

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**RESISTENCIA A METALES PESADOS Y
ANTIBIÓTICOS DE *Pseudomonas spp.* AISLADAS DE
LOS RIOS SALADO Y CAÑPIA, ESPINAR-CUSCO**

**TESIS PRESENTADA POR:
BACH. CINTIA DUEÑAS PACHECO
BACH. FRIDA QUISPE APAZA**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO**

**ASESORA:
DRA. DARIELA I. FLORES CALDERÓN**

**CO – ASESORA:
M. CS. HELDY Y. ESPINOZA CARRASCO**

Tesis Auspiciada por el Consejo de Investigación - UNSAAC

**CUSCO – PERU
2011**

AGRADECIMIENTO

Nuestro sincero agradecimiento a la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus conocimientos y enseñanzas impartidas a lo largo de nuestra carrera profesional.

Nuestro mas profundo reconocimiento a nuestras asesoras, Dra. Dariela I. Flores Calderon y M. Cs. Hedy Y. Espinoza Carrasco, por su constante orientación, estímulo, amistad y sobretodo asesoramiento en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Nuestro agradecimiento a la Blga. Soledad Santibáñez, por su apoyo y disponibilidad de tiempo brindado durante el trabajo experimental en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Adolfo Guevara Velasco - ESSALUD - Cusco.

A nuestros amigos de siempre, principalmente a nuestros amigos del laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos, por su constante apoyo y quienes nos acompañaron durante gratos y sobretodo difíciles momentos en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación, en especial a nuestra co-co-asesora.

A nuestros compañeros de la facultad de Ciencias Biológicas quienes nos animaron a seguir siempre adelante.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi refugio y mi fuerza.

A mis queridos padres CÉSAR y FRIDA, quienes con amor, comprensión y paciencia hicieron posible la culminación de mi carrera.

A mis hermanos JONH y MAYWA, por su cariño y apoyo incondicional que me brindaron.

A mis gorditos DIEGO y YAIR, que con sus ocurrencias alegraron este largo camino.

A mis amigos por su amistad, el constante apoyo y por compartir mis logros.

CINTIA

A Dios por ser mi amparo y fortaleza de vida.

A mis padres EUSEBIO Y CEFERINA, eterna gratitud, por su comprensión y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A mis queridos hermanos, SILVIA, DAIVIS, MARLENY por sus consejos.

A mis queridos sobrinos DAVID Y ANGHELY, por sus sonrisas inocentes que trajeron alegría a mi vida.

A mis tíos JUAN Y RUTH, quienes me brindaron sabios consejos y apoyo incondicional.

A mis queridos amigos por el apoyo brindado.

FRIDA

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes	10
1.2 Marco Conceptual	12
1.2.1 <i>Pseudomonas spp.</i>	12
1.2.1.1 Características Morfológicas y Habitad.	12
1.2.1.2 Nutrición y Condiciones de Crecimiento.	14
1.2.1.3 Estructura Antigénica.	15
1.2.1.4 Variabilidad Genética.	16
1.2.1.5 Factores de Virulencia.	18
1.2.1.6 Epidemiología.	21
1.2.1.7 Posición Taxonómica.	23
1.2.1.8 Susceptibilidad a los Antibióticos.	29
1.2.1.9 Sensibilidad a Metales y Metaloides.	34
1.2.2 El Agua	36
1.2.2.1 Calidad y Usos del Agua.	37
1.2.2.2 Contaminación del Agua	39
1.2.2.3 Interacción Metal – Bacteria	47
1.2.3 Actividad Minera	51
1.2.3.1 Efectos Sobre el Río Salado y Cañipia	51
1.2.3.2 Metales Pesados en los Rio Salado y Cañipia	54

CAPITULO II

AMBITO DE ESTUDIO	55
2.1 Ubicación Política	55
2.2 Ubicación Geográfica	55
2.3 Accesibilidad	55
2.4 Ecología	57
2.5 Población y Demografía.	61
2.5.1 Características Socio-Económicas de la población.	61
2.5.2 Saneamiento Básico.	61

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS	62
3.1 Materiales	62
3.1.1 Material Biológico.	62
3.1.2 Materiales Para el Diagnostico.	62
3.1.3 Aparatos y Equipos.	63
3.1.4 Material de Vidrio.	63
3.1.5 Otros Materiales.	64
3.2 Metodología	64
3.2.1 Ubicación de los Puntos de Muestreo de los Ríos Salado y Cañipia – Espinar.	64
3.2.2 Recolección de Muestras del Rio Salado y Cañipia.	66
3.2.3 Determinación pH, Temperatura, Oxigeno Disuelto	66
3.2.4 Determinación de la Calidad Bacteriológica	66
3.2.5 Aislamiento de Cepas de <i>Pseudomonas spp.</i>	68
3.2.5.1 Identificación de las Cepas Aisladas de <i>Pseudomonas spp.</i>	68
3.2.5.2 Determinación de los Niveles de Resistencia a Metales Pesados y Metaloides	70
3.2.5.3 Determinación de los Niveles de Resistencia a Antimicrobianos	72
3.3 Tratamiento Estadístico.	74

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1 Parámetros físico-químicos del Rio Salado y Rio Cañipia	75
4.2 Recuentos Bacterianos	76
4.3 Identificación de las cepas de <i>Pseudomonas spp.</i>	77
4.4 Determinación de las CMI frente a Metales Pesados.	79
4.5 Determinación de las CMI frente a Antibióticos.	93
CONCLUSIONES	109
SUGERENCIAS	110
LITERATURA CITADA	111
ANEXOS	119

RESUMEN

El género *Pseudomonas* está ampliamente difundido en el ambiente, pero pueden llegar a colonizar al hombre causándole infecciones, en cuanto a la resistencia frente a antibióticos, este precedente lo ha constituido en uno de los patógenos más importantes de las infecciones nosocomiales. La importancia de *Pseudomonas* fue mayor cuando se comprobó su capacidad de inhibir los coliformes, siendo los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, corriéndose un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero, los cuales podrían estar inhibidos por *Pseudomonas*. (Marchand E., 2002).

El objetivo de este trabajo es determinar la calidad bacteriológica del agua de los ríos Salado y Cañipia de la Provincia de Espinar, según los Estándares de Calidad Ambiental para agua (ECAs), asimismo los niveles de resistencia (Concentración Mínima Inhibitoria), a metales pesados y antibióticos que presentan cepas de *Pseudomonas spp.* aisladas de los ríos, utilizando la metodología establecida por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006).

En el estudio se aislaron 35 cepas de *Pseudomonas*, reportándose 4 especies: *Pseudomonas fluorescens* (45,7%), *P. aeruginosa* (25,7%), *P. putida* (17,1%) *P. stutzeri* (11,5%).

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias más frecuentes para metales pesados, mostradas por las cepas de *Pseudomonas* fueron: Pb 3200 µg/ml; As, Cu, Fe, Zn y Mn, 1600 µg/ml; Cr 800 µg/ml; Cd 100 µg/ml y Hg 40 µg/ml.

Un gran número de cepas exhibieron alta resistencia a los antimicrobianos, que va desde una CMI de 0,25 a 1024 µg/ml., en las diferentes cepas aisladas, cuyo resultado muestra que el 100 % de las cepas estudiadas son resistentes a Ciprofloxacino y Tetraciclina, seguido de Ceftazidime con 94,3%, Gentamicina con 88,6%, Levofloxacino con 85,7% y en menor porcentaje para Amikacina con 28,6%.

Lo que sugiere que los altos niveles de resistencia es probablemente consecuencia de disposición de aguas servidas domésticas no tratadas, desechos de actividades mineras y agropecuarias que influyen en la calidad del agua de los ríos Salado y Cañipia.

INTRODUCCION

El agua es un sistema ecológico en equilibrio que presenta numerosas propiedades físicas, químicas y biológicas estrechamente relacionadas, constituyendo la base de todas las comunidades vivas o habitadas. Sin embargo estos sistemas por el desarrollo de las actividades humanas y climáticas pueden sufrir algún deterioro. (Lodish H y col., 2002). En la provincia de Espinar se encuentran los ríos Salado y Cañipia que han sido afectados por las actividades urbanas, agropecuarias (que se desarrollan a lo largo de sus recorridos), e industriales como la minería debido a que son los principales receptores de las aguas provenientes del área de la mina Tintaya. (Golder Associates Perú S.A., 2010)

Pseudomonas son microorganismos de amplia distribución mundial, se encuentran en suelos, raíces de plantas y son miembros transitorios de la flora normal del hombre y de animales, además de ello, es una de las principales causas de infecciones en el humano, las cuales son muy difíciles de erradicar ya que este microorganismo presenta una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos. (Garrity G. y col., 2004; Ruiz L. 2007).

Estos microorganismos tienen predilección por hábitats acuáticos y forma parte de la microbiota autóctona en el ambiente acuático, que constituyen la base de su cadena alimenticia. Por ello la descarga de efluentes líquidos que contienen contaminantes tóxicos afectan principalmente a los microorganismos entre ellos *Pseudomonas*. (D. Vicente A. y col., 1990).

La contaminación del agua por metales pesados, sean estos de origen natural o antropogénico, y la constante exposición de estos sobre *Pseudomonas spp.*, produce la selección de aquellos genotipos bacterianos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver S. y col., 1992), la cual producirá la expresión de mecanismos de resistencia hacia el contaminante como parte de su adaptación al medio. (Montuelle B. y col., 1994).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo de investigación está referido a conocer los niveles de resistencia a metales pesados y antibióticos que presentan cepas de *Pseudomonas spp.* aisladas de los ríos Salado y Cañipia de la provincia de Espinar, mediante el método establecido por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006), asimismo evaluar las condiciones del agua de los mismos ríos, en base a determinaciones bacteriológicas, según la Ley N° 29338 “**Ley de Recursos Hídricos**” (2009), siguiendo la técnica del Número Más Probable (NMP) (APHA, 2005).

JUSTIFICACIÓN

La contaminación de las fuentes de aguas sea por metales pesados u otros factores se ha incrementado, producto del desarrollo de las ciudades, por cuanto los ríos sirven como punto de disposición final para las evacuaciones de las aguas residuales, propias de los pueblos en proceso de desarrollo y actividades como la minería, agricultura, etc.

La flora microbiana acuática, es capaz de incorporar pequeñas concentraciones de metales pesados requeridos como elementos traza para el normal funcionamiento celular, sin embargo cuando estas se encuentran en concentraciones que excedan sus bajos valores fisiológicos, son tóxicos para la mayoría de los microorganismos. El aumento de metales puede eliminar cepas bacterianas, pero también puede seleccionar cepas resistentes. (D. Vicente A. y col., 1990).

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. En general, crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de substratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos. Asimismo son frecuentemente resistentes a antibióticos, actualmente ha sido reconocido como un importante patógeno nosocomial que se encuentran causando infecciones en cáncer, transplantes, quemados y pacientes con fibrosis quística causando septicemias. (Ruiz L., 2007).

Diversos estudios para determinar el efecto sobre la flora bacteriana, se ha realizado en ecosistemas impactados por estos contaminantes, observándose que la resistencia bacteriana a metales suele estar asociada con la resistencia a antibióticos (Moraga R. y col., 2003).

Por ello el presente trabajo se justifica, al investigar la resistencia que presenta las cepas de ***Pseudomonas spp.*** frente a los metales pesados tales como Hg, Cu, Pb, Cr, As, Cd, Fe, Mn, y Zn presente en las aguas de los Ríos Salado y Cañipia, del Distrito de Espinar y su resistencia frente a antimicrobianos .

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los niveles de resistencia a metales pesados y antibióticos de *Pseudomonas spp.* aisladas de los ríos Salado y Cañipia – Espinar – Cusco.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la Calidad Bacteriológica de los cuerpos de agua de los ríos Salado y Cañipia, de acuerdo a la Ley N° 29338 “**Ley de Recursos Hídricos**” (2009).
2. Aislar e identificar bacterias del género *Pseudomonas* y conocer la ocurrencia de *Pseudomonas spp.* en los ríos Salado y Cañipia.
3. Tipificar las cepas aisladas de *Pseudomonas spp.* y determinar su prevalencia en los ríos Salado y Cañipia.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de metales pesados y antibióticos para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas spp. in vitro*.

HIPÓTESIS:

Las especies de *Pseudomonas spp.* aisladas del agua de los ríos Salado y Cañipia de la provincia de Espinar – Cusco, exhiben una elevada resistencia a metales pesados y antibióticos, en los sectores aledaños donde se desarrollan actividades domésticas y minera.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES:

- **Márques A. y col., 1979 (España)** Evaluaron la resistencia a antibióticos y metales pesados de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de suelos de áreas rurales, industriales y urbanas de Catalunya. Se tomó un total de 205 muestras de suelo. El test de sensibilidad fue hecho por el método de disco difusión en agar y determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los metales Ag, As, Cd, Hg, Pb, U, Te, Mo, TI, Zn, W y Cr, obteniendo como resultado que todas las cepas aisladas presentan resistencia frente a Ampicilina, Cefalotina, Cloranfenicol, Acido Nalidixico, Streptomycin, Kanamicina y Gentamicina. En el estudio de sensibilidad a metales pesados obtuvieron que todas cepas aisladas son resistentes a Cd, Pb, Mo y U.
- **D. Vicente A. y col., 1990 (España)** Determinaron patrones de resistencia de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de agua dulce y salada a diferentes agentes antimicrobianos y metales pesados. Todas las cepas fueron resistentes a la ampicilina y la tetraciclina, pero sensibles a Carbenicilina, Gentamicina, Tobramicina y Colistina, y a las concentraciones ensayadas de plata, cadmio, plomo y molibdeno. La resistencia a la Gentamicina, la Sulfadiazina, el mercurio, el arsénico y el cromo fue variable, por lo que se consideró su uso como marcadores epidemiológicos. Concluyeron que existe una estrecha relación entre el grado de contaminación y la frecuencia de cepas resistentes a metales pesados.
- **Silva J. y col., 1999 (Chile).** Estudiaron 157 cepas bacterianas de origen entérico (*Escherichia coli*) y marino (*Pseudomonas sp.*) de la bahía de San Jorge. Las cepas bacterianas de origen marino fueron más resistentes que las bacterias entéricas y presentaban niveles de resistencia elevados a los metales. Asimismo encontraron que existe una

estrecha relación entre el grado de polución metálica del ambiente acuático marino y la presencia de bacterias resistentes a los metales pesados, cuyas CMI son mas elevadas.

- **Malik A. y col., 2002 (India).** Evaluaron la resistencia de metales pesados en *Pseudomonas spp.*, aislados de suelos tratados con aguas residuales industriales de la ciudad de Aligarh y determinaron CMI de Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} y Zn^{2+} , por cada aislamiento (45 cepas). El 80% de las cepas aisladas muestran resistencia al cobre, mientras que el 73,3% al cadmio, el 71,1% a cromo y zinc y el 48,8% a mercurio. Se observó una CMI máxima de 200 $\mu g/ml$ de mercurio y 1600 $\mu g/ml$ para los demás metales.
- **Moraga R. y col., 2003 (Chile).** Determinaron la resistencia a metales pesados (Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr y Cd), así como la susceptibilidad a diferentes antibióticos en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Todas las cepas analizadas fueron bacterias Gramnegativas no fermentadoras, principalmente de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. Se encontraron niveles variables de resistencia a los metales pesados lo que evidenció una relación entre la resistencia a los metales pesados y la resistencia a los antibióticos ensayados.
- **Espinoza H., 2006 (Chile).** Determinó niveles de resistencia a metales pesados y antibióticos en *Aeromonas spp.* presentes en el Rio Loa, parámetros físico-químicos y la concentración de metales pesados por espectrofotometría de absorción atómica. Realizó recuentos de bacterias heterótroficas, coliformes y *Aeromonas spp.* Tipificándose esta ultima mediante el sistema Phene plate (Ph-AE); concluyendo que la mayor resistencia fue observada frente a ampicilina (77%) y que la incidencia de resistencia a metales pesados fueron elevadas. Un alto porcentaje de cepas de *Aeromonas* presentaron CMI para Pb y As de 3200Ug. Para Cu, la CMI vario entre 200 – 1600 ug/ml; no encontrándose relación entre la resistencia a antibióticos y metales.

1.2 MARCO CONCEPTUAL

1.2.1 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas literalmente significa «falsa unidad», derivado del griego *pseudo* = falso y *monas* = una sola unidad. El término «monada» se usaba en la microbiología antigua para nombrar a los organismos unicelulares. (Garrity G. y col., 2004).

Pseudomonas fue observada en los inicios históricos de la microbiología. Debido a que eran aisladas de un variado número de nichos ecológicos, de modo que un gran número de especies recibían el nombre del género. El nombre genérico *Pseudomonas* creado para estos organismos, estaba definido en términos relativamente vagos en 1894, como el género de bacteria Gram negativa, bacilos con flagelo polar. Nuevas metodologías y la aparición de estudios basados en las macromoléculas conservadas entre los diversos organismos, han reclasificado a muchas especies. (Cornelis P., 2008).

En el año 2000, se determinó el genoma completo de una especie de *Pseudomonas* y más recientemente se han determinado las secuencias de otras especies, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1 (2000), *Pseudomonas putida* KT2440 (2002), *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (2005), *Pseudomonas syringae* pathovar tomato DC3000 (2003), *P. syringae* pathovar syringae B728a (2005), *P. syringae* pathovar phaseolica 1448A (2005), *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 y *Pseudomonas entomophila* L48. (Cornelis P., 2008).

1.2.1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y HABITAD

Pseudomonas spp. es una bacteria Gram negativa perteneciente al Phylum de las Proteobacterias, al mismo que pertenecen las enterobacterias. Es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, con una anchura de 0,5 – 1 μm y una longitud de 1.5 – 5.0 μm . (Garrity G. y col., 2004).

Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen, son catalasa positivos y no forman esporas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que

facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas que los protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o del complemento aumentando así su patogenicidad (Madigan y col., 2005). Algunas *Pseudomonas* adquieren un aspecto mucoso como consecuencia de la abundancia de polisacáridos capsulares; estas cepas son especialmente frecuentes en los pacientes con fibrosis quística. (Murray P. y col., 2006).

El género *Pseudomonas* se encuentran ampliamente distribuido en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas limpias y contaminadas, así como de plantas y animales (D'Argenio D. y col., 2002). Además, se halla en el ambiente hospitalario, en ambientes húmedos, como la comida, las flores de los jarrones, los lavaderos, los baños, las fregonas, los respiradores y los equipos de diálisis, e incluso las soluciones desinfectantes. Es infrecuente que forme parte de forma persistente de la flora microbiana normal del ser humano, excepto en los pacientes hospitalizados y en los pacientes ambulatorios inmunodeprimidos (Murray P. y col., 2006). Todas las cepas son patógenos oportunistas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas, como *Arabidopsis thaliana*, a invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y a insectos como *Drosophila melanogaster*. *Pseudomonas* es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. (D'Argenio D. y col., 2002).

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizados por otros microorganismos. (Matthijs S. y col., 2007).

