-3 y Y-01 fueron identificadas como *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *E. coli* respectivamente, que presentaron sensibilidad a ceftriaxona (Tabla 10). Resultados similares son citados por otros investigadores (54).

Los resultados variables de respuesta frente a los antibióticos es un hecho que se observa en todas las especies bacterianas debido a que los determinantes de resistencia, generalmente ubicados en plásmidos y otros elementos móviles, pueden desplazarse de una especie a otra, generando variabilidad y el surgimiento de especies con múltiples resistencias a antibióticos, lo cual constituye un problema mundial. La presencia de antimicrobianos y metales pesados en el

ambiente, incluyendo a mercurio, han contribuido a la selección de bacterias con resistencia a antibióticos y a metales pesados, por lo que es frecuente observar genomas con la presencia de diversos tipos de genes que confieren resistencia a diversos compuestos tóxicos y a metales pesados (25, 43). Debido a que las bacterias utilizan los mismos mecanismos para expulsar o repeler algunos agentes extraños (45), algunos de los más frecuentes son la prevención de acceso a la célula, mutación en las porinas y la presencia de bombas de expulsión, entre otras (1, 6, 34).

V. CONCLUSIONES

Al término de la investigación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Existen bacterias resistentes a mercurio inorgánico ($HgCl_2$) y a mercurio orgánico (PMA) en las aguas residuales municipales y relaves mineros de la región Ica.
- Los valores de resistencia bacteriana frente a $HgCl_2$ y a PMA expresados en MIC variaron entre 75 µg/ mL y 150 µg/mL y entre 5 µg/mL a > 20 µg/mL, respetivamente.
- La especie *P. putida* presentó los mayores valores de resistencia a las formas de mercurio ensayadas.
- Especies del género *Pseudomonas* y *E. cloacae* tienen la capacidad de solubilizar fosfato.
- La mayoría de las bacterias evaluadas presentaron resistencia a ampicilina, cefazolina y cefoxitina.

VI. RECOMENDACIONES

- Identificar las cepas bacterianas utilizando secuenciación de marcadores moleculares.
- Realizar nuevos aislamientos bacterianos de muestras de áreas contaminadas con mercurio.
- Determinar los valores MIC de otros metales pesados frente a las cepas estudiadas
- Evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de las cepas estudiadas para su aplicación en suelos contaminados con metales pesados.
- Seleccionar las cepas que tengan capacidad de volatilizar mercurio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iza JF, Recalde CG, Iza CF. Determinantes genéticos y sus mecanismos de acción implicados en la resistencia bacteriana a metales pesados: una revisión. Perfiles. 2022;1(27):26–38.
2. Londoño L, Londoño P, Muñoz F. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. Biotecnol en el Sect Agropecu y agroindustrial. 2016;14(2):145–153.
3. Reyes Y, Vergara I, Torres O, Diaz M, Gonzalez E. Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. Rev Ing Investig y Desarro. 2016;16(2):66–77.
4. Fawwaz-Alfarras A, HamidaL-Fahdawi M, Albayaty M. Heavy metal resistance ability of *Pseudomonas* species isolated from sludge and sewage in Iraq. Arch razi Inst. 2022;77(3):1041–1047.
5. Arif J, Mudsser A, Arif A, Qazi M, Rizwanul H. Molecular characterization of mercury resistant bacteria inhabiting polluted water bodies of different geographical locations in India. Curr Microbiol. 2012;65:14–21.
6. Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev. 2003;27(2–3):355–384.
7. Wang X, Wang WX. The three 'B' of fish mercury in China: Bioaccumulation, biodynamics and biotransformation. Environ Pollut [Internet]. 2019;250:216–232. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.034
8. Calva G, Torres M. Metales pesados y sus efectos en organismos. ContactoS. 2003;51:33–42.
9. Canham R, González-Prieto AM, Elliott JE. Mercury exposure and toxicological consequences in fish and fish-eating wildlife from anthropogenic activity in latin america. Integr Environ Assess Manag. 2020;17(1):13–26.
10. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. Am J Ind Med. 2007;50(10):757–764.
11. Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo ME, Salgado I, Olivares S, et al. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. Resvista CENIC Ciencias Biológicas [Internet]. 2010;41:1–10. Disponible en: http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf
12. Benghait Y, Blaghen M. Heavy metals and antibiotics resistance of bacteria isolated from Marchica lagoon: biodegradation of anthracene on submerged aerated fixed bed reactor.

Environ Technol [Internet]. 2020;43(10):1493–1502. Disponible en: https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1839133

13. Barago N, Mastroianni C, Pavoni E, Floreani F, Parisi F, Lenaz D, et al. Environmental impact of potentially toxic elements on soils, sediments, waters, and air nearby an abandoned Hg-rich fahlore mine (Mt. Avanza, Carnic Alps, NE Italy). Environ Sci Pollut Res [Internet]. 2023;30:63754–63775. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s11356-023-26629-7

14. Bhan A, Sarkar N. Mercury in the environment: Effect on health and reproduction. Rev Environ Health. 2005;20(1):39–56.

15. Sepúlveda L, Agudelo L, Arenga Á. El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. Lunazul. 2006;1–9.

16. Bernhoft RA. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. J Environ Public Health. 2011;2012:1–10.

17. Gaioli M, Amoedo D, González D. Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. Argent Pediatr. 2012;110(3):259–264.

18. Islam MA, Das B, Quraishi SB, Khan R, Naher K, Hossain SM, et al. Heavy metal contamination and ecological risk assessment in water and sediments of the Halda river, Bangladesh: A natural fish breeding ground. Mar Pollut Bull [Internet]. 2020;160:1–7. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111649

19. Ordiano-Flores A, Galván-Magaña F, Rosiles-Martínez R. Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of yellowfin tuna, Thunnus albacares, of the eastern Pacific Ocean. Biol Trace Elem Res. 2011;144:606–620.