Otras características que tienden a ser asociadas con las especies de *Pseudomonas* con algunas excepciones, incluye la secreción de pioverdina

(fluorescein), un sideróforo fluorescente de color amarillo verdoso, (Meyer J. y col., 2002) bajo condiciones limitadas de hierro. Algunas especies pueden producir otros sideróforos, tales como la piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* (Lau G. y col., 2004) y tioquinolobactina por *Pseudomonas fluorescens* (Matthijs S. y col., 2007).

1.2.1.2 NUTRICIÓN Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Estos microorganismos no son fermentadores y utilizan los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno actúa como aceptor terminal de electrones. Aunque se definen como aerobios estrictos, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptor terminal de electrones. La presencia de citocromo oxidasa en las especies de *Pseudomonas* se utiliza para distinguirlas de las enterobacterias. (Garrity G. y col., 2004).

Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *P. putida*. El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros. (Matthijs S. y col., 2007).

Las cepas de *Pseudomonas* pueden crecer en un medio con condiciones mínimas, medio químicamente definido con iones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno y el carbono orgánico como fuente de energía. Algunas de las especies de *Pseudomonas* tienen ciertas necesidades de crecimiento, pero ninguna de las especies pertenecientes a los rRNA grupo I tiene una dependencia absoluta de estos suplementos nutricionales. En los medios de composición mínima, cepas de fitopatógenos como *P. syringae* crecen muy lentamente en comparación con cepas de principales especies de saprofitas, y que el crecimiento se ve reforzada por la adición de pequeñas cantidades de compuestos orgánicos (extracto de levadura, peptonas). Sin embargo, la

mayoría de casos no depende de ciertos factores orgánicos de crecimiento. (Garrity G. y col., 2004).

La temperatura óptima de crecimiento para el desarrollo de la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* es aproximadamente 28 °C. Algunas especies crecen a un ritmo considerable en 4 °C y por lo tanto se puede considerar psicrótrofos. Para otros, la temperatura máxima es de unos 45°C, y por lo tanto son verdaderamente termófilos. Ninguno de los miembros del género tolera condiciones ácidas y el crecimiento es negativo a pH \leq 4,5. (Garrity G. y col., 2004).

La capacidad de crecer en medios minerales muy simples, a expensas de muchos compuestos orgánicos ha servido como base para la caracterización más amplia de nutrición de un gran número de cepas, proporcionando una masa de datos fenotípicos ideal para estudios taxonómicos, métodos numéricos. Aparte de su taxonomía las investigaciones nutricionales sobre la utilización de ciertos grupos de compuestos han servido como base para muchos estudios interesantes sobre las vías metabólicas, sus mecanismos de regulación, y su importancia filogenética. (Garrity G. y col., 2004).

1.2.1.3 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Pseudomonas spp. posee antígenos somáticos O (Salasar y col., 2007), flagelares H (Esnard y col., 1997) y mucoide M. Tiene fimbrias y pili (tipo IV) que se extienden desde la pared celular y permiten la fijación a células epiteliales del hospedero. (Martínez A. y col., 2001).

Los anticuerpos generados contra los antígenos O, H y la presencia del pili permiten tipificar las cepas con fines epidemiológicos.

El antígeno O esta dado por el LPS, el cual esta formado por el lípido A (muy tóxico, que comprende la endotoxina), un centro constituido por polisacáridos y por las cadenas laterales largas de oligosacaridos O (específicos del grupo) que es la parte mas externa del LPS y permite seroagruparlas. (Martínez A. y col., 2001).

Las cepas de ***Pseudomonas aeruginosa*** con diferencia en el AgO son productoras de alginato, el cual es un exopolisacárido, cuya biosíntesis esta

cromosómicamente regulada y enmarcada en tres locus distintos. Dichos genes están presentes en cepas no mucoides y se expresan desde el punto de vista fenotípico bajo determinadas condiciones como la deshidratación, cambios inflamatorios, limitantes en la temperatura, disminución del pH y cambios osmóticos como: disminución en la concentración de los fosfatos, aumento en la concentración de NaCl, MgCl₂, Ca²⁺, Mg²⁺, glicerol o sacarosa, lo que equivale a la disminución de las cadenas largas o específicas del LPS, trayendo consigo que las cepas se transformen en poliaglutinantes o no tipables. (Martínez A. y col., 2001).

1.2.1.4 VARIABILIDAD GENÉTICA

Existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria, aun aislada en la misma región, encontrándose una alta frecuencia de rearrreglos génicos. Esta variabilidad tiene características muy particulares, como a continuación veremos. El tamaño del genoma de distintas cepas de *Pseudomonas* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases, y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de DNA de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoria que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de DNA se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb. La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *pilA* que codifica para el pili tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas de *Pseudomonas* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas, comparada con la relativamente menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie. (Römling U. y col., 1997).

De este modo, *Pseudomonas* tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor, pero significativa, que es distinta en cada clona de esta bacteria. (Römling U. y col., 1997).

o Plásmidos

Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Esta característica generalmente está codificada en plásmidos, llamados catabólicos, que casi siempre se encuentran en cepas de *P. putida* y rara vez en *P. aeruginosa*. (Nelson, K. y col. 2002).

En el caso de esta última bacteria su enorme versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades novedosas. Los plásmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican para resistencias a antibióticos o a metales, y su extensa distribución representa un problema clínico. (Evans K. y col., 1998).

Es interesante mencionar que si bien son frecuentes los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados entre los aislamientos de *Pseudomonas*, no lo son tanto como para considerar que estos elementos genéticos formen parte de su genoma. Por otra parte, no existen datos que sugieran que los plásmidos tengan un papel en la alta tasa de recombinación que presenta esta bacteria. (Evans K. y col., 1998).

Algunos plásmidos originalmente aislados de cepas de *P. aeruginosa* fueron importantes para la construcción del mapa genético de esta bacteria. Además, ya que estos plásmidos pueden replicarse en distintos fondos genéticos, han sido utilizados en el estudio genético de distintas proteobacterias, diferentes a las enterobacterias. También tienen importancia dentro de la ingeniería genética pues a partir de ellos se han construido múltiples vectores de clonación capaces de replicarse en diversas bacterias (Römling U. y col., 1997).

1.2.1.5 FACTORES DE VIRULENCIA:

Pseudomonas, tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas; sin embargo, es difícil definir el papel que cada factor desempeña en la enfermedad, y la mayoría de los expertos en este campo cree que su virulencia es multifactorial. (Murray P. y col., 2006).

- **Flagelos:** Permiten la motilidad y son inmunogénicos. (Martínez A. y col., 2001).
- **Adhesinas y Pili:** La adherencia de *P. aeruginosa* a las células del organismo anfitrión está mediada por los pili y por adhesinas de estructura diferente a la de estos. Los pili desempeñan una importante función en la unión a las células epiteliales, y tienen una estructura semejante a la de los pili característicos de *Neisseria gonorrhoeae*. *P. aeruginosa* produce también neuraminidasa, que elimina los residuos de ácido siálico del receptor de los pili, aumentando así la adherencia de las bacterias a las células epiteliales. (Murray P. y col., 2006).
- **Cápsula de polisacáridos:** *Pseudomonas* sintetiza una cápsula de polisacáridos (conocida también como exopolisacárido mucoide, cubierta de alginato o glucocálix) dotada de diversas funciones.. La cápsula protege también al microorganismo frente a la fagocitosis y la actividad de antibióticos como los aminoglucósidos. (Murray P. y col., 2006).
 - **Producción de alginato:** Permite la adherencia de la bacteria a la célula epitelial, interfiriendo en la actividad fagocítica de los neutrófilos. Induce respuestas inmunes y cambios inflamatorios. Inhibe la quimiotaxis y activación del complemento. Interviene en la opsonización y favorece la agregación de bacterias sobre las microcolonias mucoides (biofilms) (Martínez A. y col., 2001).
 - **Endotoxina:** La endotoxina es un antígeno fundamental de la pared celular de *Pseudomonas*, al igual que ocurre en el caso de otros bacilos Gram negativos. El lípido A, componente de la endotoxina,

participa en varios de los efectos biológicos de la septicemia. (Murray P. y col., 2006).

- **Piocianina y otros pigmentos fenazínicos:** Piocianina (pigmento azul sintetizado por *P. aeruginosa*), cataliza la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno, formas tóxicas del oxígeno. En presencia de pioquelina (un sideróforo que se une al hierro) se genera el radical hidroxilo de mayor toxicidad, el cual puede ocasionar daños tisulares. Este pigmento estimula también la liberación de interleucina-8 (IL-8), que incrementa la quimiotaxis de los neutrófilos. (Murray P. y col., 2006).

Inhiben la movilidad ciliar y la proliferación de linfocitos. Tienen actividad antibiótica. Realzan la liberación de interleucina I y del factor de necrosis tumoral. (Martínez A. y col., 2001).

- o **Exotoxina A:** Se cree que la exotoxina A (ETA) es uno de los factores de virulencia más importantes producidos por las cepas patógenas de *P. aeruginosa*. Esta toxina altera la síntesis de proteínas al inhibir la elongación de la cadena peptídica en las células eucariotas de un modo semejante a la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Sin embargo, las exotoxinas producidas por estos dos microorganismos son estructural e inmunológicamente diferentes, y la exotoxina A es menos potente que la toxina diftérica. La exotoxina A probablemente participe en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras, el daño corneal en las infecciones oculares y el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas. La toxina posee, igualmente, actividad inmunodepresora. (Murray P. y col., 2006).
- o **Estructura del lipopolisacárido:** El lipopolisacárido (LPS) es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. El LPS de *Pseudomonas* es un factor de virulencia, y a diferencia del de otras bacterias esta molécula presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B. La banda A es un polímero de D-ramnosa que producen la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, mientras que la banda B tiene una estructura variable y

determina el serotipo de las cepas. Esto ha sido usado para identificar y clasificar los distintos aislamientos de esta bacteria. (Rivera M. y col., 1988).

El LPS tiene actividad endotóxica: es inmunogénico, modula la función de los neutrófilos, obstaculiza la inducción de anticuerpos. Produce necrosis focal en el sitio de colonización. (Martínez A. y col., 2001).

- **Exoenzimas S y T:** Las exoenzimas S y T son toxinas extracelulares producidas por algunas especies de *Pseudomonas*, especialmente por *P. aeruginosa*. Poseen una actividad ribosiltransferasa de difosfato de adenosina (ADP), cuya función no está clara. Sin embargo, cuando las proteínas son introducidas en las células eucariotas diana por el sistema de secreción de tipo III, se produce un daño en las células epiteliales que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis. Esta citotoxicidad está mediada por una reorganización de la actina. (Murray P. y col., 2006).
- **Elastasas:** Dos enzimas, LasA (serina proteasa) y LasB (metaloproteasa de zinc), actúan de manera sinérgica para degradar la elastina, lo que ocasiona daños en los tejidos que contienen elastina y el parénquima pulmonar, así como lesiones hemorrágicas (ectima gangrenoso) que se asocian a las infecciones diseminadas por *P. aeruginosa*. Estas enzimas degradan también los componentes del complemento e inhiben la quimiotaxis y la función de los neutrófilos, lo que provoca una mayor diseminación y daño tisular en las infecciones agudas. Las infecciones crónicas por *Pseudomonas* se caracterizan por la formación de anticuerpos frente a LasA y LasB, con acumulación de los inmunocomplejos en los tejidos infectados. (Murray P. y col., 2006).
- **Proteasa alcalina:** Al igual que las elastasas, la proteasa alcalina participa en la destrucción tisular y en la diseminación de *P. aeruginosa*. También interfiere en la respuesta inmunitaria del organismo anfitrión. (Martínez A. y col., 2001).
- **Fosfolipasa C:** La fosfolipasa C es una hemolisina termolábil que degrada los lípidos y la lecitina, de modo que facilita la destrucción

tisular. No está claro el papel exacto de esta enzima en las infecciones respiratorias y urinarias (IAU), aunque se ha visto una importante asociación entre la producción de hemolisina y la enfermedad. (Murray P. y col., 2006).

- **Ramnolípido:** El ramnolípido es una hemolisina termoestable que altera los tejidos que contienen lecitina. Esta hemolisina se relaciona también con la inhibición de la actividad ciliar del aparato respiratorio. (Murray P. y col., 2006).
- **Slime:** Inhibe la fagocitosis por los polimorfonucleares. Es citotóxico para los leucocitos. (Martínez A. y col., 2001).
- **B-lactamasa:** Le confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos. (Martínez A. y col., 2001).

1.2.1.6 EPIDEMIOLOGÍA

Las *Pseudomonas* son patógenos oportunistas presentes en una gran variedad de ambientes. La capacidad para aislar a estos microorganismos de las superficies húmedas puede verse limitada solamente por los esfuerzos para detectar los microorganismos. *Pseudomonas* tienen unos requerimientos nutricionales mínimos, pueden tolerar un amplio intervalo de temperaturas (4°C–42°C) y son resistentes a muchos antibióticos y desinfectantes. (Murray P. y col., 2006).

Estos microorganismos resistentes pueden crecer en diversos ambientes y se detectan habitualmente en el suelo y el agua. La transmisión tiene lugar por ingestión de agua o hielo contaminados, o por el contacto con estos; por el aerosol de líquidos contaminados, por la penetración por objetos contaminados y por ingestión de alimentos contaminados por *Pseudomonas*. (Lebeque Y. y col., 2006).

P. aeruginosa es uno de los patógenos bacterianos nosocomiales más importantes del ser humano. Además, el aislamiento de *Pseudomonas* en un paciente hospitalizado constituye un motivo de preocupación, pero normalmente no justifica la intervención terapéutica, a no ser que existan indicios de enfermedad. La recuperación de *Pseudomonas*, particularmente

de especies diferentes a ***P. aeruginosa***, a partir de una muestra clínica puede representar una mera colonización del paciente o bien suponer una contaminación ambiental de la muestra durante su obtención o procesamiento en el laboratorio. (Murray P. y col., 2006).

En Europa es la segunda causa de neumonía nosocomial (20.9%) y la tercera de infección urinaria (7.3%). En Estados Unidos infecta a 4 de cada 1000 pacientes hospitalizados y representa el 10% de todas las infecciones hospitalarias en este país estos lo ubica entre los cuatro agentes más frecuentes de dichas infecciones. Este microorganismo es más colonizador que invasor y a veces no se puede apreciar la diferencia entre su rol como uno y otro. En Brasil es la causa más frecuente de infecciones de tracto respiratorio (32%) y la segunda de infecciones de vías urinarias (10%) (Lujan D. y col., 2008).

En el Perú se han realizado pocos estudios epidemiológicos de ***P. aeruginosa***. En 1989, J. Marín reportó, en un estudio de etiología de meningoencefalitis por bacterias Gram negativas que ***P. aeruginosa*** era la segunda causa con 31.7 %. En el 2003, estudió la epidemiología de infección intrahospitalaria por ***Pseudomonas aeruginosa*** en pacientes hospitalizados encontrando un 62.5% de pacientes positivos para este microorganismo. (Rojas A. y col., 2003).

1.2.1.7 POSICIÓN TAXONÓMICA

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Genero: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas aeruginosa*

P. agarici

P. alcaligenes

P. chlororaphis

P. fluorescens

P. putida

P. stutzeri

P. syringae

FUENTE: Garrity G. y col., 2004.

○ ***Pseudomonas aeruginosa*:**

P. aeruginosa; aerobio obligado, que crece con facilidad en los medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón, o de uvas. Se desarrolla a temperatura entre 10 y 42 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37°C. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas emiten pigmentos de fenazina en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37°C y posteriormente los mismos a temperatura ambiente pueden ser de color azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorrubina) y negro (piomelanina). Existe aproximadamente, un 10% de ***P. aeruginosa*** que son apigmentadas. (Martínez A. y col. 2001).

P. aeruginosa tiene dos formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza "nadando" mediante un único flagelo polar, mientras que sobre las superficies se mueve, independientemente de la presencia del flagelo, por un mecanismo llamado "twitching" que depende del pili tipo IV, estos dos tipos de desplazamiento están involucrados en la formación de biopelículas. La motilidad tipo "swarming" se realiza en medios semi-sólidos y representa

un movimiento concertado de las células en las que se vuelven alargadas y presentan múltiples flagelos. (Römling U. y col., 1997).

P. aeruginosa tiene importancia para el hombre, tanto porque le representa problemas, como también puede ser útil en el tratamiento de la contaminación ambiental. Contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con ***P. aeruginosa***, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas, lo que nos muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales. (Hardalo C. y col., 1997).

P. aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Una vez que se establece la infección, ***P. aeruginosa*** produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección de ***P. aeruginosa*** encontramos toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por ***P. aeruginosa***, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos (β -lactámicos) y a desinfectantes (Solución de Cloro, detergentes). (Hardalo C. y col. 1997; Garrity G. y col., 2004).

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula. La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres o válvulas cardíacas. Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosión

de conexiones y filtros. Asimismo, *P. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas. (Hardalo C. y col., 1997).

- ***Pseudomonas agarici***

Microorganismo móvil por uno o, raramente, dos flagelos polares. Pigmento difusible con fluorescencia verde bajo luz ultravioleta de longitud de onda corta.

Las reacciones oxidasa y catalasa son positivas, la reducción de nitratos, licuefacción de pectato, hidrólisis del almidón, la hidrólisis esculina, producción de levano y los requisitos del factor de crecimiento son negativas. Este microorganismo causa un tipo de enmalle pegajoso en la superficie de las setas, (Garrity G. y col., 2004).

- ***Pseudomonas alcaligenes***:

Los requerimientos nutricionales de la especie son muy estrechos, parecida a la de los organismos fluorescentes altamente mutantes. La reacción de la gelatina en ellos es negativa. Las cepas de esta especie pueden ser aisladas a partir de aguas de piscina. (Garrity G. y col., 2004).

- ***Pseudomonas chlororaphis***:

La producción de pigmento fluorescente está relacionado con el nombre de la especie en referencia porque presenta producción de pigmento verde clororafina una fenazina que a menudo se localiza alrededor de las colonias.

La temperatura óptima de crecimiento de *P. chlororaphis* es alrededor de 30 °C. Las primeras cepas de *P. chlororaphis* fueron aisladas de larvas muertas del abejorro (un escarabajo Europeo grande) y de diversas fuentes incluyendo el agua. (Garrity G. y col., 2004).

- ***Pseudomonas fluorescens***:

La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 30 °C, aunque puede crecer desde los 5 hasta los 42 °C aproximadamente. No crece bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4.5$) y necesita preferentemente pH neutro. Tiene

movimiento activo en líquido por sus flagelos polares (más de 1). Su pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta, aunque recién cultivada o después de varios cultivos de laboratorio, puede ser que no reaccione. (Garrity G. y col., 2004).

P. fluorescens puede crecer en un medio mineral con iones de amonio o nitrato y un solo compuesto orgánico que funciona como única fuente de carbono y energía. Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. (Yang C. y col., 1993).

Una de las características de ***Pseudomonas fluorescens*** es su alta capacidad de solubilización del fósforo y la realizan por dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico), que actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. La otra vía de acción es a través de las fosfatasas que son enzimas hidrolasas (Monoesterasas y Diesterasas Fosfóricas), que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica a la solución del suelo. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato para ser absorbido por las raíces de las plantas. (Garrity G. y col. 2004).

Otro aspecto destacable es la posibilidad de que ***P. fluorescens*** posea la virtud de producir sustancias estimuladoras del crecimiento, ya que *Pseudomonas* en general pertenecen a un grupo llamado "estimuladores del crecimiento vegetal (MECV)" que poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares. Las principales sustancias estimuladoras producidas son de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas, pero también producen sustancias de otro tipo como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento. Estos efectos se dan siempre que

sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica. (Yang C. y col., 1993).

Por último, una propiedad complementaria de *P. fluorescens* es la de producir ciertas sustancias: antibióticos y sideróforos, que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos fúngicos que pueden afectar al cultivo. (Yang C. y col., 1993; Garrity G. y col., 2004).

○ ***Pseudomonas putida*:**

Las características que presenta *P. putida* para ser diferenciada de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, incluyen: la incapacidad de licuefacción de la gelatina, la no producción de pigmento fenazina. En esta constelación de propiedades negativas, la incapacidad de hidrolizar la gelatina es la que clásicamente ha definido a *P. putida*.

La temperatura óptima de crecimiento es de 25 – 30 °C. Aislado del suelo y el agua después de su enriquecimiento en los medios de minerales con diferentes fuentes de carbono. La mayoría de las cepas han sido asignadas al serotipo A, que se considera normal. El serotipo B difiere del serotipo A, solo en unas pocas propiedades fenotípicas. Todas las cepas conocidas de estos serotipos utilizan L-triptófano, quinurenina y antranilato, y la de mayor utilización la D-galactosa como fuentes de carbono. Ninguna de las cepas del serotipo B utiliza la nicotinato. (Garrity G. y col., 2004).

P. putida, es una de las cepas de mayor interés industrial entre las bacteria del género *Pseudomonas*, ya que unido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y de ser manejable desde el punto de vista genético. La cepa *P. putida* KT2440 es un mutante deficiente del sistema de restricción de ADN de la cepa *P. putida* mt-2 aislada originalmente en Japón. Esta última porta el plásmido TOL: pWWW0, que codifica una ruta de degradación de tolueno y xilenos que es una de las mejor caracterizadas en el ámbito de la biodegradación atendiendo a los aspectos bioquímico y genético. En 1981 el comité de ADN recombinante de los Institutos de la Salud de EE.UU. certificó que la cepa *P. putida* KT2440 curada del plásmido TOL no es patógena para animales y plantas, y se

puede considerarse como un hospedador seguro en la clonación de genes de bacterias del suelo. (Elomari M. y col., 1994).

- ***Pseudomonas stutzeri*:**

P. stutzeri es una bacteria denitrificante no fluorescente, ampliamente distribuida en el medio ambiente, y también ha sido aislada como patógeno oportunista a partir de humanos. Algunas cepas crecen a 43°C, pero su temperatura óptima es de 35°C (Garrity G., 2004). Las especies han recibido mucho interés por sus propiedades particulares de metabolismo, por el cual ha sido propuesto como un organismo modelo para estudios de nitrificación; muchas cepas tienen propiedades de transformación natural, lo que les da la capacidad de transferir genes en el ambiente, algunas cepas son capaces de fijar el N₂, y otras participan en la degradación de contaminantes o interactúan con metales tóxicos. (Lalucat J. y col., 2008). Las cepas de esta especie tienen la capacidad de degradar uno de los contaminantes más serios del mundo, tetracloroetileno, un químico usado para el lavado en seco y desengrasado de metales. (Garrity G., 2004).

- ***Pseudomonas syringae*:**

Es un patógeno vegetal que puede infectar un amplio rango de especies de plantas, existiendo más de 50 diferentes biovars. Muchos de estos biovars fueron en su momento consideradas especies individuales dentro del género *Pseudomonas*, pero las técnicas de biología molecular tales como hibridación de ADN han mostrado que todos son parte de la especie ***P. syringae***. (Young J. y col., 1994).

P. syringae produce un pigmento fluorescente. La reacción de la gelatinasa es positiva. Cepas raras pueden requerir factores orgánicos de crecimiento. El crecimiento de la mayoría de las cepas es lento en los medios de mineral con una única fuente de carbono y es relativamente lento en medios complejos. El espectro nutricional es menos extenso y más heterogéneo que de *pseudomonas* fluorescentes saprofitas. La temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30°C. La cepa original fue aislada de flores de lila (***Syringa vulgaris***, de la familia Oleaceae), pero las cepas pertenecientes a

la descripción original son patógenas para muchas plantas no relacionadas. (Garrity G. y col., 2004).

1.2.1.8 SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

Muchas *Pseudomonas* son resistentes a diferentes agentes antibacterianos. Este objeto es de particular importancia médica, porque los miembros de este grupo son serios patógenos oportunistas de humanos y son frecuentemente aisladas a partir de pacientes y materiales clínicos. La capacidad a resistir a los antibióticos, esta incluida en algunas de las descripciones de nuevos taxones. (Garrity G. y col. 2004).

Como era de esperar, la mayoría de la información disponible sobre *Pseudomonas* se refiere a ***P. aeruginosa***, debido a su importancia como un serio patógeno oportunista del humano. Los antibióticos que son los mas efectivos en el tratamiento de infecciones por ***P. aeruginosa*** incluye algunas β -lactámicos, tal como Carbacilina y Ticarcilina; Cefalosporinas de tercera generación (Cefsulodina, Cefoperazone, Ceftazidima); el β -lactámico sintético monocíclico Aztreonam; Carbapenémicos (entre ellos el extremadamente semisintético de amplio espectro Imipenem); los aminoglucosidos (Gentamicina, Tobramicina) y las quinolonas (Ciprofloxacino, Levofloxacino). (Garrity G. y col., 2004).

En la práctica, las infecciones por ***P. aeruginosa*** son tratadas con una mezcla de Tobramicina y algunos β -lactámicos contra *Pseudomonas*, tales como Piperacilina o Azlicilina. Varias quinolonas están en uso para el tratamiento de infecciones crónicas o leves de la cornea o del sistema urinario. (Hancock R. y col., 1988; Garrity G. y col., 2004).

Pseudomonas aeruginosa y otras especies de pseudomonas fluorescentes son en general resistentes a otros β -lactámicos que no han sido mencionados anteriormente. (Garrity G. y col., 2004).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas es una membrana semipermeable, formada principalmente por el lipopolisacárido, que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos. La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de

poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos. (Trias J. y col., 1990; Garrity G. y col., 2004).

La baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa de las *Pseudomonas* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos de esta bacteria. Sin embargo, es claro que en *P. aeruginosa*, tanto la resistencia intrínseca a antibióticos como la adquirida, dependen principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan estos compuestos al exterior de la célula. El mayor número de estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, una de ellas está formada por los sistemas llamados eflux, y la otra se denomina MFS, por sus siglas en inglés (major facilitator superfamily). Los sistemas eflux están formados por tres proteínas, un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales.

El sistema eflux que más contribuye a la resistencia intrínseca de *Pseudomonas* es el sistema AcrAB/MexAB que es capaz de transportar una amplia variedad de antibióticos como: quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima y β -lactámicos. (Hancock R. y col., 1988; Trias J. y col., 1990; Evans K. y col., 1998).

Además de los antibióticos, el sistema AcrAB/MexAB también puede translocar solventes orgánicos, así como al autoinductor sintetizado por la enzima LasA que tiene un papel central en la formación de biopelículas. (Trias J. y col., 1990; Evans K. y col., 1998; Garrity G. y col., 2004).

➤ **Antibióticos utilizados frente a *Pseudomonas* spp.**

● **AMINOGLUCÓSIDOS:**

Son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de ribosomas en el subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Tienen actividad especialmente en contra de bacterias Gram negativas y aeróbicas y actúan sinérgicamente en contra de organismos Gram positivos. La Gentamicina es la más usada de los

aminoglucósidos, sin embargo, Amikacina tiende a ser especialmente efectiva en contra de organismos resistentes, como *Pseudomonas*. (Barranco E., 2005).

- **QUINOLONAS**

Son un grupo de antibióticos de amplio espectro. La mayoría de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las **fluorquinolonas**, caracterizadas por tener un grupo fluoruro en el anillo central, normalmente en posición 6. Actualmente existen cuatro generaciones de quinolonas como antibióticos, entre los que se pueden encontrar como conocidos exponentes, Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacino, Ofloxacino, Moxifloxacino y Levofloxacino. (Cué M. y col., 2005).

Las quinolonas actúan en el interior de la bacteria, penetrando a través del canal acuoso de las porinas. Son los únicos agentes antibacterianos que ejercen su actividad bactericida uniéndose a topoisomerasas bacterianas e inhibiéndolas; aunque éste no sería el único mecanismo de acción. (Alós J., 2003).

Las topoisomerasas son enzimas que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN bacteriano. El superenrollamiento permite a la larga molécula de ADN empaquetarse dentro de célula bacteriana. Esta estructura debe ser desenrollada para permitir diferentes funciones como replicación, transcripción y reparación del ADN. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción. Una inhibición prolongada conduciría así a la muerte de la célula. La compleja interacción de las quinolonas con las topoisomerasas es la base del diferente espectro antibacteriano de las quinolonas y también de la selección de cepas resistentes. La actividad de las quinolonas contra las bacterias Gram positivas se debe a su acción "blanco" en las topoisomerasas IV, en cambio la actividad contra las bacterias Gram negativas es por su acción "blanco" en las topoisomerasa II o ADN-girasa. (Alós J. 2003; Cué M. y col., 2005).

El número de bacterias resistentes a las quinolonas ha ido aumentando, lo que se relaciona a la presión selectiva de su extenso uso. Esto puede

ocurrir durante el tratamiento, especialmente en infecciones por *Pseudomonas*, lo que es más frecuente si el paciente recibió previamente la droga y los niveles sanguíneos alcanzados no son los adecuados. La resistencia de las bacterias a la acción de las quinolonas se desarrolla por 2 mecanismos fundamentales:

- a) alteraciones estructurales de la subunidad A de la girasa, lo que impide la unión de la quinolona a esta enzima y
- b) alteraciones de la permeabilidad de la pared celular. (Cué M. y col., 2005).

• CEFALOSPORINAS:

Son una gran variedad de antibióticos en los cuales se han planteado diversas clasificaciones en base a su estructura química, características clínico-farmacológicas, resistencia a las beta-lactamasas o espectro antimicrobiano.

Las cefalosporinas son antibióticos bactericidas y su mecanismo de acción es interferir con la síntesis del componente péptidoglucano de la pared celular bacteriana, a través de la unión a la proteína fijadora de penicilina (PBP) e inactivación de los inhibidores de la autolisina endógena: esta autolisina rompe las paredes celulares bacterianas y produce la muerte del microorganismo por lisis microbiana. Las cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación, al fijarse a sus proteínas-blanco en la membrana de la célula bacteriana, inactivan las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular. Por lo general, el germen muere después de la fijación e inactivación de las PBP 1a, 1B5, 2 y 3. (Davalos M., 1998; Mesna J. y col., 2008).

El espectro de actividad antibacteriana de estos agentes es muy amplio; su actividad sobre la mayoría de los microorganismos Gram negativos (especialmente contra las enterobacteriáceas) es excelente. En cambio su acción sobre otros patógenos tales como el *Citrobacter spp.* es nula; de todo el grupo sólo la Ceflazidima ha demostrado tener una confiable actividad bactericida sobre la *Pseudomona spp*, pero existe actividad variable contra la *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp* y *Acinetobacter spp*,. (Mesna J. y col., 2008).

• TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son un gran grupo de fármacos con estructura química básica, actividad antimicrobiana y propiedades farmacológicas comunes. Los microorganismos resistentes a este grupo muestran resistencia cruzada amplia a todas las tetraciclinas. Eficaces frente a bacterias sobre las que no actuaban los β -lactámicos. Hoy su uso está restringido a una serie de bacterias pero muy reducidas. La estructura química de las tetraciclinas es 4 anillos. Es un antibiótico de amplio espectro: son eficaces frente a muchos tipos de bacterias Gram negativas, Gram positivas, anaerobias, bacterias intracelulares. (Pérez E. y col., 2003; Mendoza N. y col., 2009).

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria al actuar sobre el ribosoma bacteriano. La diferencia entre el ribosoma bacteriano y el humano hace que no actúe sobre éste último y sí sobre el primero. Las tetraciclinas emplean los mecanismos de transporte de la membrana bacteriana para penetrar en el interior. Una vez dentro inhiben la síntesis proteica. Debido a este mecanismo de acción están apareciendo bacterias resistentes a las tetraciclinas, ya que se modifican los sistemas de transporte de las bacterias y no pueden ser empleados.

Es ciertamente evidente la pérdida de susceptibilidad a las tetraciclinas por su uso indiscriminado. Por la aparición de cepas resistentes, las tetraciclinas han perdido parte de su utilidad inicial. *Proteus spp.* y *Pseudomonas spp.* con frecuencia son resistentes.

La resistencia a la tetraciclina es mediada por plásmidos y es un rasgo inducible y transferible, o lo que es lo mismo, las bacterias se hacen resistentes sólo después de expuestas a la droga y son capaces de transmitir esta resistencia a otras bacterias mediante la transferencia plasmídica. (Mendoza N. y col., 2009).

1.2.1.9 SENSIBILIDAD A METALES Y METALOIDES:

Los compuestos de cobre son ampliamente utilizados en la agricultura, y puesto que sólo son necesarios pequeñas cantidades para la nutrición, el exceso puede afectar a los microorganismos. En las cepas de *P. syringae* que llevan al operón Cop, el cobre es excluido por la combinación de los componentes del periplasma y de la membrana externa. Un mecanismo de transducción sensorial de dos componentes similares a los sistemas equivalentes en otros organismos opera en la regulación de la expresión de la resistencia del cobre, y tiene gran similitud con un gen que parece regular el flujo de salida o la absorción de cobre en "*Streptomyces lividans*". (Garrity G. y col., 2004).

La resistencia inducible de cobre en *P. aeruginosa* es codificada por genes cromosomales, a pesar de que las cepas que se examinaron tenían plásmidos. (Appanna V. y col., 1996).

En *P. fluorescens* aisladas de suelos contaminados con cobre, un locus cromosómico con los determinantes de la resistencia del cobre y de la aptitud competitiva fue clonado, y los genes responsables de conferir resistencia a la producción de cobre y del citocromo c se identificaron (Yang C. y col., 1993).

Una cepa *P. putida* aislada de efluentes de galvanoplastia pueden acumular iones de cobre en una concentración tan alta como 6.5% de su peso seco. La capacidad más alta fue cuando el cultivo fue previamente cultivaba bajo condiciones limitantes de sulfato. (Garrity G. y col., 2004).

Los niveles de ácido-lábiles de sulfuro mas altos se muestran generalmente en cepas de *P. stutzeri* resistentes a la plata (Ag) que en las cepas sensibles. La resistencia al metal puede ser debido a la formación de los complejos de sulfuro de plata, ya que ninguna formación de complejos con el polifosfato o proteínas de unión al metal se ha encontrado para ser la causa. (Garrity G. y col., 2004).

Tres plásmidos fueron encontrados en una cepa resistente al metal, aislado de una mina de plata. El mas grande plásmido es MW 49.4×10^6 , que

especifica la resistencia de plata, es no conjugativo, pero podría ser transferido a *P. putida* por la movilización con el plásmido R68.45. (Garrity G. y col., 2004).

P. fluorescens desintoxica el aluminio por elaboración de un soluble, metabolito complejo de aluminio. Cuando el hierro está presente en el medio, los dos metales trivalentes son inmovilizados en un complejo lipídico que contiene Al, Fe y P, después de una fase temprana en las que el aluminio se encuentra asociado con fosfatidiletanolamina. (Garrity G. y col., 2004).

Investigaciones realizadas examinaron la adaptación de *P. fluorescens* al estrés causado por el exceso de cesio, y también participaron en la determinación de la base de la resistencia de la especie para varios metales (aluminio, hierro, zinc, calcio, y el galio). Estos metales son suministrados en forma de complejos con citrato, que se oxida por completo. Como en el caso de la resistencia a aluminio anteriormente mencionada, los metales aparecen asociados fosfatidiletanolamina, que más tarde fue encontrado en complejos ricos en lípidos, donde los metales se encontraban (Appanna V. y col., 1996).

En un estudio sobre el mecanismo de los complejos de citrato de metal por *P. fluorescens*, la biodegradación depende de la naturaleza del complejo. Así, el hierro divalente, níquel, zinc y los complejos de citrato son rápidamente degradados, mientras que el cadmio y citrato de cobre no lo son. Este último, al igual que el citrato de uranio, tampoco son transportadas dentro ni metabolizadas por los extractos libres de la célula. (Appanna V. y col., 1996).

Cerca de la mitad de los plásmidos conocidos de *P. aeruginosa* confieren resistencia a los iones de mercurio. El plásmido (pPB) confiere resistencia frente al mercurio y compuestos orgánicos de mercurio a la cepa de *P. stutzeri*. El plásmido tiene dos regiones de genes funcionales Mer que esta regulado de forma independiente, probablemente transcritos a partir de diferentes promotores. (Garrity G. y col., 2004).

Resistencia al cromo, boro y telurio se determinó por parte de algunos plásmidos de *Pseudomonas*. Después de un desarrollo en presencia de un incremento en las concentraciones de telurio de cepas de *P. aeruginosa* y *P. putida* conteniendo ciertos plásmidos que determinan la resistencia a telurio, acumulando estructuras cristalinas que contienen telurio en su espacio periplásmico. Desde allí, estos materiales son liberados en el medio en vesículas que se unen a la membrana externa. (Garrity G. y col., 2004).

Genes del operón que codifican la resistencia para el arsénico suelen ser transportados en plásmidos. El arseniato se reduce a arsenito, que es eliminado por un sistema de exportación. Un operón cromosómico fue identificado y clonado en *E. coli* y fue capaz de hibridar con los cromosomas de otras bacterias entéricas y *P. aeruginosa*. Este operón cromosómico puede ser el precursor evolutivo de los operones del plásmido, con la ventaja de un sistema de múltiples copias como un medio de amplificación natural. (Garrity G. y col., 2004).

1.2.2 EL AGUA

El agua es parte esencial de nuestra vida cotidiana, la sociedad se encuentra tan acostumbrada a vivir con ella que rara vez se cuestiona sobre su origen y posible agotamiento y abusa de su uso, seguros que nunca faltará. El agua es necesaria para la supervivencia humana y de cualquier ser vivo. (Castro E. y col., 2007).

Aproximadamente el 90% del agua de la tierra se encuentra combinada en la litosfera, por lo que no es utilizable por los seres vivos. La parte de agua disponible representa $1.383 \times 10^6 \text{ Km}^3$, de los que el 97.6% se encuentra en los océanos, el 0.01% en los lagos de agua salada y el 1.9% en los casquetes polares y glaciares, por lo tanto el agua dulce disponible para la vida y actividades del hombre representa el 0.02% de las aguas. (SUNASS, 2003).