20. Velásquez-Riaño M, Benavides-Otaya HD. Bioremediation techniques applied to aqueous media contaminated with mercury. Crit Rev Biotechnol. 2015;36:1–7.

21. Ramírez A. Intoxicación ocupacional por mercurio. An la Fac Med. 2008;69(1):46–51.

22. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash M. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. J Cell Biochem. 2018;119(1):157–184.

23. Rafati-Rahimzadeh M, Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia A. Current approaches of the management of mercury poisoning: Need of the hour. DARU, J Pharm Sci. 2014;22(46):1–10.

24. Oziegbe O, Oluduro A, Oziegbe E, Ahuekwe E, Olorunsola S. Assessment of heavy metal bioremediation potential of bacterial isolates from landfill soils. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2021;28(7):3948–3956. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.072

25. Govin-Sanjudo A, Reyes-Palmero M, Guerra M, Lopez M. Caracterización de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de un residual minero cubano. Minería y Geol. 2020;36(2):188–203.

26. García R, Barrera A, Taco C, Padilla M. Bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons based on bacteria used as bioproducts. Rev lasallista Investig. 2020;17(1):177–187.

27. Dash HR, Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. Int Biodeterior Biodegrad. 2012;75:207–213.

28. Huang L, Xiao X, Zhao G. Microbes: the hidden giant behind the biogeochemical cycling of elements in the hydrosphere. Sci China Life Sci. 2019;62(10):1271–1274.

29. Kannan S, Krishnamoorthy R. Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury - A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. Sci Total Environ. 2006;367(1):341–353.

30. Dash H, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S. Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(2):561–571.

31. Acevedo-Barrios R, Severiche-Sierra C. Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias , caribe colombiano. Av Investig en Ing. 2013;10(2):73–79.

32. Marrero-Coto J, Díaz-Valdivia A, Coto-Pérez O. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. Rev CENICCiencias Biológicas. 2010;41(1):67–78.

33. Mccarthy D, Edwards G, Gustin M, Care A, Miller M, Sunna A. An innovative approach to bioremediation of mercury contaminated soils from industrial mining operations. Chemosphere [Internet]. 2017;184:694–699. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.051

34. Priyadarshanee M, Chatterjee S, Rath S, Dash H, Das S. Cellular and genetic mechanism of bacterial mercury resistance and their role in biogeochemistry and bioremediation. J Hazard Mater [Internet]. 2022;423(PA):1–20. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126985

35. Chien M, Narita M, Lin K, Matsui K, Huang C, Endo G. Organomercurials removal by heterogeneous *merB* genes harboring bacterial strains. J Biosci Bioeng [Internet]. 2010;110(1):94–98. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.010

36. Parrilli E, Tedesco P, Fondi M, Tutino M, Logiudice A, Depascale D, et al. The art of

adapting to extreme environments: The model system Pseudoalteromonas. Phys Life Rev [Internet]. 2019;36:137–161. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.plrev.2019.04.003

37. Guermouche-M'rassi A, Bensalah F, Gury J, Duran R. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Sci Pollut Res. 2015;22(20):15332–15346.

38. Wasi S, Tabrez S, Ahmad M. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: A review. Environ Monit Assess. 2013;185(10):8147–8155.

39. Kelany M, El-sawy M, El-Gendy A, Beltagy E. Bioremediation of industrial wastewater heavy metals using solo and consortium *Enterobacter* spp. Environ Monit Assess. 2023;195(11):1–21.

40. Zhao L, Wu D, Wu L, Song T. A simple and accurate method for quantification of magnetosomes in magnetotactic bacteria by common spectrophotometer. J Biochem Biophys Methods. 2007;70(3):377–383.

41. Abu-Dieyeh M, Alduroobi H, Al-Ghouti M. Potential of mercury-tolerant bacteria for bio-uptake of mercury leached from discarded fluorescent lamps. J Environ Manage [Internet]. 2019;237(February):217–227. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.066

42. Santos-Gandelman J, Giambiagi-Demarval M, Muricy G, Barkay T, Laport M. Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2014;106(3):585–590.

43. Robas M, Probanza A, González D, Jiménez P. Mercury and antibiotic resistance co-selection in *Bacillus* sp. isolates from the almadén mining district. Int J Environ Res Public Health. 2021;18(16):1–11.

44. Yuan L, Li Z, Zhang M, Shao W, Fan Y, Sheng G. Mercury/silver resistance genes and their association with antibiotic resistance genes and microbial community in a municipal wastewater treatment plant. Sci Total Environ [Internet]. 2019;657:1014–1022. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.088

45. Sulca-López M, Alvarado-Iparraguirre D. Association of mercury resistance with resistance to antibiotics in *Escherichia coli* isolated from the coast of Lima, Perú. Rev Perú Biol. 2018;25(4):445–452.

46. Filali B, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi F, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr Microbiol. 2000;41(3):151–156.

47. Mahbub K, King W, Siboni N, Nguyen V, Rahman M, Megharaj M, et al. Long-lasting effect of mercury contamination in the soil microbiome and its co-selection of antibiotic

resistance. Environ Pollut [Internet]. 2020;265:1–24. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115057

48. Vásquez-Banda M, Sánchez-Calderón L, Díaz-Pérez C. Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias resistentes a metales pesados del estado de Zacatecas. Jovenes en la Cienc. 2017;6(1):12–16.

49. Akimowicz M, Bucka-kolendo J. MALDI-TOF MS – Application in food microbiology. Acta Biochim Pol. 2020;67(3):327–332.

50. Tassadaq H, Aneela R, Shehzad M, Iftikhar A, Jafar K, Veronique E, et al. Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. African J Microbiol Res. 2013;7(16):1579–1590.