1.2.2.1 CALIDAD Y USOS DEL AGUA

El grado de calidad del agua siempre debe estar referido al uso o usos al que se destina por ello este es variable y está influenciada por la calidad del suelo por donde discurre o está almacenada, por las filtraciones, los vertimientos tanto de origen químico (fábricas, curtiembres, etc.), como bacteriológico (ciudades, establecimientos frigoríficos o lecheros), así como las de origen agroindustrial en donde se emplean cantidades importantes de plaguicidas y fertilizantes de alta solubilidad. (SUNASS, 2003).

Según la Ley N° 29338 “Ley de Recursos Hídricos”, la calidad de los cuerpos de agua en general ya sea terrestre o marítima del país se clasificará de acuerdo a su uso según los Estándares de Calidad Ambiental para agua (ECAs) D.S. N° 002-2008-MINAM en las siguientes categorías:

Categoría I: Abastecimiento de Poblaciones y Uso Recreacional, se han considerado las subclasificaciones según detalle:

- A1.-** Abastecimiento de aguas para consumo humano, utilizadas con simple desinfección.
- A2.-** Abastecimiento de agua para consumo humano, utilizadas con tratamiento convencional que consiste en la desinfección, coagulación, floculación, sedimentación, filtración y de desinfección final.
- A3.-** Abastecimiento de agua para consumo humano, utilizadas con tratamiento físico y químico avanzado.

Asimismo para los usos recreacionales se establecieron dos subcategorías.

- B1.-** Aguas de uso Recreacional con contacto primario, incluye natación, ski acuático y buceo.
- B2.-** Aguas de uso recreacional con contacto secundario, incluye deporte náuticos y la pesca.

Categoría II: Actividades Marino Costeras.

C1.- Extracción y cultivo de molusco bivalvos.

C2.- Extracción y cultivo de otras especie hidrobiológicas.

C3.- otras actividades.

Categoría III: Riego de Vegetales y Bebidas de Animales.

Categoría IV: Conservación del Ambiente Acuático.

Fuente: Estándares de Calidad Ambiental para agua (ECAs) D.S. N° 002-2008-MINAM.

➤ **Calidad Bacteriológica del Agua**

Para establecer la calidad bacteriológica del agua se recurre al despistaje de bacterias propias del intestino humano y animal, virus, protozoos y helmintos, microorganismo patógenos cuya ausencia en el agua determinan su inocuidad.

CUADRO N° 01

Limites Bacteriológicos (Valores en NMP/100 MI) de acuerdo a su uso

CATEGORIA	SUB CATEGORIAS	COLIFORMES TOTALES	COLIFORMES TERMOTOLERANTES
I	A1	50	0
	A2	3 000	2 000
	A3	50 000	20 000
	B1	1 000	200
	B2	4 000	1 000
II	C1	≤88	≤14
	C2	≤30	≤30
	C3	1 000	1 000
III		5 000	1 000
IV		3 000	2 000

Fuente: Estándares de Calidad Ambiental para agua (ECAs) D.S. N° 002-2008-MINAM.

Sin embargo existen microorganismos que están considerados como "otros indicadores", los cuales no están contemplados. Entre estos se encuentran ***Pseudomonas spp.*** (Marchand E., 2002).

Es así que algunos bacteriólogos que tradicionalmente utilizaban coliformes totales, coliformes termotolerantes y estreptococos fecales como indicadores bacteriológicos de calidad del agua, comenzaron a determinar otros microorganismos tales como *Pseudomonas* y ***Candida albicans*** para poder garantizar la calidad microbiana del agua. (Marchand E., 2002).

La importancia de *Pseudomonas* se tornó mayor cuando se comprobó su capacidad de inhibir a los coliformes y se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero los cuales podrían estar inhibidos por *Pseudomonas* (Marchand E. 2002). Se ha comprobado que las especies de este género, son microorganismos que influyen en la detección del grupo coliforme ya que ejercen sobre éstos una acción inhibitoria (Marchand E., 2002).

1.2.2.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

Se define como contaminación del agua a la incorporación de materiales extraños como: microorganismos, sólidos en suspensión, residuos industriales, productos químicos y de otros tipos, que deterioran la calidad del agua y la hacen inadecuada para otros usos pretendidos.

La contaminación del agua es causada generalmente por actividades humanas afectando su ciclo en cualquiera de sus etapas, lo que ha generado que la disponibilidad del agua sea menor en calidad y cantidad. (Rodríguez S., 2000).

Existen dos clases de contaminación: Fuentes puntuales y difusas, las fuentes puntuales descargan agentes contaminantes en localizaciones específicas a través de tuberías o alcantarillas en el agua superficial; las fuentes de contaminación difusa son las que no se pueden localizar en un sitio de descarga. (CEPIS. OPS/OMS, 1999).

➤ **Contaminantes del agua**

Existe gran número de contaminantes del agua que pueden clasificarse en:

- **Microorganismos patógenos.** Como: bacterias, virus, protozoos y otros organismos que transmiten enfermedades, como cólera y tifoidea. Estos microorganismos llegan al agua en heces y otros restos orgánicos que producen las personas o animales infectados.
- **Desechos orgánicos.** Son el conjunto de residuos naturales producidos por los seres vivos. Incluyen heces fecales y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas. Cuando este tipo de desechos se encuentra en exceso, la proliferación de bacterias agota el oxígeno, y los organismos ya no pueden vivir en esta agua.
- **Compuestos orgánicos.** Son moléculas que poseen carbono como base de su estructura. Estos compuestos, sintéticos en su mayoría, son detergentes, disolventes, plaguicidas, aceites, gasolinas y otros productos derivados del petróleo. Estos compuestos poseen complejas estructuras moleculares, difíciles de degradar por los microorganismos.
- **Compuestos inorgánicos.** En esta clasificación se agrupan ácidos, sales y metales pesados. Estos contaminantes, en cantidades altas, pueden causar graves daños a los organismos e incluso su muerte. (CEPIS. OPS/OMS, 1999).

➤ **Contaminación por Actividad Minera.**

La actividad minera es una actividad extractiva que por su propia naturaleza implica procesos de fuerte impacto en el ambiente, contribuye al problema de la contaminación de las aguas, ya que el proceso técnico de obtención de minerales envuelve una serie de procedimientos empleando una serie de reactivos químicos que actúan como decantadores obteniéndose el mineral puro en forma de concentrado. Los líquidos resultantes de este proceso contienen a veces excedentes de reactivos químicos o iones de metales (Fe, Cd, As, Zn, Cu, S), que por algunas circunstancias no son obtenidos por

estos procedimientos químicos, salen a depositarse algunas veces en lo que denominan canchas de relaves, donde por decantación los sólidos son retenidos y el efluente líquido discurre a lo largo de las quebradas, cayendo finalmente a algún curso de agua (Suárez P., 2002).

➤ **Contaminación por Metales Pesados y Metaloides.**

Los metales son elementos naturales que se encuentran en rocas, suelo, yacimientos, etc. Muchos de ellos son esenciales para los organismos vivos, sin embargo, las dosis que excedan lo requerido por ellos, producen graves alteraciones a la salud. (Vega S., 1985). La toxicidad de un metal depende de su vía de administración y del compuesto químico al que está ligado. (Alejo M., 2004).

Existen tres tipos principales de fuentes de emisión de metales en el medio ambiente. El más evidente es el proceso de extracción y purificación: minería, fundición y refinación. El segundo, menos conocido, es la emisión de metales al quemarse combustibles fósiles como: el carbón. Tales combustibles contienen cadmio, plomo, mercurio, níquel, vanadio, cromo y cobre. La tercera fuente, la más diversa, es la producción y utilización de productos industriales que contienen metales, que aumenta al descubrirse nuevas tecnologías y aplicaciones. (Del Río M. y col., 2007).

Se ha señalado que la presencia de metales pesados en el medio ambiente ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan (Silver S. y col., 1988; Cervantes C. y col., 1990), un incremento en su concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana (Montuelle B. et al., 1994).

Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver S. y col., 1992).

La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante (Anisimova L. et al., 1993; Montuelle B. et al., 1994).

Entre estos metales pesados y metaloides tenemos a:

- **PLOMO**

Esta presente en las fuentes de agua, proviene principalmente de la actividad minera e industria manufacturera. (SUNASS, 2003). Se extrae de minas junto con otros metales como plata, oro y cobre. La extracción del subsuelo, su refinación y su amplio uso industrial, ha contribuido al aumento de sus concentraciones en el suelo, aguas y aire principalmente en los centros urbanos y las zonas mineras. (Rojas R., 2002).

El plomo puede ingresar al cuerpo por los alimentos, aire, humo de tabaco y el agua. El exacto nivel de excreción de plomo no ha sido determinado, pero se estima que ella puede ser 0.3 a 1.0 mg por día. El consumo de plomo en dosis de 0.1mg por largos períodos de tiempo ha sido reportado como causante de envenenamiento (SUNASS, 2003).

La concentración máxima de plomo en el agua recomendada por la OMS es de 0.01 mg/l. (SUNASS, 2003).

En cuanto a los valores referenciales considerados para intoxicación por plomo en sangre son los siguientes I) Mayor a 10 µg/dl para niños y gestantes II) mayor a 20 µg/dl para adultos (MINSa, 2007).

- **CADMIO**

En su forma elemental, el cadmio es insoluble en el agua. Se presenta en la naturaleza bajo la forma de sulfuro, greenockite o cadmio blend y a menudo se le encuentra asociado con las mineras de plomo y zinc, El cadmio es utilizado en metalurgia conjuntamente con el cobre, plomo, plata, aluminio y níquel. Las sales de cadmio son empleados en la fabricación de insecticidas y antihelmínticos. (Dickson T., 1999).

En el ambiente en general, la contaminación es causada por la incineración de residuos, combustión de carburantes fósiles y el uso de fertilizante, fosfatados. El cadmio y sus compuestos emitidos por las fuentes señaladas, se distribuyen y presentan de modos diferentes según las características del medio: aire, agua y suelo. (Ramírez A., 2002).

La OMS establece que la dosis máxima de cadmio presente en el agua es de 0.003 mg/l. (SUNASS, 2003).

En la sangre el valor normal presente es <0,5 ug /100 ml. (MINSa, 2007)

- **MERCURIO**

El mercurio entra al medio ambiente en la forma elemental como pérdida de procesos industriales, de equipos convertidos en chatarra, y agrícolas. El mercurio también penetra en el medio ambiente debido a fuentes inesperadas. Hay cantidades importantes de mercurio en las aguas negras, como resultado del uso que hace un gran número de personas de compuestos químicos, farmacéuticos y pinturas que tienen un pequeño contenido de mercurio.

Los hallazgos naturales de mercurio en las aguas habitualmente son menores a 1 ug/l. En la mayoría de las veces, la contaminación del agua se debe a los desechos industriales que contienen mercurio. El mercurio en el agua puede sufrir el proceso de metilación transformándose en metilmercurio, el cual puede ser ingerido y bioacumulado por peces y biota acuática y a través de éstos puede alcanzar al ser humano. (SUNASS, 2002).

Las sales de mercurio son consideradas altamente tóxicas al hombre. Estas sales son rápidamente absorbidas por el tracto gastrointestinal. (SUNASS, 2003).

El nivel establecido de este metal en el agua por la OMS es de 0.001 mg/l

El nivel de Mercurio en sangre es 2 µg/dL (MINSAL, 2007)

- **ARSENICO**

Es un metaloide que se encuentra distribuido en toda la corteza terrestre, principalmente formando parte de rocas sedimentarias y volcánicas. Por lo tanto, se encuentra presente, en pequeñas concentraciones, en los alimentos, en el agua, en el aire y en toda materia viviente. (N.A.S., 1977).

El arsénico puede terminar en el ambiente a través de la producción industrial de Cobre, Plomo y Zinc. Y a través de la aplicación de insecticidas en granjas. Adicionalmente, éste es un ingrediente de preservación de las maderas. La toma de grandes cantidades por largo tiempo en el agua potable que contiene arsénico puede causar

problemas en la piel y ciertos cánceres, como el de piel y pulmón. (SUNASS, 2003).

El nivel de arsénico en aguas naturales superficiales y subterráneas varía generalmente entre 1 y 2 mg/l, existiendo en cada uno de los cinco continentes, zonas en donde el agua para consumo humano tiene un alto contenido de arsénico. (SUNASS, 2003).

En el caso de América Latina, se ha detectado la presencia de arsénico en Argentina Chile, México, Perú y El Salvador. Se estima que en esos países aproximadamente cuatro millones de personas beben, en forma permanente, con niveles de arsénico que ponen en riesgo su salud. (SUNASS, 2003).

La toxicidad por arsénico puede ocurrir en dos formas: aguda y crónica. La toxicidad aguda es consecuencia de la ingesta de alto contenido de arsénico en un tiempo corto: la crónica, de la ingesta de pequeñas cantidades de arsénico en un largo periodo de tiempo. (Rojas R., 2002).

La OMS establece que la dosis máxima de arsénico presente en el agua es de 0.01 mg/l. y las concentraciones máximas presentes en sangre es 10 µg/L.

- **ZINC**

Los compuestos de zinc se encuentran en forma natural en el aire, suelo y están presentes en todas las comidas. En ambientes hídricos aeróbicos el zinc se encuentra en estado de oxidación +2, pudiendo presentarse en formas disuelta y suspendida. Puede existir como ion libre (Zn^{2+}), como compuesto inorgánico neutro, (Mills W. et al., 1985).

Al igual que para el resto de los metales pesados, la toxicidad del zinc está influenciada por factores tales como concentraciones de calcio y magnesio, dureza, temperatura y pH. Así, la toxicidad aguda del zinc es más baja en aguas con alta dureza y bajo pH (Holcombe G. y col., 1978; Alsop D. et al., 1999).

Los niveles de zinc que producen efectos a la salud son generalmente mucho mayores que los recomendados para una dieta normal, para el zinc es de 15 mg/día (para hombres) y 12 mg/día (para mujeres). (INHEM, 1992).

La OMS recomienda que el agua debe tener una concentración máxima de 3 mg/l.

- **COBRE**

Muchos factores y procesos influyen en la presencia de cobre en aguas. Entre los factores importantes están dureza y alcalinidad del agua, fuerza iónica, pH y potencial redox. (Sancha A., 2002).

En ambientes acuáticos naturales el Cobre se presenta principalmente, como Cu_2 . De esta especie divalente, sólo una pequeña fracción se presentará como "libre" (Cu^{++}), la mayor parte estará adsorbida en partículas suspendidas o formando complejos con diversos ligandos. Por este motivo, casi todo el cobre en aguas naturales estará formando complejos los que pueden ser adsorbidos por una variedad de óxidos metálicos hidratados (Fe, Al, Mn) (Sancha A., 2002).

El nivel recomendado de cobre presente en el agua por la OMS es de 2 mg/l.

- **HIERRO**

En la naturaleza no se encuentra en estado libre, sino asociado con algunas rocas basálticas. Las aguas con hierro al entrar en contacto con el aire y absorber oxígeno se vuelve turbia e inaceptable desde el punto de vista estético, debido a la oxidación del hierro a Fe^{3+} y a la precipitación de los coloides (Rojas R., 2002).

Los valores recomendados por la OMS no están basados en consideraciones fisiológicas por que el hierro en trazas es esencial para la nutrición. De este modo, grandes concentraciones de hierro son ingeridas con fines terapéuticos. (SUNASS, 2003).

La OMS establece como límite máximo permisible de hierro en el agua 0.3 mg/l.

- **MANGANESO**

Es el doceavo elemento más abundante que se encuentra en la corteza terrestre y se distribuye en suelos, sedimentos, rocas, agua y materiales biológicos.

Concentraciones de manganeso del orden de 1.8 a 2.0 mg/l han sido reportados en aguas de mina. Desde que la química del manganeso es similar a la del hierro es de esperar que las operaciones industriales que son fuente de hierro sean también fuente de manganeso. (SUNASS, 2003).

En aguas subterráneas sujetas a condiciones reductoras, el manganeso puede ser lavado del suelo y presentarse en concentraciones muy elevadas. Asimismo el manganeso se le encuentra asociado al hierro en aguas subterráneas. (SUNASS, 2003).

En el caso del agua, al igual que para el caso de hierro, los límites de manganeso han sido establecidos por consideraciones estéticas y económicas más que por peligro fisiológico. (SUNASS, 2003).

La OMS establece que la dosis máxima presente en el agua es de 0.5 mg/l.

- **CROMO**

Su toxicidad esta en correspondencia con sus valencias; el cromo (III) ha sido aceptado incluso como oligoelemento para los mamíferos y solo en dosis excesivas nocivo para la salud, mientras que el cromo (VI) se considera toxico para la salud. (Zhitkovih A., 2005).

El cromo es usado en síntesis en la industria del acero, en galvanoplastia, en el curtido del cuero y como anticorrosivo en radiadores, (Robertson W., 1988).

Se han reportado niveles de cromo en agua que oscilan entre 0.45 y 112 mg/l como valor medio, por lo que su contribución puede ser desde insignificante hasta de 224 mg/día.

La ingestión estimada como adecuada es de 50-200 mg/día.

Las guías de la OMS establecen un nivel máximo recomendable presente en el agua de 0.05 mg/l.

1.2.2.3 INTERACCIÓN METAL - BACTERIA

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos.

Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal, en cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Vullo D., 2003).

Las interacciones entre las bacterias y los metales son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana ó intracelularmente.

A nivel extracelular, se ha determinado:

- 1) El papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales (Suarez P. y col., 2002).
- 2) La secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos (sideróforos) (Suarez P. y col., 2002).

Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente en cada uno de ellos. A nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones enzimáticas ó la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas. Un tipo particular de interacción bacteria-metal, es la capacidad que tienen las bacterias para utilizar algunos metales como fuente de energía o aceptores finales de electrones en el metabolismo. Dado el importante papel que juegan las

bacterias en los ecosistemas, la alta toxicidad, ampliamente conocida de los metales y la relevancia de las interacciones entre esos microorganismos y los iones metálicos. (Suarez P. y col., 2002).

Las interacciones entre los microorganismos y los iones metálicos han sido divididas en tres procesos distintos, interacciones extracelulares, con la pared celular e intracelular:

a. Interacciones Extracelulares

Las principales interacciones extracelulares entre bacterias y metales son la movilización e inmovilización de éstos, la producción de polímeros extracelulares y la liberación de sideróforos. La movilización e inmovilización de metales es motivo de interés por sus aplicaciones industriales, principalmente en la minería.