51. Risch M, Radjenovic D, Han J, Wydler M, Nydegger U, Risch L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. Swiss Med Wkly. 2010;140(September):1–5.

52. Chun K, Syndergaard C, Damas C, Trubey R, Mukindaraj A, Qian S, et al. Sepsis pathogen identification. J Lab Autom. 2015;20(5):539–561.

53. Chris B, Uyttendaele M, Han J, Andy D. The enterobacteriaceae and their significance to the food industry. Brussels, Belgium: ILS Europe Report Series; 2011. 1–49 p.

54. Coila-Apaza K. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno. Universidad Nacional del Altiplano; 2017.

55. Giovanella P, Cabral L, Bento F, Gianello C, Camargo F. Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A. N Biotechnol. 2016;33(1):216–223.

56. Giovanella P, Bento F, Cabral L, Gianello C, Oliveira Camargo F. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. Quim Nova. 2011;34(2):232–236.

57. Behuria H, Shee R, Gupta S, Biswal BK, Kumar Sahu S. Evaluation of Biotechnological Potential of Novel Mercury Tolerant Strain of *Klebsiella Pneumonia*. J Appl Microbiol Biochem. 2018;02(03)439-444.

58. Naguib M, Khairalla A, El-Gendy A, Elkhatib W. Isolation and characterization of mercury-resistant bacteria from wastewater sources in Egypt. Can J Microbiol [Internet]. 2019;65(4):1–33. Disponible en: www.nrcresearchpress.com

59. Wang L, Liu L, Liu D, Yin Z, Feng J, Zhang D, et al. The first report of a fully sequenced resistance plasmid from *Shigella boydii*. Front Microbiol. 2016;7(Oct):1–8.

60. Mollocondo MR. Tolerancia in vitro de enterobacterias a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol aisladas del río Coata, Puno. Universidad nacional del altiplano de Puno; 2020.

61. Subach O, Piatkevich K, Subach F. NeMeHg, genetically encoded indicator for mercury ions based on mNeonGreen green fluorescent protein and *merP* protein from *Shigella flexneri*. Front Bioeng Biotechnol. 2024;12(July):1–9.

62. Gaeta N, Decarvalho D, Fontana H, Sano E, Moura Q, Fuga B, et al. Genomic features of a multidrug-resistant and mercury-tolerant environmental *Escherichia coli* recovered after a mining dam disaster in South America. Sci Total Environ. 2022;823:1–9.

63. Binish M, Shini S, Sinha R, Krishnan K, Mohan M. Mercuric reductase gene (*merA*) activity in a mercury tolerant sulphate reducing bacterium isolated from the Kongsfjorden, Arctic. Polar Sci [Internet]. 2021;30(October):1-8. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.polar.2021.100745

64. Aram M, Sharifi A, Kafeelzadeh F, Naghmachi M, Yasari E. Isolating Mercury-resistant Bacteria from Lake Maharloo. Int J Biol. 2012;4(3):63–71.

65. Paternina-Mercado F, Bedoya-Velez J, Ochoa-Agudelo S. Comportamiento cualitativo de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales, expuestas a mercurio. Inf Técnico. 2022;86(2):205–219.

66. Baldi F, Gallo M, Battistel D, Barbaro E, Gambaro A, Daniele S. A broad mercury resistant strain of *Pseudomonas putida* secretes pyoverdine under limited iron conditions and high mercury concentrations. BioMetals. 2016;29(6):1097–1106.

67. Zhang W, Chen L, Liu D. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93(3):1305–1314.

68. Quispe-Machaca E. Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis - Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano; 2017.

69. Macedo M. Resistencia a antibíoticos y metales pesados en enterobacterias aisladas en aguas residuales de la ciudad de Juliaca-2021. Universidad Nacional del Altiplano; 2022.

70. Ashe K. Elevated mercury concentrations in humans of Madre de Dios, Perú. PLoS One. 2012;7(3):1–6.

71. Hagan N, Robins N, Hsu-Kim H, Halabi S, Gonzales R, Richter B, et al. Residential mercury contamination in adobe brick homes in Huancavelica, Perú. PLoS One. 2013;8(9):1–9.

72. Osores F, Grández J, Fernández J. Mercurio y salud en Madre de Dios, Perú. Acta Méd

Perú [Internet]. 2010;27(4):310–314. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v27n4/a16v27n4.pdf

73. Mahbub K, Bahar M, Labbate M, Krishnan K, Andrews S, Naidu R, et al. Bioremediation of mercury: not properly exploited in contaminated soils. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2017;101(3):963–976. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8079-2

74. Ball M, Carrero P, Castro D, Yarzábal L. Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). Curr Microbiol. 2007;54(2):149–154.

75. Nakamura K, Fujisaki T, Tamashiro H. Characteristics of Hg-resistant bacteria isolated from Minamata Bay sediment. Environ Res. 1986;40(1):58–67.

76. Gary W, Deirdre L, Hall G, Janda W, Koneman E, Schreckenberger P, et al. Koneman diagnóstico microbiológico. 7a ed. Barcelona - España: Wolters Kluwer; 2018. 1602 p.

77. García R, Lovaisa N, Ulla E. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L .). Rev Agron Noroeste Argent. 2015;35(1):19–28.

78. Dingle T, Butler-Wu S. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. Clin Lab Med. 2013;33(3):589–609.

79. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. 2015;61(1)10-12.

80. Decarolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. J Infect Dev Ctries. 2014;8(9):1081–1088.

81. Sacsaquispe-Contreras R, Velásquez-Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud,. Dr. Leonid. Lima - Perú; 2002.

82. Bernal M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. Biomédica. 1984;4(3–4):112–121.

83. Imron M, Kurniawan S, Soegianto A. Characterization of mercury-reducing potential bacteria isolated from Keputih non-active sanitary landfill leachate, Surabaya, Indonesia under different saline conditions. J Environ Manage [Internet]. 2019;241(April):113–122. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.017

84. Choque-Guevara R. Detección de genes *merA* y *merB* en *Pseudomonas* spp. resistentes a mercurio en ambientes acuáticos. [Ica]: Univeridad San Luis Gonzaga; 2019.

85. Weimer A, Kohlstedt M, Volke D, Nikel P, Wittmann C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(18):7745–7766.

86. Suleman M, Yasmin S, Rasul M, Yahya M, Atta B, Mirza M. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. PLoS One. 2018;13(9):1–28.

87. Janati W, Mikou K, El Ghadraoui L, Errachidi F. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing legumes rhizosphere in Morocco. Front Microbiol. 2022;13(September):1–18.

88. Laral C, Esquivel Avila LM, Negrete Peñata JL. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. [Internet]. 2011;9(2):114–120. Disponible en: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=73998932&lang=es&site=ehost-live

89. Ewing W, Davis B. Biochemical Characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and Designation of the Neotype Strain. Int J Syst Bacteriol. 1972;22(1):12–18.

VIII. ANEXOS

Figura 1. Muestras de ambientes acuáticos de relaves mineros de la región Ica.

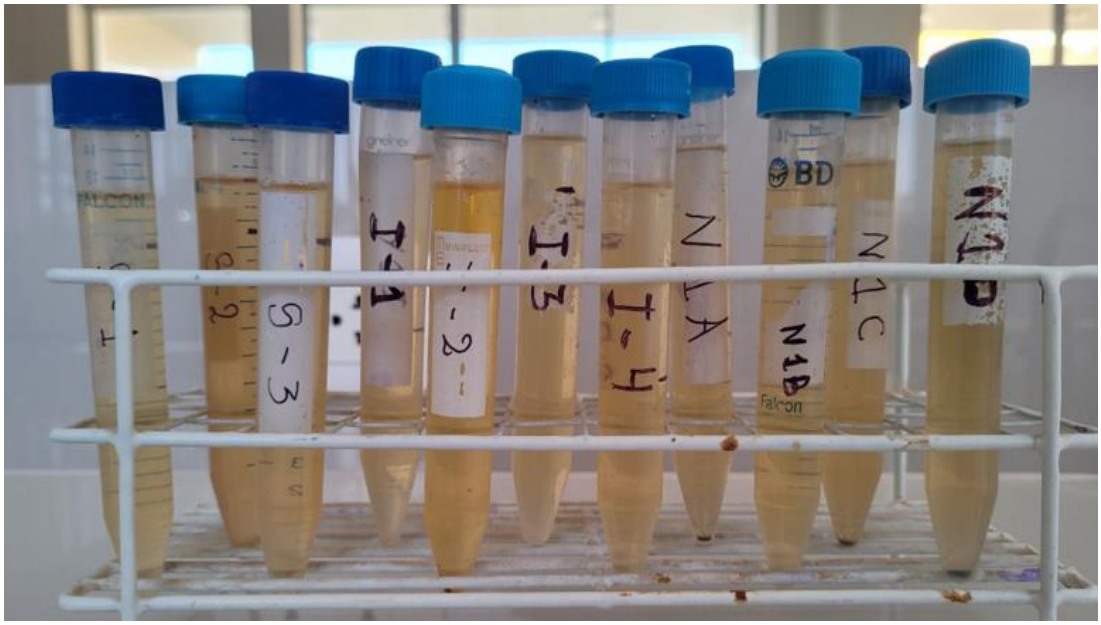

Figura 2. Pre- enriquecimiento en caldo LB suplementado con 10 µg/mL de $HgCL_2$ aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

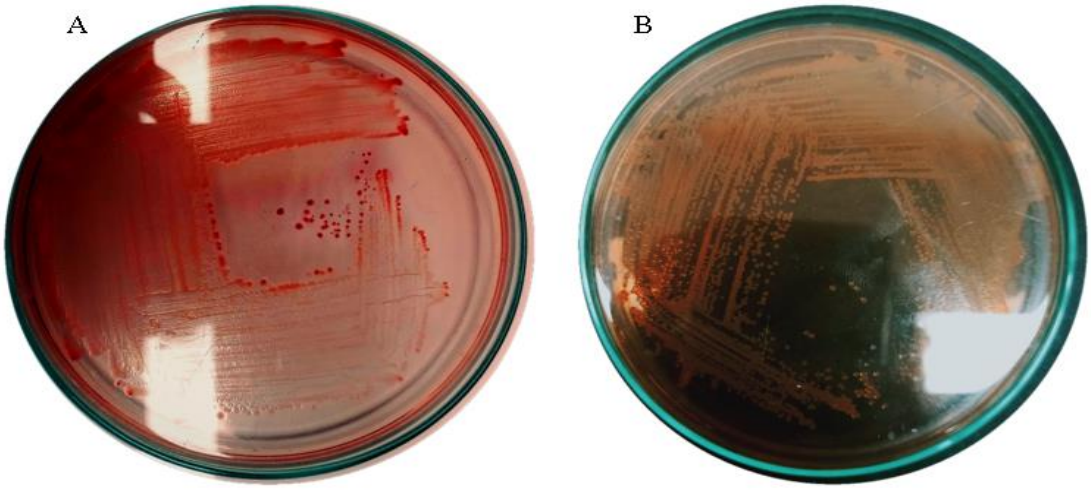

Figura 3. Cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica, en medio agar MacConkey procedentes de relave minero: A) I3-2; laguna de oxidación: B) C1-G (1).