Las bacterias producen polímeros extracelulares que atrapan metales, e intervienen en los procesos de movilización e inmovilización de los mismos en suelo y agua. Los polímeros extracelulares son componentes principales de la cápsula celular cuyas funciones sugeridas son la adhesión de las bacterias a cualquier superficie (partículas, otros organismos) y el atrapamiento de iones metálicos en estos componentes. Los polímeros extracelulares están compuestos principalmente por polisacáridos, aunque también pueden contener proteínas, y sus interacciones con los iones metálicos son consecuencia directa de la presencia de grupos funcionales cargados negativamente (piruvato, fosfato, hidroxilo, succinilo y ácido urónico) en su estructura. (Suarez P. y col., 2002).

a.1 Interacciones con la Superficie Celular

La interacción inicial entre los microorganismos y los metales, ocurre por atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular microbiana. En las bacterias Gram positivas, la pared celular constituye el primer frente de interacción con las moléculas presentes en el ambiente. En los medios de cultivo apropiados para el crecimiento bacteriano, las especies Gram positivas presentan una pared celular cargada negativamente, aunque también contiene cargas positivas en menor número. 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. El transporte de iones metálicos al citoplasma bacteriano, presenta diferentes niveles de complejidad. Las estrategias para el transporte de K, Mg y Ca son conocidas. En el caso del Ni, Mn, Zn y otros metales no están bien definidas y se supone que los mismos deben penetrar la pared celular, disociarse de ella y reasociarse con las moléculas transportadoras, para ser liberadas en el citoplasma y finalmente incorporarse a proteínas (Doyle R., 1989; Suarez P. y col., 2002).

En las bacterias Gram negativas, la membrana externa es capaz de unir un amplio rango de iones metálicos.

Los cationes al parecer son accesorios importantes que estabilizan la estructura molecular de la membrana. También se supone que la unión a iones metálicos reduce las cargas repulsivas entre los constituyentes aniónicos de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas adyacentes. Se ha demostrado que los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos, son los constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que primero se unen a los iones metálicos, y algunos grupos carboxilo también están disponibles para interactuar con los metales. Sin embargo, es el peptidoglicano quien se une fuertemente a los iones metálicos por los grupos carboxilo, al igual que ocurre en las bacterias Gram-positivas, pero en menor escala. (Ferris F., 1989; Suarez P. y col., 2002).

b. 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.

b.1 Bioacumulación: es la absorción de iones metálicos, es un proceso rápido que involucra la interacción con la superficie celular y es el primer paso para la acumulación, un proceso mucho más lento, dependiente del metabolismo celular y capaz de atrapar mayor cantidad de iones.

Aunque los niveles de cationes metálicos necesarios para el crecimiento bacteriano son bajos, los mecanismos de acumulación también funcionan a altas concentraciones, y esto puede incidir en la toxicidad del metal sobre el organismo que los acumula y la comunidad microbiana a la cual pertenece. No resulta sencillo comprender la acumulación de metales tóxicos en los microorganismos; sin embargo parece que el almacenamiento intracelular de estos compuestos, confiere resistencia a metales pesados en algunas bacterias (Suarez P. y col., 2002).

Las bacterias tolerantes a metales son capaces de acumularlos intracelularmente, y la presencia de proteínas enlazadoras de metales en el interior celular se ha relacionado con la disminución de su toxicidad y, por ende, con la viabilidad de la especie. Estas proteínas enlazadoras, conocidas como metalotioninas, se unen a los iones metálicos por los que poseen una gran afinidad, evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo. Se han encontrado metalotioninas en todos los seres vivos, desde levaduras y bacterias hasta plantas y animales. Sin embargo, en las bacterias los ejemplos son escasos, habiendo sido encontrada hasta ahora solamente en una cepa de *Pseudomonas* y en la cianobacteria marina del género *Synechococcus*. (Ferris F., 1989; Suarez P. y col., 2002).

b.2 Biomineralización: Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionuclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H⁺ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Suarez P. y col., 2002).

b.3 Biotransformación: Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(CH_3)_2Hg$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de bioconversión Cr (VI) en Cr(III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales (Vullo D.,2003).

1.2.3 ACTIVIDAD MINERA

Los recursos mineros que guarda la provincia de Espinar son especialmente el cobre y hierro, los importantes yacimientos que destacan son: Tintaya, Quechua, Coroccohuayco. En pequeña minería esta: Atalaya, Rosandina, Morro Solar, Joyel Brillante. (CODEPE, 2002).

La mina de cobre "Tintaya" se ubica a 14 kilómetros de distancia de la ciudad de Yauri, capital de la provincia de Espinar aproximadamente a 4,100 m, situada entre dos cuencas, la del río Salado y la del río Cañipía, las cuales pertenecen a la gran cuenca del río Apurímac. Actualmente la mina esta concesionada por la empresa Xstrata Tintaya S.A. abarcando un área 2395.6 ha., con influencia directa en las comunidades de Tintaya Marquiri, Alto Huancané, Bajo Huancané, Huano Huano, Alto Huarca, Huisa, Huarca, Huisa Ccollana y Anta Ccollana.

1.2.3.1 EFECTOS SOBRE EL RIO SALADO Y RIO CAÑIPIA.

La actividad minera constituye uno de los principales problemas dentro del área de estudio en cuanto la pérdida de la cobertura vegetal, pérdida de suelo, y contaminación del recurso hídrico.

Es así que por reportes realizados en los últimos años, los efectos de la contaminación del agua se perciben de modo semejante en todas las comunidades involucradas.

En Alto Huancané, la causa de la contaminación se debió a la presa de relaves de Huinimayo, que presentó filtraciones que afectan los ríos Huinimayo y Paccpaco. En Tintaya Marquiri y Bajo Huancané el caso del río Coccarita, por los derrames de la planta de óxidos. (Ayala C. 2004).

Además, el proyecto Corccohuayco también contaminó el río Salado a través de afluentes ubicados en Huano Huano, comunidad en la cual se menciona como contaminantes los pozos de perforación que pertenecen al proyecto Corccohuayco. (Ayala C. 2004).

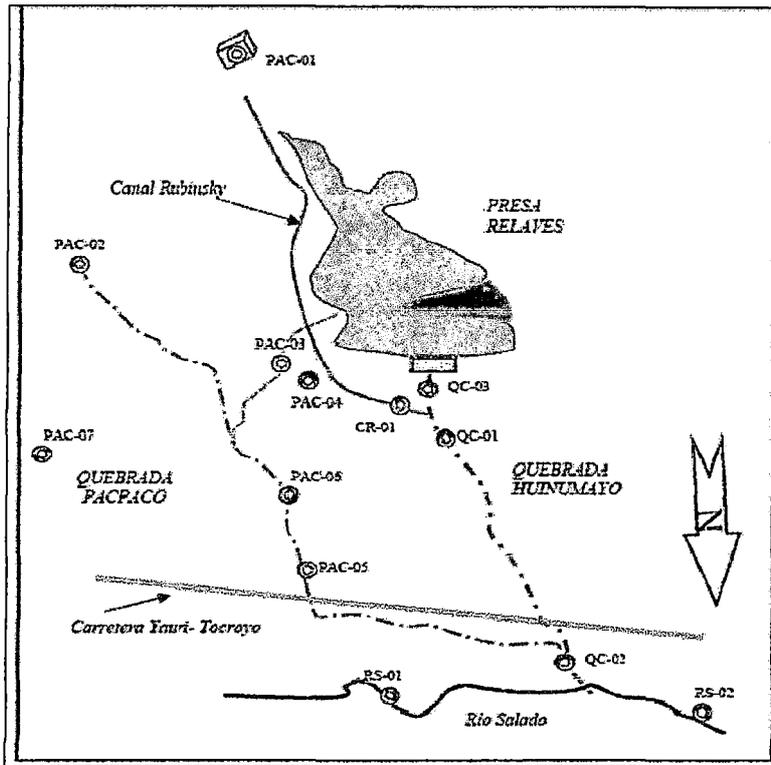
En Alto Huarca, el problema central fue filtraciones de relaves, originadas por los desmontes de la poza de relaves que utilizaba el anterior operador del proyecto Antapaccay, la empresa minera Atalaya. También se considera que la presa de relaves Huinipampa estaría causando contaminación, a pesar de que todavía no está activa. (Ayala C. 2004).

Las cuencas de los ríos Tintaya y Ccamacmayo constituyen la parte de la cuenca del Río Salado que contiene las instalaciones de la mina Tintaya y por lo tanto, están fuertemente influenciadas por la extensa infraestructura (Presa de relave Ccamacmayo) (Gráfico N° 01), y los sistemas asociados de manejo de agua de la mina Tintaya. Los caudales en el Río Tintaya están controlados por el sistema de manejo de aguas de la mina, las tasas de infiltración están alteradas debido a las extensas áreas de botaderos de material estéril, y el flujo de agua subterránea ha sido alterado alrededor del tajo debido a las operaciones de desagüe del mismo. (Morales E. y col., 2009; Golder Associates Perú S.A., 2010).

En las estaciones del Río Cañipia ubicadas aguas arriba de Antapaccay se reportaron concentraciones aisladas de metales totales (hierro, plomo, cobre y zinc) que superaron algunos de los ECAs. Actualmente los principales factores que influyen la calidad de agua en la cuenca del Río Cañipia son los componentes residuales de la antigua operación de la mina Atalaya que explotó anteriormente el yacimiento Antapaccay. Y la presa de relave Huinipampa (Gráfico N° 02) (Golder Associates Perú S.A., 2010).

GRÁFICO Nº 01

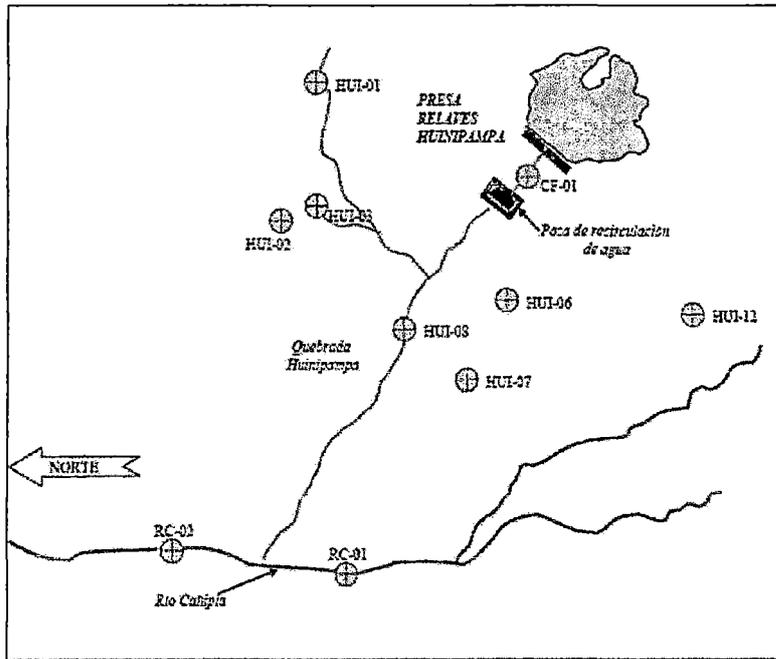
Presa de relave Ccamacmayo



Fuente: Golder Associates Perú S.A., 2010

GRÁFICO Nº 02

Presa de relave Huinipampa.



Fuente: Golder Associates Perú S.A., 2010

1.2.3.2 METALES PESADOS EN LOS RIOS SALADO Y CAÑIPIA.

Estudios realizados en Abril del 2010 por la Dirección Regional de Salud Cusco – DIRESA, en cuanto a la presencia de metales pesados reportan la presencia de Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Manganeso, Plomo, Zinc, Mercurio, los cuales en su mayoría se encuentran por debajo de Estándares de Calidad Ambiental (ECAs), (Ver Anexo N° 06)

Sin embargo, más abajo de la ciudad de Yauri se reportaron valores de arsénico en la época seca en un rango entre $<0,002$ mg/L y $0,011$ mg/L; este último valor supera ligeramente el ECA Cat. 1-A1 ($0,01$ mg/L) para aguas destinadas a la producción de agua potable previa desinfección. Se debe mencionar que a lo largo de la cuenca del Río Cañipia existen manantiales que registraron valores de arsénico total en línea base superiores al ECA Cat. 1-A1; y cuya influencia es notoria en la época seca debido al bajo caudal del río.

En las estaciones del río Cañipia ubicadas aguas arriba de Antapaccay se reportaron concentraciones aisladas de metales como: Hierro, Plomo, Cobre y Zinc, que superaron algunos de los ECAs, principalmente en épocas húmedas, probablemente asociadas a eventos de lluvia y transporte en suspensión. Y a lo largo de toda la cuenca del río Saldo, las concentraciones de arsénico sobrepasaron el ECA de Categoría I, A1 ($0,01$ mg/L). (Golder Associates Perú S.A., 2010).

CAPITULO II

AMBITO DE ESTUDIO

2.1 UBICACION POLITICA

Región : Cusco
Departamento : Cusco
Provincia : Espinar
Distrito : Espinar

(Ver Mapa 01)

2.2 UBICACIÓN GEOGRAFICA

Los ríos Salado y Cañipia están ubicados en el Distrito de Espinar, con las siguientes coordenadas:

13°56'24" a 14°52'40" LS

71°30'27" a 72°30'30" LW

Altitud media 4,037 m.

Fuente: CODEPE, 2002.

2.3 ACCESIBILIDAD

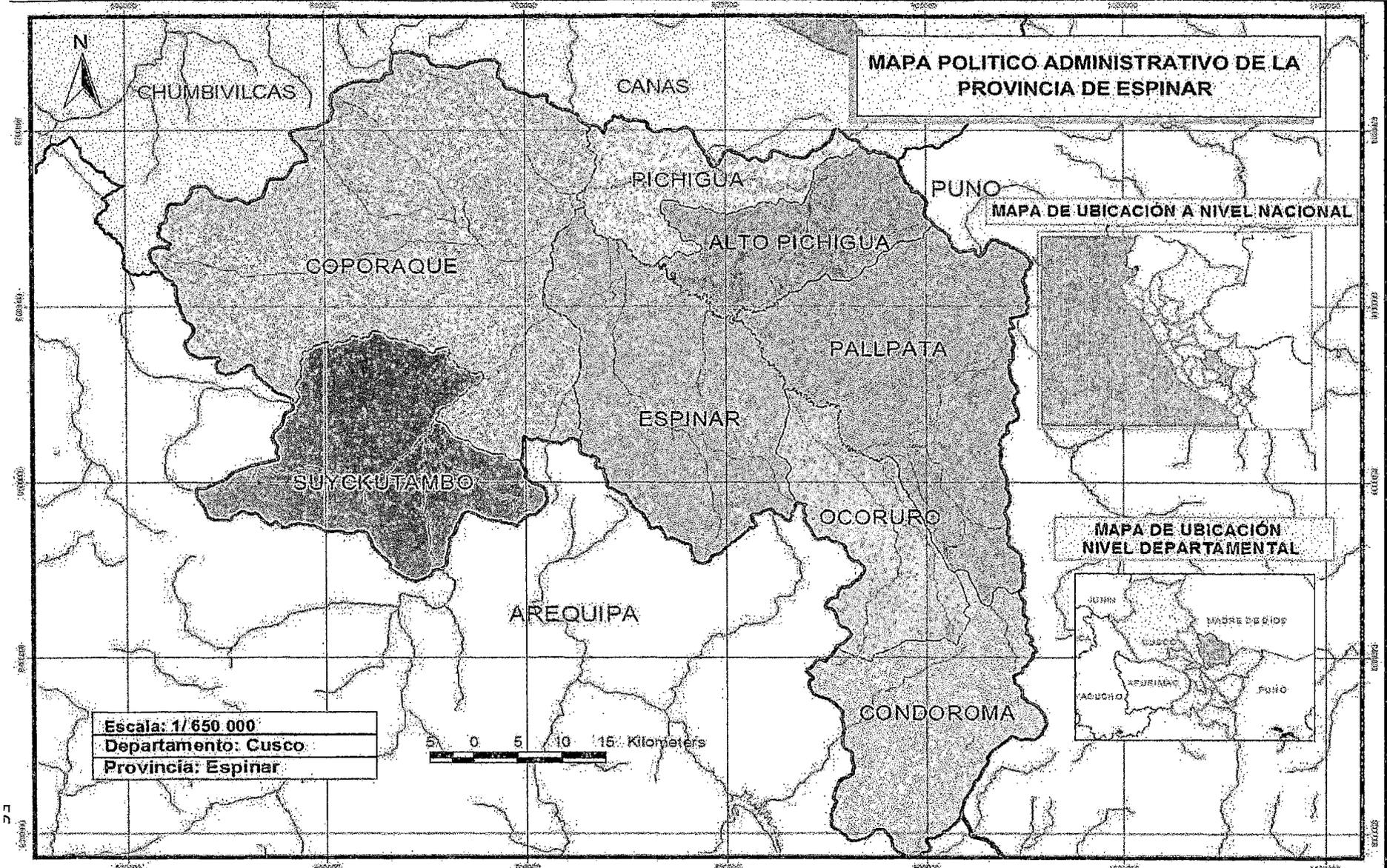
Para llegar al distrito de Espinar se cuenta con las siguientes rutas.

Vía Carretera: ruta Cusco – Sicuani – Espinar.

Vía Carretera: ruta Cusco – Santo Tomas – Espinar.

Fuente: CODEPE, 2002.

MAPA 02
MAPA POLITICO DE LA PROVINCIA DE ESPINAR



FUENTE: CODEPE 2002

2.4 ECOLOGIA

2.4.1 ZONAS DE VIDA:

La Provincia de Espinar, ecológicamente presenta 4 zonas de vida. La zona más representativa es el Páramo muy húmedo, Subalpino Subtropical, la cual cubre aproximadamente al 51%, por lo que el territorio presenta condiciones climáticas, edáficas, topográficas y con una cobertura vegetal que posibilita el desarrollo de la actividad pecuaria. (CODEPE, 2002).

2.4.2 CLIMA

La provincia de Espinar cuenta con una estación meteorológica de SENAMHI en Yauri, para el registro de datos climáticos, que es la Estación representativa de las provincias altas de la región Cusco, la misma que se encuentra ubicada en a una altitud de 3915 m. y en las coordenadas 14°47'00" Latitud Sur y a 71°25'00" Longitud Oeste, los registros proporcionados por la estación meteorológica corresponden a 40 años (1964-2004).

CUADRO N° 02
Características Climáticas

	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	Humedad Relativa
Máxima	16.6	825	64%
Mínima	-4.46	725	58%
Media Anual	6.67	775.8	63%
observaciones	Ocurrencia de helada de abril a noviembre y de mayor sensación de frío: junio, julio y agosto	La variación se debe a su proximidad a la cadena montañosa central, donde se registran altas precipitaciones de origen orográfico, contrariamente a las lluvias de origen conectivo.	

Fuente: SENAMHI Estación Meteorológica representativa de las Provincias Altas de la Región Cusco. 2008.

CUADRO N° 03

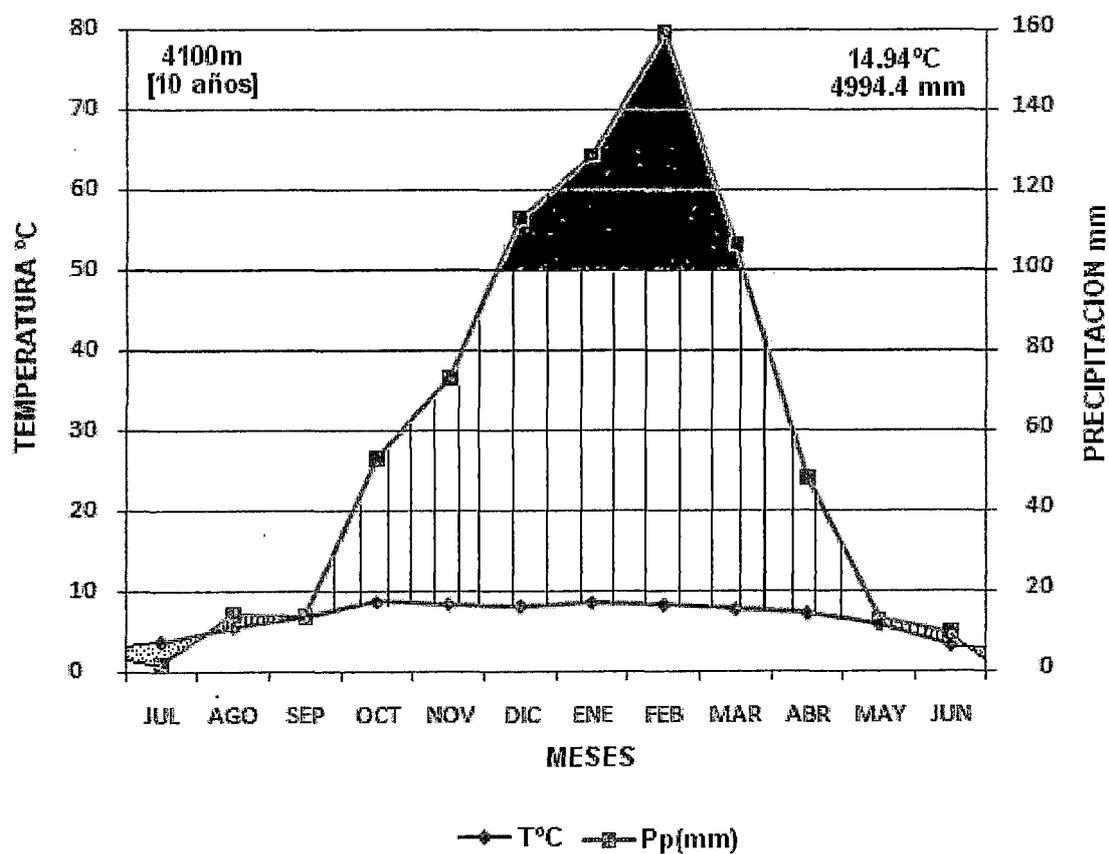
Temperatura y Precipitación media Mensual Promedio (1990-1999)

Meses	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)
Julio	3.73	2.13
Agosto	5.56	14.22
Septiembre	6.95	13.94
Octubre	8.81	53.51
Noviembre	8.54	73.41
Diciembre	8.27	112.96
Enero	8.7	128.68
Febrero	8.43	159.54
Marzo	7.9	106.26
Abril	7.33	48.26
Mayo	5.94	13.12
Junio	3.3	10.01
	14.90	494.40

Fuente: Estación Meteorológica Xstrata Tintaya S.A.

GRÁFICO N° 03

Climatodiagrama Estación Meteorológica Xstrata Tintaya



El Climatodiagrama muestra un periodo seco entre los meses de Junio y Julio, y un periodo húmedo entre los meses de Mayo y Agosto, con temperaturas máximas entre los meses de Octubre a Marzo, y las temperaturas mínimas entre Junio y Julio, asimismo se observa un periodo perhúmedo entre los meses de Diciembre a Marzo.

2.4.3 HIDROLOGÍA

En el territorio de Espinar se ubican 4 cuencas principales: 1) La cuenca naciente del río Apurímac, con cuatro sub cuencas. 2) La cuenca del río Salado con cinco subcuentas. 3) Cuenca del río Apurímac. 4) Cuencas de menor orden en las partes altas de Condoroma y Pactamayo, que pertenecen a la cuenca del río Colca (Arequipa). (CODEPE, 2002).

En el periodo lluvioso (noviembre-abril), los caudales de los ríos alcanzan el 86% del total, los suelos alcanzan altos niveles de saturación debido a su morfología y estructura. (CODEPE, 2002)

2.4.3.1 Río Salado:

Las cuencas de los ríos Tintaya y Ccamacmayo constituyen parte de la cuenca del Río Salado,

Nace en el distrito de Occoruro de la laguna de Sutunta, en su recorrido pasa por el distrito de Tocroyoc a 5 km de la capital de la Provincia (Espinar), desembocando en el río Apurímac.

2.4.3.2 Río Cañipia:

La geología de la cuenca del Río Cañipia se compone de una gruesa secuencia de caliza que fue levantada y deformada en el Cretáceo Tardío y a continuación formada por granito con añadiduras en fases posteriores que formaron el depósito mineral. (Golder Associates Perú S.A., 2010).

El Río Cañipia nace en el fundo San Martín Comunidad de Jatarana, recorre por las comunidades de Huisa, Lequemarca, y la población de Yauri, desembocando en el río Salado, presenta flujo permanente durante la temporada seca sólo en algunas secciones empinadas aguas arriba de la cuenca y aguas abajo de la confluencia con el Río Ccoloyo. En la amplia y

plana sección central de la cuenca hay numerosos cauces secos y otros con flujo intermitente asociado con descargas de agua subterránea de poca profundidad y con manantiales de caliza. (Golder Associates Perú S.A., 2010).

Estas aguas superficiales y estos flujos subterráneos de poca profundidad son captados por estructuras construidas por la población local y transportados a canales para propósitos de irrigación de cultivos y pastizales y para consumo doméstico. (Golder Associates Perú S.A., 2010).

La recarga total en la cuenca se estima entre aproximadamente 20 mm/año y 50 mm/año. Este valor se calcula a partir del valor total de agua de irrigación tomada en los canales y los flujos base medidos durante la época seca en los cursos de agua. (Golder Associates Perú S.A., 2010).

.2.4.4 VEGETACIÓN

La vegetación natural del distrito de Espinar, esta compuesta por la formación típica de Poáceas en un 70.7% denominada "pajonales", que soportan múltiples usos incluyendo el pastoreo; estos ecosistemas presentan comunidades de plantas nativas, como base del piso forrajero, con un estrato arbustivo y arbóreo muy disperso y escaso, reducido únicamente a pocas especie predominado ***Festuca orthophylla***, seguida de ***Festuca dolychophylla***, ***Plantago tubulosa*** y ***Scirpus rigidus***.(CODEPE, 2002; Cuba I., 2007). Además de Fabaceae: ***Lupinus chrysanthus*** y Cactacea: ***Echinopsis maximiliana***. (Golder Associates Perú S.A., 2010)

2.4.5 FAUNA

En la Provincia de Espinar todavía es posible encontrar poblaciones de mamíferos como las vicuñas, ciervo altoandino (*Hippocamelus antisensis*), gato del pajonal (*Leopardus pajeros*), zorro andino (*Lycalopex culpaeus*) y roedos del genero Rodentia. Las aves constituyen la fauna mas variada con un total de 59 especies que corresponden a 25 familias, las cuales ocupan todo el hábitat posible. (Golder Associates Perú S.A., 2010)

De acuerdo al IV Censo Agropecuario. INEI. 1994. En la Provincia se tiene: ovinos (363,300), camélidos (110,860), vacunos (52,341), equinos (9,131) y Caprinos (683). (CODEPE, 2002).

2.5 POBLACION Y DEMOGRAFIA

2.5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIO-ECONÓMICAS DE LA POBLACIÓN

El distrito de Espinar (Yauri), alberga para el 2007 una población de 29,581 habitantes. (INEI - Perú: Censos Nacionales 2007).

Población rural = 17 %.

Población urbana = 83 %

Población 00 -14 años = 36,6 %

Población de 15 -64 años = 58,6 %

Población 65 a mas años = 4,9 %

A partir de 1981 se produce un quiebre iniciándose un proceso acelerado de urbanización, debido a externalidades como, la puesta en operación de la explotación Minera en Tintaya, el mejoramiento de la carretera Sicuani - Arequipa. El punto de mayor dinamismo, atracción y concentración poblacional es Yauri que alberga aproximadamente el 30% de la población total provincial, convirtiéndola en una ciudad intermedia, que es parte del eje económico entre Cusco y Arequipa. (CODEPE, 2002).

La emigración temporal es marcada en los adultos en algunos meses (cosecha en los valles andinos) la permanente se da mas en los jóvenes (por los estudios).

2.5.2 SANEAMIENTO BÁSICO

En el Distrito de Espinar, el servicio de red publica de agua es limitado, el 48.9% cuentan con el servicio, mientras que el resto se abastecen del río, acequia, manantial u otras fuentes. Desagüe, tan solo del 40.4% de las viviendas presentan este servicio. (INEI Censos Nacionales 2007, XI de Población y VI de Vivienda).

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES:

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

- ✓ Muestras de aguas de los ríos Salado y Cañipia
- ✓ Cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ Cepa ATCC 13525 de *Pseudomonas fluorescens*.

3.1.2 MATERIALES PARA EL DIAGNOSTICO:

3.1.2.1 Medios de cultivo

- ✓ Muller Hinton
- ✓ CASO Agar
- ✓ Caldo Lauril sulfato triptosa
- ✓ Caldo Lactosado Verde Brillante bilis al 2%
- ✓ Caldo E.C.
- ✓ Agar Cetrimide
- ✓ Agar King's B
- ✓ Caldo Olson (Anexo N° 04)
- ✓ Bactopeptona
- ✓ Solución fisiológica al 0,85%

3.1.2.2 Antibióticos

- ✓ Amikacina
- ✓ Ciprofloxacino
- ✓ Ceftazidime
- ✓ Gentamicina
- ✓ Levofloxacino
- ✓ Tetraciclina

3.1.2.3 Metales Pesados

- ✓ Arsénico (Na AsO₂)
 - ✓ Cadmio (CdCl₂ H₂O)
 - ✓ Cobre (CuSO₄5H₂O)
 - ✓ Cromo (K₂CrO₄)
 - ✓ Hierro (FeSO₄7H₂O)
 - ✓ Manganeso (MnSO₄ H₂O)
 - ✓ Mercurio (HgSO₄)
 - ✓ Plomo (Pb(NO₃)₂)
 - ✓ Zinc (ZnSO₄)
- (Ver Anexo N° 02)

3.1.3 APARATOS Y EQUIPOS

- ✓ Autoclave.(Phoenix modelo AV-75 PLUS)
- ✓ Balanza analítica.(AND modelo GR 200)
- ✓ Refrigeradora.(Mabe)
- ✓ Horno Pasteur.(Mettler a 180°C por 1 hora)
- ✓ Incubadora.(J.P.Selecta de 35°C a 37°C)
- ✓ GPS.
- ✓ Micropipetas
- ✓ pH-metro.
- ✓ Destilador de Agua

3.1.4 MATERIAL DE VIDRIO

- ✓ Frascos de vidrio estériles de 250 y 500 ml.
- ✓ Matraz Erlenmeyer volumétrico.
- ✓ Probeta graduada
- ✓ Pipetas graduadas
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Frascos estériles de boca ancha de 500 y 250 ml.
- ✓ Tubos de ensayo con tapa rosca
- ✓ Tubos Durham

3.1.5 OTROS MATERIALES

- ✓ Cámara fotográfica (Sony CyberShot)
- ✓ Gradillas
- ✓ Algodón
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Frascos de plástico de tapa hermética
- ✓ Propipeta

3.2 METODOLOGIA:

3.2.1 UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE LOS RIOS SALADO Y CAÑIPIA - ESPINAR

Se perfilaron nueve estaciones de muestreo, siguiendo estrictamente los puntos establecidos por el Programa de Vigilancia de los Recursos Hídricos de la Dirección Regional de Salud Ambiental – Cusco (DIRESA) del río Salado y río Cañipia, el cual incluye los puntos donde descargan los efluentes provenientes de la mina Xstrata Tintaya y las zonas donde se asientan poblaciones, especialmente Yauri (ver Mapa N° 03).

CUADRO N° 04

Estaciones de Muestreo

PUNTO DE MUESTREO	LUGAR DE MUESTREO
A	Estación de Monitoreo (RT04)
B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo XSTRATA
C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya
D	Río Tintaya
E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado
F	Río Salado (Altura Puente Salado)
G	Unión Río Cañipia Y Río Salado
H	Río Cañipia altura Puente Amistad
I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)

3.2.2 RECOLECCION DE MUESTRAS DEL RIO SALADO y CAÑIPIA.

La recolección de las muestras se realizó en tres periodos en los meses de Marzo, Mayo y Junio del 2010 (Ver Anexo N° 08). Las muestras de agua se recolectaron en frascos de vidrio estéril de 250 ml en duplicado; y fueron transportadas en cadena de frío (4°C) en el tiempo más corto posible, con un tiempo no mayor a 24 horas para ser procesadas (APHA, 2005), al Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC.

3.2.3 Determinación de pH, Temperatura y Oxígeno Disuelto

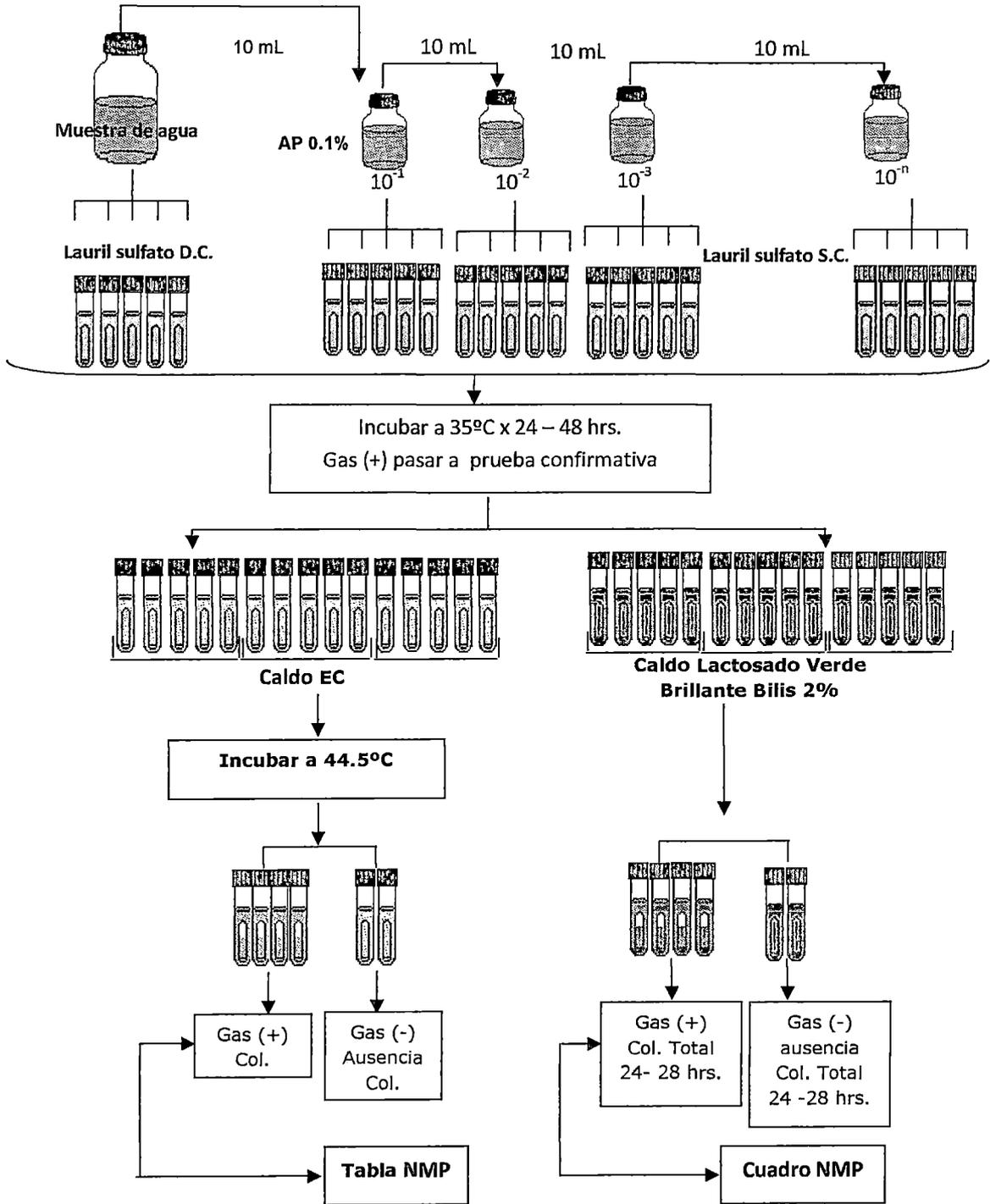
Se realizaron mediciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD) en cada punto de muestreo con el objeto de conocer las condiciones en las que se encuentra la bacteria en estudio.

La determinación del pH se realizó utilizando un pH-metro, para la temperatura se utilizó un termómetro ambiental y para la determinación de oxígeno disuelto (OD) se siguió el método de Winkler (Ver Anexo N° 03), el cual se realizó en el laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la UNSAAC.

3.2.4 Determinación de la Calidad Bacteriológica

Se determinó la presencia de coliformes totales y termotolerantes (Flujograma N° 01), parámetro que permite conocer la calidad bacteriológica de las aguas de los ríos Salado y Cañipia para su clasificación según el uso de acuerdo a la Ley de Recursos Hídricos 2009, siguiendo la técnica de número más probable (NMP) (APHA, 2005).

FLUJOGRAMA N° 01
NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, TERMOTOLERANTES EN
AGUA MÉTODO: TUBOS MÚLTIPLES DE FERMENTACIÓN (NMP)



Donde: D.C: Doble concentración.
 S.C: Simple concentración.
 A.P: Agua Peptonada.

Fuente: Métodos Normalizados – APHA, 21ªEd. 9221 B 2005

3.2.5 AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Pseudomonas spp.*

El aislamiento e identificación de las cepas de *Pseudomonas spp.* se realizó siguiendo la metodología del Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria (CLEIBA, 1984).

Para el aislamiento de las cepas de *Pseudomonas spp.* se utilizó 50 ml de Caldo Olson (Ver Anexo N° 04) para cada muestra de agua, al cual se añadió 50ml de la respectiva muestra, incubándose a 37°C por un periodo de 24 – 48 horas.

Luego de este periodo las respectivas muestras fueron sembradas por diseminación en placas petri que contenían agar Cetrimide y agar King's B y fueron incubadas a 37°C y temperatura ambiente respectivamente por un periodo de 24 – 72 horas.