Figura 4. Concentración mínima inhibitoria de la cepa C1-E frente a $HgCl_2$ procedente de laguna de oxidación, por triplicado con concentraciones de $HgCl_2$ (µg/ mL): 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 150 respectivamente de izquierda a derecha.

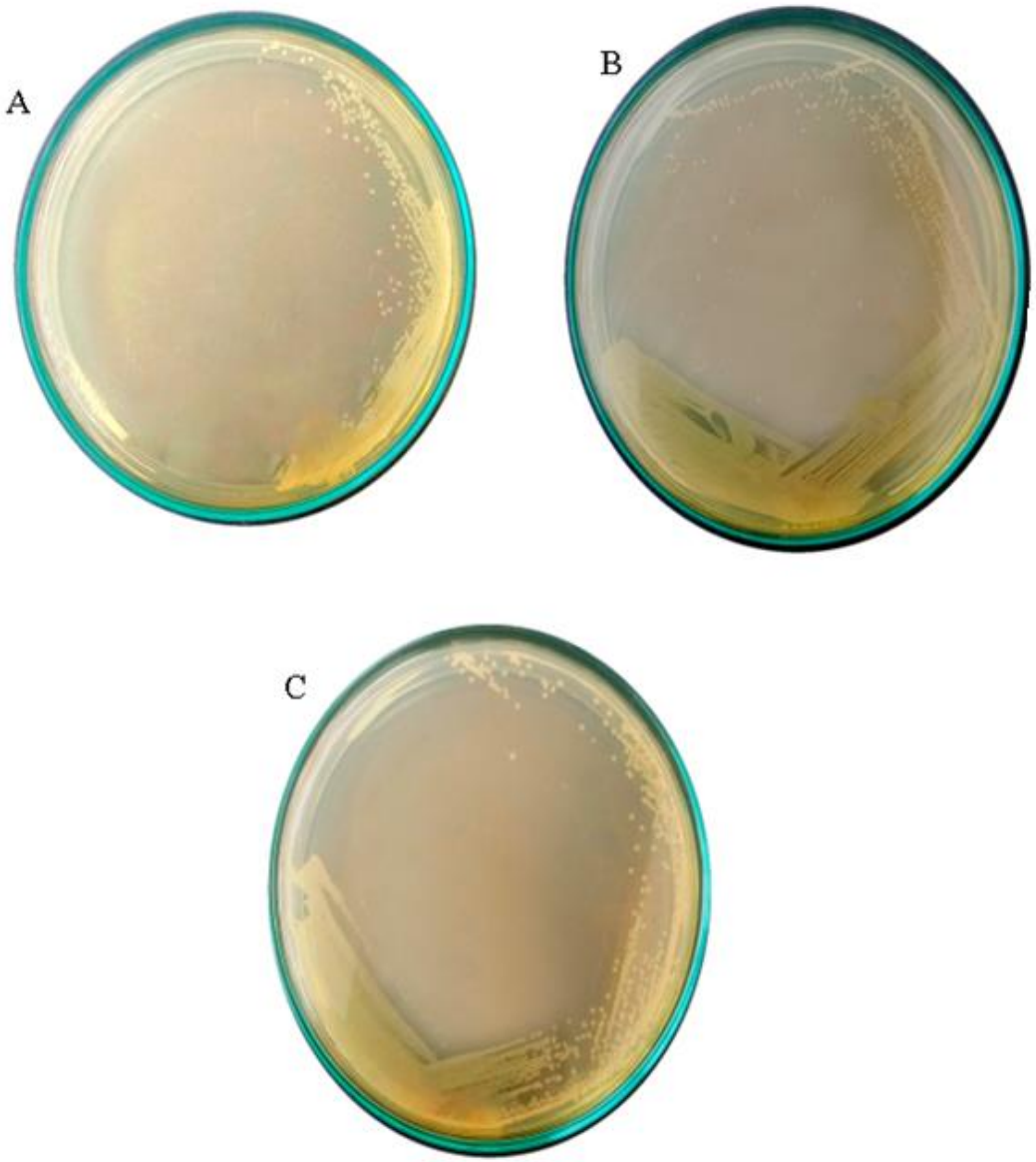

Figura 5. Agar LB suplementado con 10 µg/mL de $HgCl_2$ con cepas procedentes de lagunas de oxidación; A) Y1 -B (2), B) Y1-G*(1); relave minero, C) I 3-2

Figura 6: Pruebas bioquímicas para su posterior identificación de enterobacterias aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica