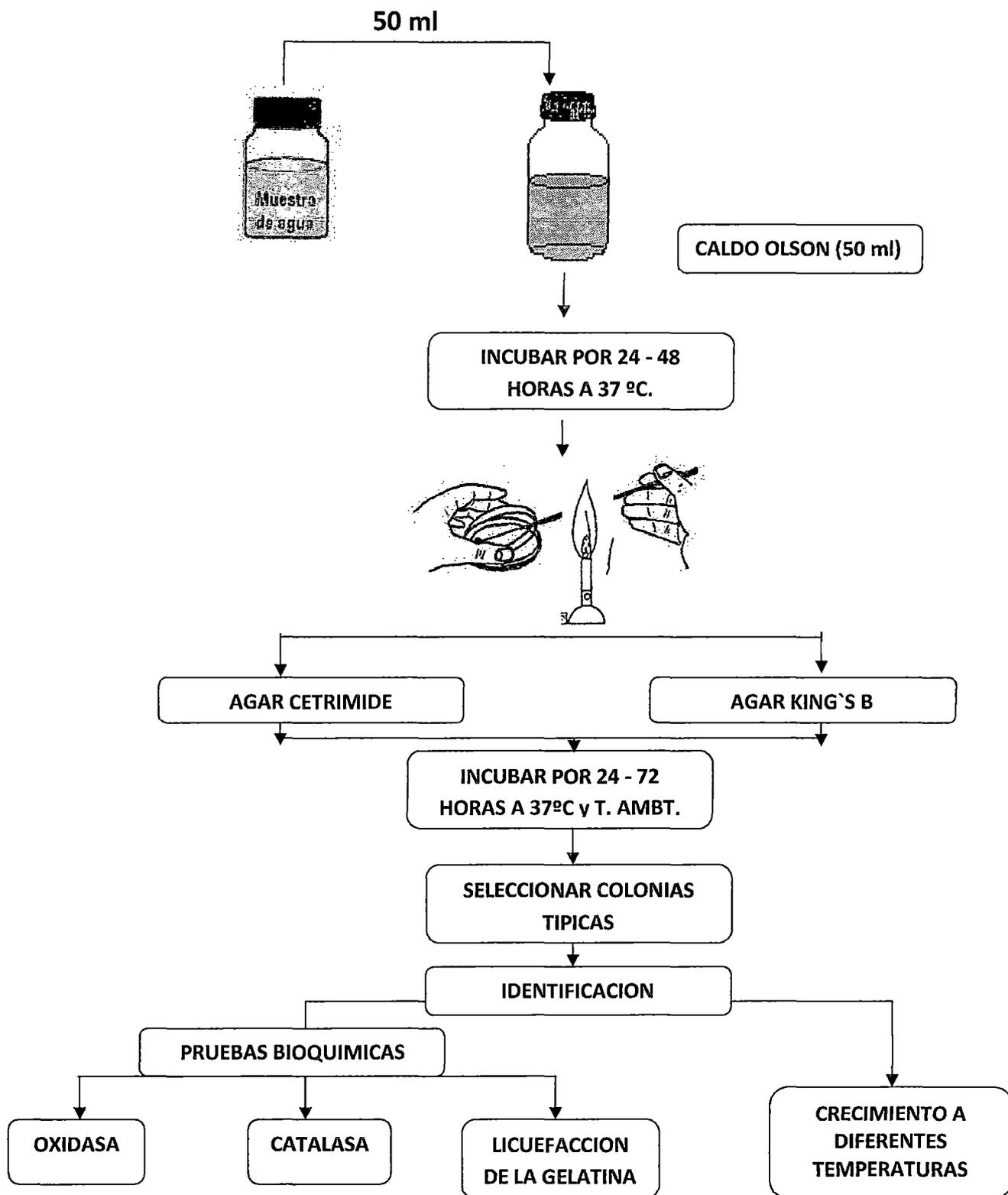
A las colonias aisladas de los medios de cultivo se les realizó la coloración Gram y las pruebas de diferenciación bioquímica para determinar la presencia del género *Pseudomonas*. (Flujograma N° 02)

3.2.5.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Pseudomonas spp.*

La identificación de las cepas aisladas de *Pseudomonas spp.* se realizó por un sistema automatizado de identificación de microorganismos (Micro Scan WALKAWAY 96). El cual se llevo a cabo en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Nacional Adolfo Guevara Velazco ESSALUD Cusco. (Ver Anexo N° 05).

FLUJOGRAMA N° 02

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas spp.*



Fuente: Manual CLEIBA, 1984; Garrity G. y col. 2004

3.2.5.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA A METALES PESADOS Y METALIODES

Para este ensayo se evaluaron 9 metales (Arsénico, Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Manganeso, Mercurio, Plomo, Zinc), los cuales se hallan reportados en las aguas de los ríos estudiados, por el programa de Vigilancia de Recursos hídricos de la Dirección Regional de Salud Ambiental Cusco – DIRESA -2010. (Ver Anexo N° 06)

A las cepas identificadas de *Pseudomonas spp.*, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a metales pesados. Para lo cual se realizó la técnica de la dilución seriada en placas de agar Mueller Hinton, adicionadas con soluciones de sales de arsénico, Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Manganeso, Mercurio, Plomo, Zinc. Dichas soluciones fueron preparadas en agua destilada estéril a diferentes concentraciones, fluctuando entre 2,5 y 3200 µg/ml. (D. Vicente A. y col., 1990; Moraga R. y col., 2003; Espinoza H., 2006)

Los inóculos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos bacterianos en agar Cetrimide, los cuales fueron diluidos en tubos con suero fisiológico estéril hasta obtener la concentración de 0.5 en la escala de Mc Farland y se procedió a la siembra, las placas inoculadas con 1µL del inóculo bacteriano, se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas, la lectura se realizó en base al crecimiento o inhibición de las bacteria. Para este proceso se incluyeron placas controles sin metales (Espinoza H. 2006), y cepas control de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

Para realizar las diluciones y determinar la concentración requerida se utilizó la siguiente fórmula:

$$x = \frac{(PM\ Sal) \times [Metal]}{(PA\ Metal)} \text{ g/L}$$

PM: Peso Molecular

[Metal]: Concentración requerida

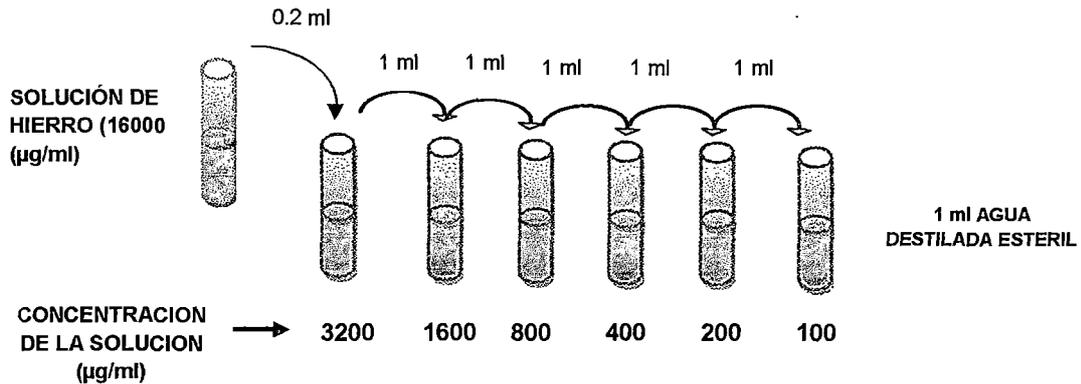
PA: Peso Atómico del Metal

X: Gramos requeridos de Sal

FLUJOGRAMA N° 03

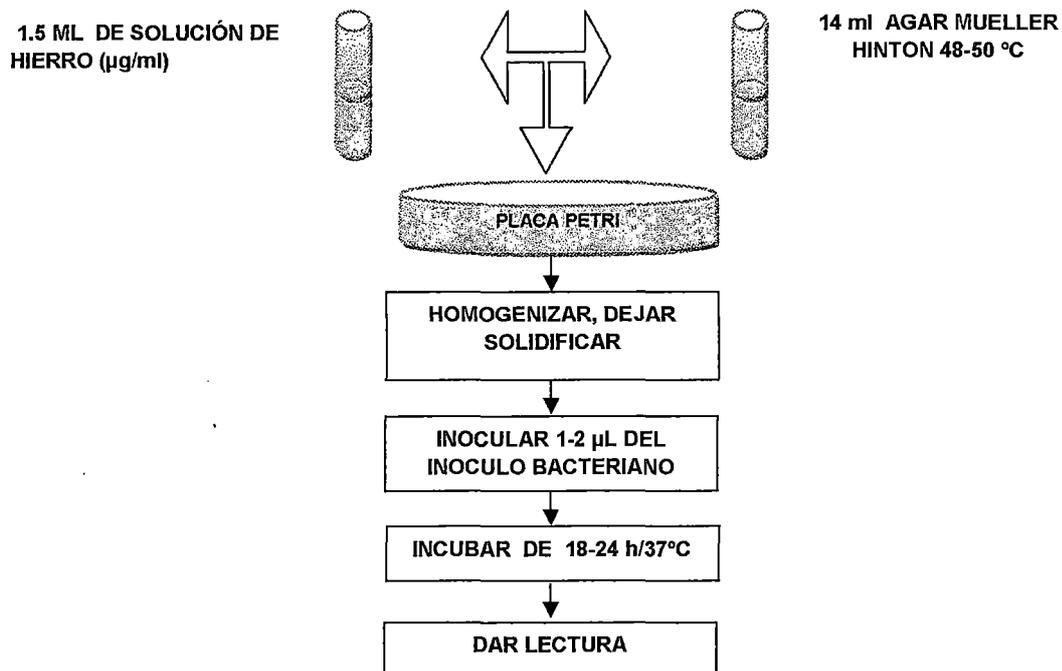
DETERMINACION DE LA CMI FRENTE A METALES PESADOS

- Preparación de la Solución del metal pesado a diferentes concentraciones



(*) Se realiza el mismo procedimiento para las diferentes soluciones de metales de acuerdo a las concentraciones requeridas.

- Preparación de las placas Petri con agar a diferentes concentraciones de metales pesados.



Fuente: Malbrán C., 2001. (Manual de Procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antimicrobianos MINSAs); Moraga R. y col. (2003); Espinoza H. (2006).

3.2.5.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Para la determinación de los niveles de resistencia se evaluaron 7 antibióticos, los cuales son recomendados para la erradicación de la bacteria como lo indica el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión – Ministerio de Salud de Perú (2002) y Malbrán C., 2006 (Clinical and Laboratory Standards Institute – C.L.S.I.). (Ver Anexo N° 07).

Se determinó la CMI a antibióticos por el método de dilución en agar (Malbrán C., 2001), y la interpretación de resultados se realizó de acuerdo a las normas establecidas por Malbrán C., 2006 (C.L.S.I.).

Para lo cual se realizó diluciones seriadas crecientes en tubos con agua destilada estéril desde 0.25 a 1024 µg/ml con los siguientes antimicrobianos: Amikacina, Ciprofloxacino, Gentamicina, Ceftazidime, Levofloxacino y Tetraciclina (D. Vicente A. y col., 1990; Espinoza H., 2006; Flores D., 2008).

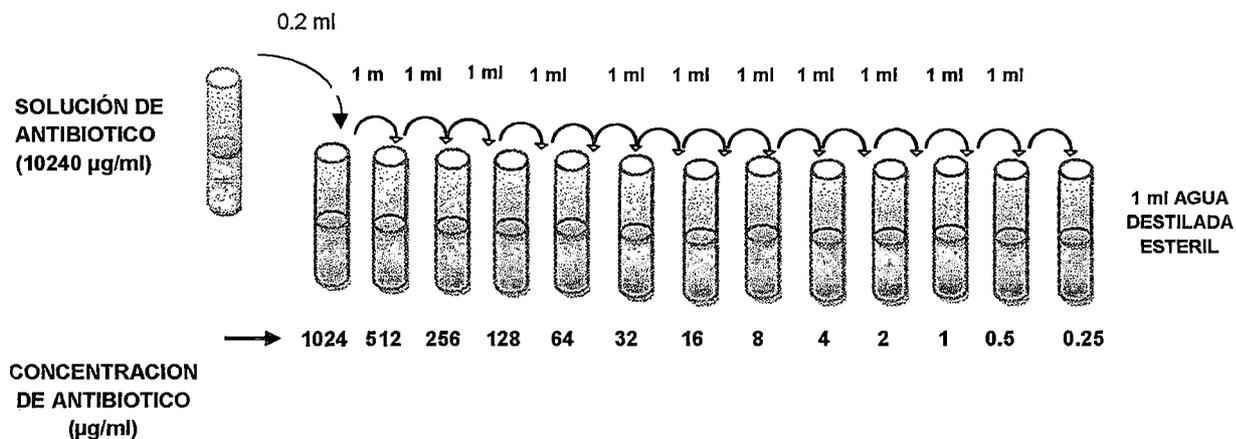
Los inóculos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos bacterianos en agar Cetrimide, los cuales fueron diluidos en tubos con suero fisiológico estéril, hasta obtener la concentración de 0.5 en la escala de Mc Farland y se procedió a la siembra, las placas inoculadas se incubaron a 37°C por 16 a 20 horas (Malbrán C., 2006). Después de este periodo se realizó la lectura en base al crecimiento o inhibición de las bacterias.

En el presente estudio se incluyó cepas control de ***Pseudomonas aeruginosa*** ATCC 27853 y ***Pseudomonas fluorescens*** ATCC 13525.

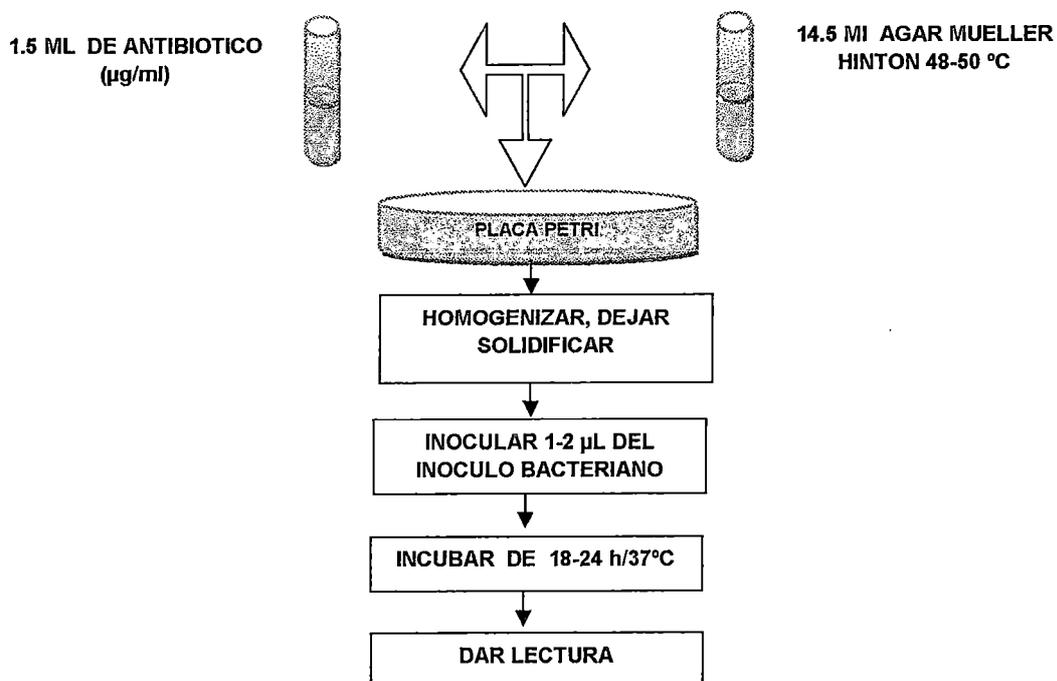
FLUJOGRAMA N° 04

DETERMINACION DE LA CMI FRENTE A ANTIBIOTICOS

- Preparación de la Solución del antibiótico a diferentes concentraciones



- Preparación de las placas Petri con agar a diferentes concentraciones de antibióticos.



Fuente: (Malbrán C., 2001). Manual de Procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antimicrobianos MINSa.

3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO:

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 19, el paquete estadístico Minitab versión 16 y Microsoft Office Excel 2007.

Para comprobar los resultados obtenidos en los ensayos frente a antimicrobianos, se utilizó: **ESTADÍSTICA NO PARAMÉTRICA: PRUEBA CHI-CUADRADO χ^2** , para dos variables independientes; dado que dicho proceso estadístico consiste en comprobar si dos características cualitativas están relacionadas entre sí.

Se tiene:

A. PARA ANTIBIÓTICOS:

I. Variables:

- 1) Tipo de antibiótico
- 2) Concentración Mínima Inhibitoria (Punto de corte).

II. Formulación de Hipótesis:

Ho: La resistencia de las *Pseudomonas* no dependen de que éstas estén expuestas a Antibióticos en concentraciones mínimas inhibitorias.

Ha: La resistencia de las *Pseudomonas* está asociada a la exposición de estas a distintos antibióticos en concentraciones mínimas inhibitorias.

III. Nivel de Significancia: 0.05

IV. Estadístico de prueba: χ^2

V. Cuadro de Contingencia: (Ver Anexo N° 17)

B. PARA METALES PESADOS:

En el caso de metales pesados, no es posible aplicar ningún tipo de estadística, puesto que se trata de datos no homogéneos, es decir la bacteria al ser sometida a diferentes concentraciones de metales, estos mismo metales presentan diferentes concentraciones entre si, basados en el grado de toxicidad del metal. Además, no se cuenta con los valores de corte para metales pesados para poder definir a una bacteria como sensible o resistente, como ocurre en el caso de los antibióticos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del presente trabajo de investigación se muestran a continuación:

4.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL RÍO SALADO Y RÍO CAÑIPIA.

CUADRO N° 05

Valores promedios de los parámetros físico-químicos evaluados de las muestras de agua.

	Estación de muestreo		T °C	pH	OD (mg/l)
Río Salado	A	Estación de Monitoreo (RT04)	12.5	7.5	7.4
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	10.5	7.5	6.4
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	9	7	7.2
	D	Río Tintaya	10.5	6.5	8.4
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	9.5	7	6.6
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	10	6.5	7.3
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	11.5	7	5.7
Río Cañipia	H	Río Cañipia altura Puente Amistad	10.5	7	6.06
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	11	6	4.1

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 08

Los resultados mostrados en el cuadro N° 05 dan a conocer los parámetros físico-químicos evaluados en ambos ríos, observándose que la temperatura no muestra diferencias significativas en los puntos evaluados de ambos ríos fluctuando entre 9 - 12.5 °C.

El pH reportado en todos los puntos muestreados se encuentran cercanos al pH neutro.

En relación a los datos de Oxígeno Disuelto, se observa que la estación de muestreo Río Cañipia (Altura puente Cañipia), reporta el valor mas bajo de OD siendo 4.1 mg/L.