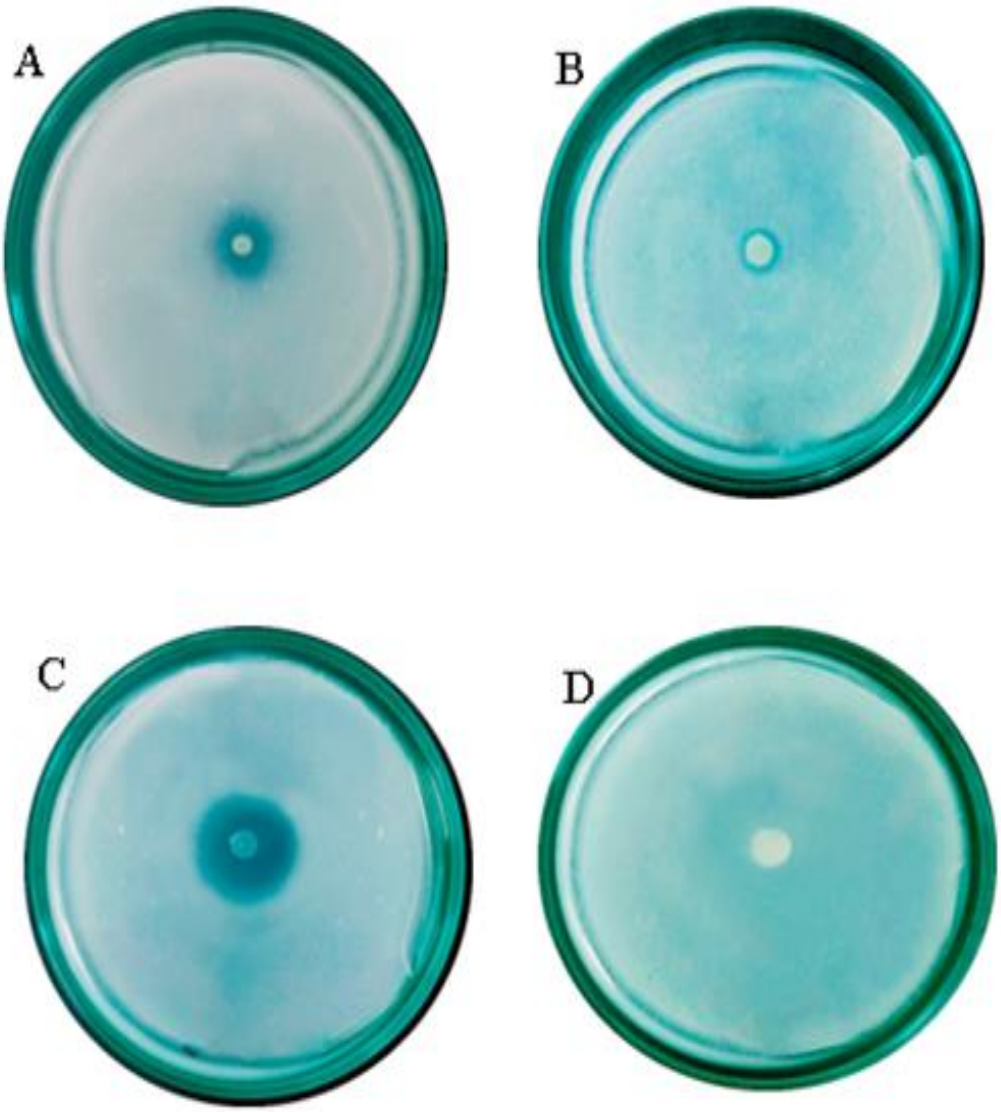

Figura 7. Solubilización de fosfato de: Laguna de oxidación, A) C1-G (1), B) Y1-E, C) Y1-G*(1); relave minero, D) S1-1

Figura 8. Identificación de cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica, mediante la aplicación del programa MALDI-TOF.

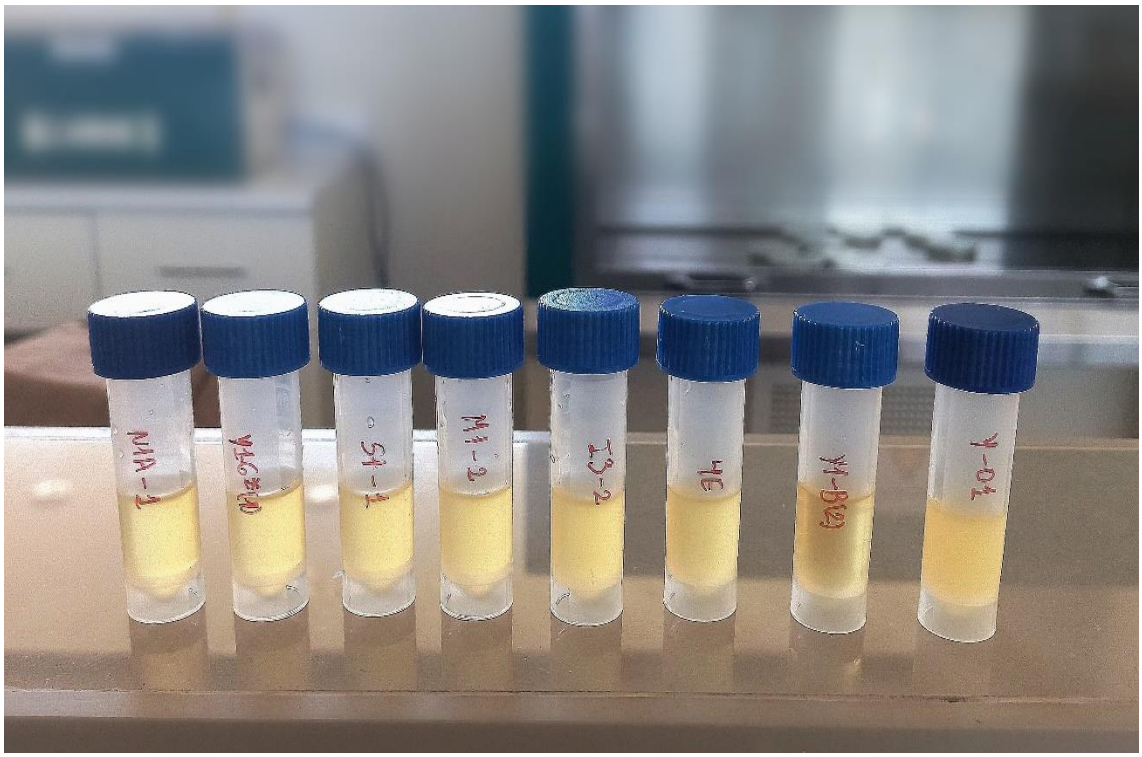

Figura 9. Reactivación de las cepas en caldo BHI aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Figura 10. Determinación de la concentración celular en el Nefelómetro Thermo Scientific equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland.

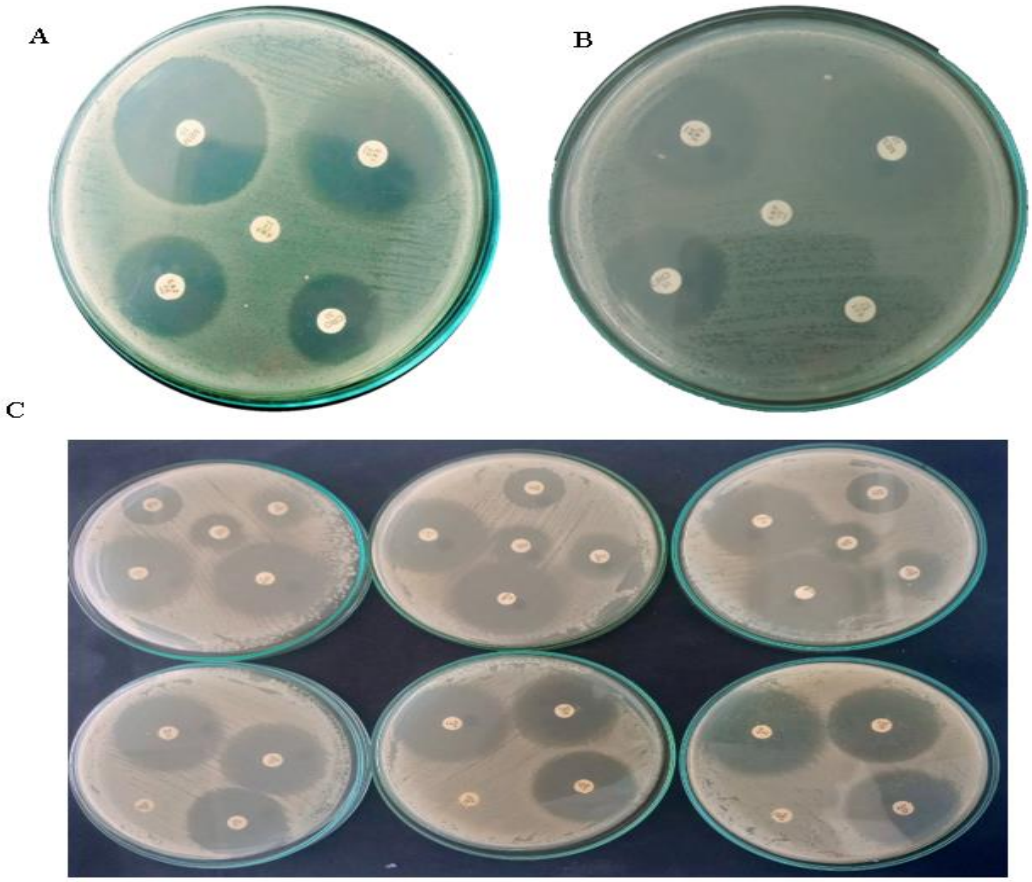

Figura 11. Sensibilidad antimicrobiana de cepas procedentes de: lagunas de oxidación A) N1A-1, B) Y1-A; relave minero, C) S1-1

Procedimiento de las pruebas bioquímicas (76):

- Agar Hierro con triple azúcar (TSI): De un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica en recta, se sembró en el medio por picadura en el fondo y por estría en la superficie inclinada del medio. Llevándose a incubación a 30 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretaron los resultados:

  Superficie alcalina/profundidad ácida (K/A): La bacteria solamente fermenta la glucosa.

  Superficie ácida/profundidad ácida (A/A): La bacteria fermenta la glucosa, lactosa y/o sacarosa.

  Superficie alcalina/profundidad alcalina (K/K): La bacteria no puede fermentar los azucares.

  La presencia de burbujas en el medio de cultivo indica la presencia de gas.

  El ennegrecimiento del medio de cultivo indica la producción de ácido sulfhídrico.

- Agar Lisina y Hierro: De un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta, se sembró en el medio por picadura en el fondo y por estría en la superficie inclinada del medio. Llevándose a incubación a 30 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretaron los resultados:

  Resultado positivo: Superficie alcalina /profundidad alcalina (superficie violeta / fondo violeta).

  Resultado negativo: Superficie alcalina /profundidad ácida (superficie violeta / fondo amarillo).

- Producción de urea: De un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta, sembrar por estría en la superficie inclinada, incubando a 30 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretaron los resultados:

  Resultado positivo: Cambio en el medio a color rosado.

  Resultado negativo: No cambia de color el medio.

- Producción de Indol: De un medio de cultivo, se inocula en el medio Indol la cepa con ayuda de un asa bacteriológica, incubando a 30 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se añaden 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs. Se interpretan los resultados:

  Resultado positivo: el color del reactivo cambia a rojo en el medio de cultivo.

  Resultado negativo: el color del reactivo mantiene un color incoloro.

- Producción de la enzima β – galactosidasa: De un cultivo puro, utilizar un asa bacteriológica e inocular a un tubo de ensayo que contenga 0.5 mL de solución salina

estéril al 0.85%, posteriormente agregar un disco de ONPG a la suspensión, incubar a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretan los resultados:

Resultado positivo: cambio de color a amarillo.

Resultado negativo: no se observa cambio de color.

- Agar citrato de Simmons: De un cultivo, con la ayuda de un asa bacteriológica recta, sembrar por estría en la superficie inclinada, incubando a 30 °C por 24 h a 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretaron los resultados:

  Resultado positivo: Cambio de color del medio a azul.

  Resultado negativo: No cambia de color el medio.

- Presencia de la enzima citocromo-c-oxidasa: Añadir 1 o 2 gotas de reactivo a una parte del papel filtro y esperar a que el reactivo se distribuya homogéneamente, posteriormente usando un palillo de madera y retirar una colonia, frotando el inoculo en el área del papel filtro que tiene el reactivo. Luego de unos 30 segundos se interpretan los resultados:

  Resultado positivo: Presencia de un color azul intenso.

  Resultado negativo: Ausencia de un color azul intenso.

- Actividad de la enzima catalasa: Colocar una gota de peróxido de hidrógeno sobre una lámina portaobjetos, con ayuda de un palillo de madera colocar una colonia no mayor a 24 h y suspender, luego de 30 segundos interpretar resultados:

  Resultado positivo: Se evidencia formación de burbujas.

  Resultado negativo: No se evidencia formación de burbujas.

- Producción de la enzima amilasa: De un cultivo, con la ayuda de un asa bacteriológica, sembrar por estría en el medio, incubando por 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación, agregar a la solución lugol e interpretar los resultados.

  Resultado positivo: Presenta un halo claro alrededor de la colonia.

  Resultado negativo: Color azul del medio, no hubo hidrolisis.

- Reducción de nitratos a nitritos: Con ayuda de un asa estéril transferir una colonia en el medio de reducción de nitratos a nitritos, incubar por 24 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, añadir dos gotas de solución A y dos gotas de solución B del reactivo de Griess y homogenizar, luego interpretar los resultados.

  Resultado positivo: El medio presenta un color rojizo.

  Resultado negativo: El medio no cambia de color.

- Prueba de gelatinasa: De un cultivo, inocular con un asa estéril recta e incubar por 7 días a 30 °C.

  Resultado positivo: El medio de cultivo cambia a estado a líquido.

  Resultado negativo: Medio de cultivo se mantiene sólido.

- Producción de hemolisina: De un cultivo, sembrar por estría en el medio, incubar por 24 h a 30 °C e interpretar los resultados:

  Alfa hemolisis: halo color verdoso alrededor de la colonia.

  Beta hemolisis: halo color brillante alrededor de la colonia.

  Gamma hemolisis: no presenta modificación de color de la colonia.

- Prueba de motilidad: De un cultivo puro de 24 h sembrar con un asa bacteriológica recta, ingresar el asa las ¾ partes del medio de cultivo, asegurándonos de retirar el asa bacteriológica por el mismo punto donde ingresó, incubar por 24 h a 30 °C e interpretar resultados:

  Resultado positivo: crecimiento difuso que se extiende por todo el medio.

  Resultado negativo: crecimiento se limita, presenta márgenes bien definidos.

Tabla 11. Tabla comparativa de medición de halos de sensibilidad antimicrobiana a distintos antibióticos.

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

Tabla 12. Lectura de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de ambientes acuáticos de la región Ica.

Cepa	Antibiótico (µg)																											
	Ampicilina (10)			Cefazolina (30)			Cefoxitina (30)			Ceftriaxona (30)			Ceftazidima (30)			Gentamicina (10)			Trimetoprima Y Sulfametoxazol (25)			Meropenem (20)			Ciprofloxacino (5)		
	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A	X (mm)	DS (±)	A
C1G-1	6	0	R	6	0	R	6	0	R	19	1.2	I	24	1.2	S	22	1.2	S	6	0	R	24	1.2	S	33	0	S
I3-2	6	0	R	13	1.5	R	6	0	R	34	1.2	S	30	1.5	S	20	0.6	S	34	0.6	S	33	1.2	S	35	1.5	S
I4-2	27	0.3	S	30	0.5	S	27	0.3	S	31	0.4	S	28	0.5	S	29	0.2	S	30	0.4	S	31	0.4	S	33	0.3	S
M1A-2	14	0.6	I	26	0.6	S	28	0.6	S	36	0.6	S	34	0.6	S	21	0.6	S	31	1.2	S	35	1	S	26	1.2	S
M1C-3	20	2.1	S	21	1	S	28	1.5	S	40	1	S	33	1	S	23	0.6	S	6	0	R	33	2	S	28	1	S
N1A-1	6	0	R	6	0	R	6	0	R	21	1	S	23	0.6	S	9	0.6	R	26	1	S	34	0.6	S	19	0.6	I
S1-1	14	1.5	I	17	0.6	I	6	0	R	32	2.1	S	32	1	S	20	0.6	S	32	2.3	S	34	0.6	S	38	2.5	S
Y-01	28	1	S	34	1	S	31	0.6	S	41	1	S	38	2	S	24	0.6	S	35	1	S	38	1	S	30	1	S
Y1-A	6	0	R	6	0	R	6	0	R	23	1.5	S	29	1.5	S	10	1	R	6	0	R	30	3.1	S	13	1	R
Y1-B2	6	0	R	6	0	R	6	0	R	23	0.6	S	27	0.6	S	20	2.1	S	6	0	R	21	2.6	S	32	1.2	S
Y1-E	6	0	R	6	0	R	6	0	R	22	1.5	S	24	1	S	20	0.6	S	6	0	R	19	2	S	34	1	S
Y1F	6	0	R	6	0	R	6	0	R	20	1.5	S	26	0.6	S	28	1.5	S	6	0	R	26	1.5	S	36	1	S
Y1G*1	6	0	R	19	0.6	S	17	1	I	37	1.5	S	34	1.5	S	31	1.5	S	24	1.5	S	36	1.5	S	20	1	I
E. coli ATCC 25922**	20	0.6	S	23	0.6	S	30	1.7	S	33	1	S	29	1.5	S	23	0.6	S	26	1	S	34	1	S	36	0.6	S

X: Promedio de tres ensayos independientes, DS: Desviación Estándar A: Análisis de Resistencia, **: Cepa control