4.2 RECUEENTOS BACTERIANOS

CUADRO N° 06

Recuentos Bacterianos promedios encontrados en las Muestras de Agua

Estación de muestreo		C. TOTALES NMP/100ml	C. TERMOTOL. NMP/ 100ml	<i>Pseudomonas</i> UFC/ml	
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	31	13	2,5 x 10
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	18	13	1,8 x 10
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	50	34	3,5 x 10
	D	Río Tintaya	103	46	2,8 x 10 ²
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	180	163	2,2 x 10 ²
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	357	330	2.6 x 10 ²
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	180	49	2 x 10 ²
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia altura Puente Amistad	90	63	7,8 x 10
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	16 x 10 ⁵	16 x 10 ⁵	1.7 x 10 ³

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 08 y cuadro de cálculo para obtener el NMP de M. Coliformes.

De acuerdo a los resultados promedios registrados, se observa valores altos para Coliformes totales, Coliformes termotolerantes en el punto de muestreo Río Cañipia (Altura puente Cañipia), puesto que en dicho sector se descargan las aguas residuales, producto de las actividades humanas urbanas, lo que podría estar generando un mayor vertido de materia inorgánica y orgánica en el río Cañipia, registrándose una alta contaminación.

Por los datos registrados en el cuadro N° 05 y cuadro N° 06, se clasificó a las aguas, dentro de la Categoría IV, aguas destinadas a la conservación del medio acuático y Categoría III: aguas para riego de vegetales y bebida de animales, debido a que consideran como indicadores microbiológicos a los C. totales y C. termotolerantes, esta última cat. coincide con la clasificación dada por la Dirección de Salud Ambiental – Cusco (2010).

Los recuentos obtenidos en el estudio indican la existencia de especies del género *Pseudomonas spp.* en todas las estaciones de muestreo, con mayor prevalencia en el Río Cañipia (Altura del Puente Cañipia).

La importancia de *Pseudomonas* se tornó mayor cuando se comprobó su capacidad de inhibir los coliformes, siendo los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero los cuales podrían estar inhibidos por *Pseudomonas*. (Contreras y col., 1996).

En cuanto a la prevalencia del genero *Pseudomonas* en los ambientes estudiados no se puede establecer relación con los parámetros fisicoquímicos (pH, T° y OD), como se muestra en el cuadro N° 05, debido a que no se observan diferencias significativamente entre las estaciones muestreadas. En Cambio los niveles tróficos de las aguas del rio Salado y rio Cañipia pueden influenciar la presencia de cepas de *Pseudomonas spp.*, potenciadas por la entrada de aguas servidas sin tratar debido a las actividades humanas que contribuye con sus nutrientes y aumentar la concentración de *Pseudomonas spp.* resistentes a antibióticos y metales.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas spp.*

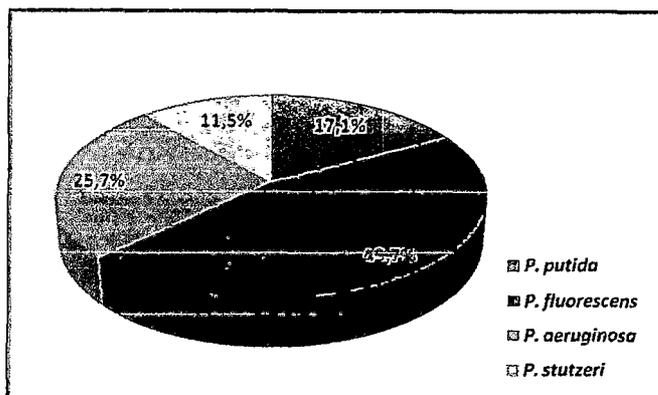
CUADRO N° 07
Porcentaje de Especies tipificadas de *Pseudomonas* aisladas de los Río Salado y Cañipia

Especies	Río Salado		Río Cañipia		Total de Cepas	
	N°	%	N°	%	N°	%
<i>P. aeruginosa</i>	5	19,2	4	44,4	9	25,7
<i>P. fluorescens</i>	13	50	3	33,3	16	45,7
<i>P. putida</i>	5	19,2	1	11,1	6	17,1
<i>P. stutzeri</i>	3	11,6	1	11,1	4	11,5
Total de cepas	26	100	9	100	35	100

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRAFICO N° 04

Porcentaje de Especies tipificadas de *Pseudomonas* aisladas de los Río Salado y Cañipia



En el cuadro N° 07 y Grafico N° 04, se observa que de las 35 cepas aisladas de *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens* es la especie mas frecuentemente identificada, con 16 cepas (45,7%), seguida de *Pseudomonas aeruginosa* con 9 cepas (25,7%), *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri* con 6 y 4 cepas respectivamente.

La mayor prevalencia de *Pseudomonas fluorescens* sugiere que estas cepas están mejor adaptadas a las temperaturas bajas de los ríos muestreados, concordando con lo expuesto por Garrity G. y col., 2004.

El cuadro N° 07, muestra que *P. fluorescens* fue especie la más representativa en el río Salado y *P. aeruginosa* en el río Cañipia, lo que demuestra que el Río Cañipia presenta mayor contaminación por materia fecal. (Ver cuadro N° 06).

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI) FRENTE A METALES PESADOS

CUADRO N° 08

Rangos de CMI ($\mu\text{g/ml}$) alcanzados por *Pseudomonas* frente a Metales Pesados

	As	Cu	Pb	Cr	Fe	Zn	Mn	Cd	Hg
CEPAS AISLADAS	35	35	35	35	35	35	35	35	35
CMI MODA	1600	1600	3200	800	1600	1600	1600	100	40
CMI (MÍN.)	200	1600	3200	400	1600	200	400	25	10
CMI (MÁX.)	3200	3200	>3200	>3200	>1600	>1600	>1600	400	80

Fuente: Elaboración propia, de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10, realizado con el paquete estadístico SPSS versión 19.

Donde:

Hg : Mercurio	Cr : Cromo
Pb : Plomo	Fe : Hierro
Cu : Cobre	Zn : Zinc
Cd : Cadmio	Mn : Manganeso
As : Arsénico	

En el cuadro N° 08 se observa los rangos de CMI alcanzadas por las cepas de *Pseudomonas*, en el cual se observa las CMI más frecuentes (MODA) mostradas por las cepas aisladas de los ríos Salado y Cañipia que fue de 3200 $\mu\text{g/ml}$ frente a Pb, 1600 $\mu\text{g/ml}$ frente As, Cu, Fe, Zn y Mn; asimismo 800 $\mu\text{g/ml}$ frente a cromo y 100 $\mu\text{g/ml}$ y 80 $\mu\text{g/ml}$ frente a Cd y Hg respectivamente.

Además de ello, en el cuadro antes descrito se muestra las CMI mínimas y máximas alcanzadas por las diferentes cepas de *Pseudomonas* frente a cada metal, apreciándose cepas resistentes a concentraciones mayores a 3200 $\mu\text{g/ml}$ frente Pb y Cr, como también a concentraciones > 1600 $\mu\text{g/ml}$ frente Fe, Zn y Mn.

4.4.1 CMI DE METALES PESADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO

CUADRO N° 09

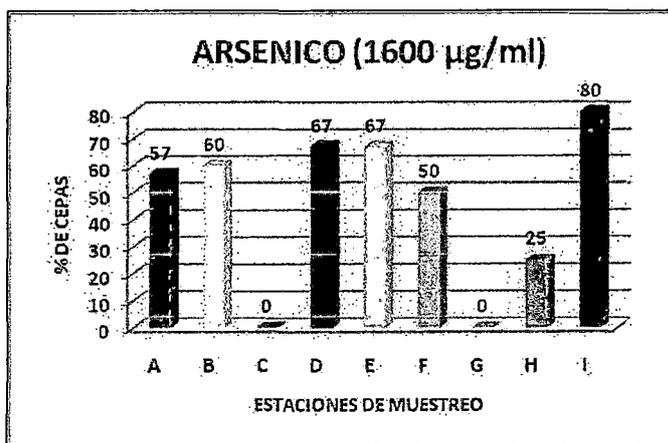
CMI de las cepas de *Pseudomonas* frente a Arsénico

	Estación		Total Cepas	As (1600 µg/ml)	
				N°	%
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	4	57
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	3	60
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	0	0
	D	Río Tintaya	3	2	67
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	2	67
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	1	50
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	0	0
RIO CAÑÍPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	1	25
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	4	80

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10.

GRÁFICO N° 05

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Arsénico



De acuerdo al Cuadro N° 09 y Grafico N° 05, la CMI más frecuente mostrada por *Pseudomonas* frente a Arsénico fue de 1600 µg/ml, en ambos ríos, registrándose un mayor porcentaje de cepas inhibidas por esta concentración en la estación de muestreo I - Río Cañipia (Altura puente Cañipia),

Los resultados expuestos coinciden con los reportados por D. Vicente A. y Marques A. y col., (1979), los cuales obtienen una alta frecuencia de resistencia frente a Arsénico. Asimismo Moraga R, y col., (2003), registra en su estudio que el 100% de cepas estudiadas presentaron una CMI mayor a 3200 µg/ml.

En respuesta la bacteria al estar expuesto a Arsénico en su hábitat desarrolla mecanismo de acumulación, lo cual le permite soportar altas concentraciones de arsénico. (Suarez P. y col., 2002).

CUADRO N° 10

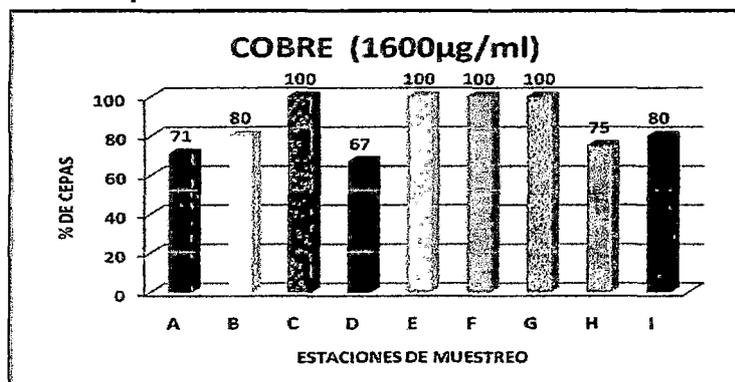
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cobre

Estación		Total Cepas	Cu (1600 µg/ml)		
			N°	%	
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	5	71
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	4	80
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	3	100
	D	Río Tintaya	3	3	67
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	3	100
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	3	100
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	3	75
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	4	80

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10.

GRAFICO N° 06

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cobre



De acuerdo al Cuadro N° 10 y Grafico N° 06, la CMI (MODA) mostrada frente a Cobre fue de 1600 µg/ml, reportándose cepas inhibidas en todos los puntos muestreados de ambos ríos, por dicha concentración.

Los datos obtenidos en el presente estudio coinciden con los de Moraga R. y col., (2003), quien en su investigación reportan que la mayoría de cepas de *Pseudomonas* alcanzaron una CMI de 1600 µg/ml, asimismo indicar la presencia se cepas resistentes a concentraciones de 3200 µg/ml en el punto de muestreo A, B, D, H, I (Anexo N° 09 y 10), estos resultados difieren por que el área de estudio es una zona minera de cobre.

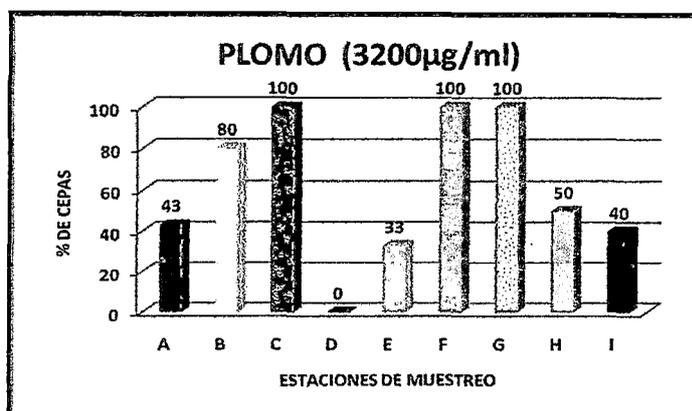
CUADRO N° 11

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Plomo

Estación		Total Cepas	Pb (3200 µg/ml)		
			N°	%	
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	3	43
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	4	80
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	3	100
	D	Río Tintaya	3	0	0
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	1	33
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	3	100
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	2	50
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	2	40

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10.

GRÁFICO N°07
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Plomo



En el Cuadro N° 11 y Gráfico N° 07, se muestra que la concentración de 3200 µg/ml de Plomo fue la CMI mas frecuente reportada por las cepas de *Pseudomonas*, apreciándose que el 100% de cepas aisladas de la estación de muestreo C, F y G presentaron inhibición frente a dicha concentración, seguida del punto B donde se reporta un 80 % de cepas inhibidas.

Respecto a las estaciones de muestreo del A, E, H e I se reportaron por encima del 30 % de cepas con CMI a 3200 ug/ml frente a plomo.

Estos resultados coinciden con los reportados por D. Vicente A. y col., (1990), que registra un alto porcentajes de cepas resistentes a la misma concentración del presente estudio, mientras que Moraga R. y Col., (2003), reporta un 100% de cepas con CMI >3200 µg/ml.

Esta elevada resistencia mostrada por las cepas de *Pseudomonas* frente al plomo puede atribuirse a que dicho elemento se encuentra relativamente abundante en la naturaleza. La mayor parte de plomo contaminante es de origen antropogénicos producto de actividades tales como la minería, de donde se extrae de minas junto con otros metales como plata, oro y cobre. Igualmente es importante señalar que en los márgenes del río Cañipia se acentúan talleres de mecánica que vierten sus residuos (Aceites, combustibles, etc.) al río, esto conduciría a que estas cepas presenten tal resistencia. (Suarez P. y col. 2002; Garrity G. y col., 2004).

CUADRO N° 12

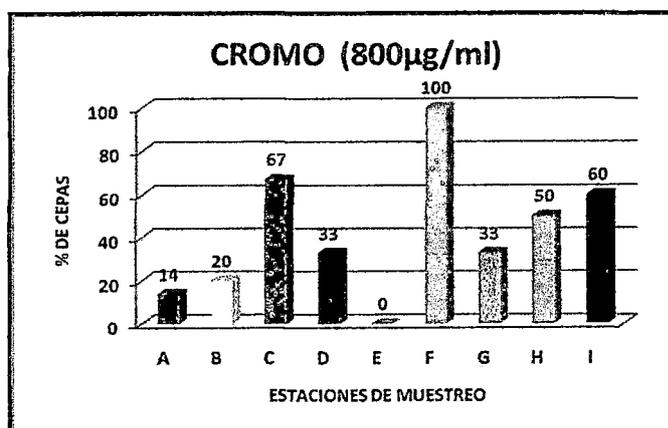
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cromo

Estación		Total Cepas	Cr (800 µg/ml)		
			N°	%	
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	1	14
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	1	20
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	2	67
	D	Río Tintaya	3	1	33
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	0	0
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	1	33
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	2	50
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	3	60

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRÁFICO N° 08

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cromo



Como se muestra en el Cuadro N° 12 y Grafico N° 08, la CMI (MODA) frente a Cromo fue 800 µg/ml. siendo la estación de muestreo F donde se reportó un 100% de cepas inhibidas a dicha concentración, continuadas por las estaciones de muestreo C, I y H que muestran entre el 50 a 67 % de cepas con CMI de 800 µg/ml de Cromo. Cabe resaltar que la CMI más alta obtenida frente a Cromo fue > 3200 µg/ml (Cuadro N° 08). Con respecto a la estación de muestreo E, se observa que este punto recibe el efluente del Río

Tintaya los que estaría influenciando la presencia de Cepas con CMI mayor a las observadas en los puntos anteriores.

El presente estudio muestra altos niveles de resistencia a diferencia de los obtenidos en similares estudios como el de Moraga R. y col., (2003) y D. Vicente A. y col., (1990), los que reportan CMI de 400 µg/ml.

CUADRO N° 13

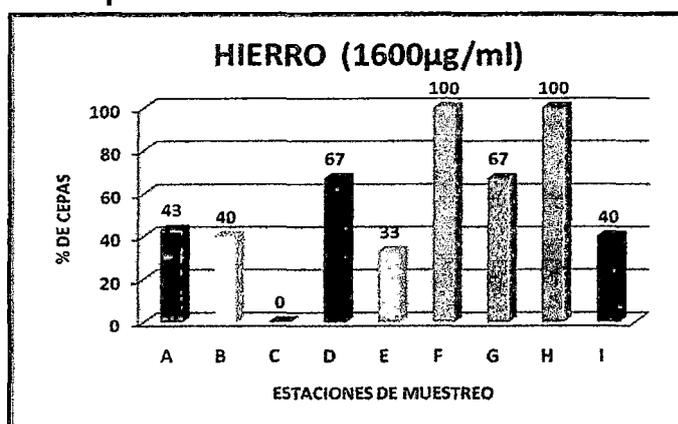
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Hierro

Estación			Total Cepas	Fe (1600 µg/ml)	
				N°	%
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	3	43
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	2	40
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	0	0
	D	Río Tintaya	3	2	67
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	1	33
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	2	67
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	4	100
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	2	40

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10.

GRÁFICO N° 09

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Hierro



En el Cuadro N° 13 y Grafico N° 09, se muestra que la CMI más frecuente alcanzada frente a Hierro por las cepas aisladas de *Pseudomonas* fue 1600

µg/ml. registrándose el 100% de cepas resistentes para el punto F y H seguido de las estaciones D, G, donde se reportan porcentajes semejantes de cepas resistentes, en tanto: C no muestras cepas resistentes a la concentración indicada debido a que alcanzaron concentraciones mayores a 1600 µg/ml. (Anexo N° 09 y 10)

Los altos niveles de resistencia registrados por *Pseudomonas* en el estudio sugieren que se debe a la presencia de hierro en las aguas de los ríos Salados y Cañipia como lo reporta Golder Associates Perú S.A.

CUADRO N° 14

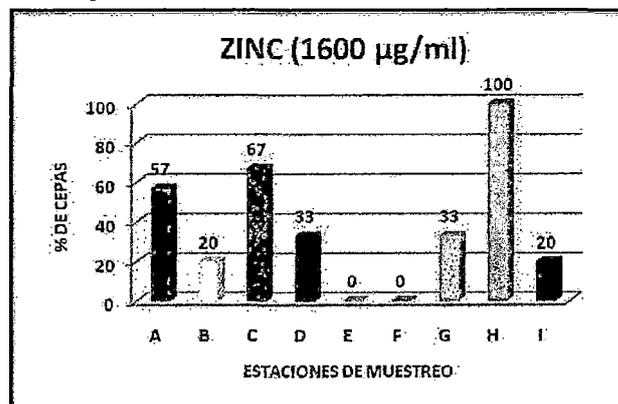
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Zinc

Estación			Total Cepas	Zn (1600 µg/ml)	
				N°	%
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	4	57
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	1	20
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	2	67
	D	Río Tintaya	3	2	33
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	0	0
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	0	0
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	1	33
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	4	100
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	1	20

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRÁFICO N° 10

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Zinc



En el Cuadro N° 14 y Grafico N° 10; los resultados muestran como CMI mas frecuente frente a Zinc la concentración de 1600 µg/ml, apreciándose que en la estación de muestreo H perteneciente al Rio Cañipia el 100% de cepas aisladas de *Pseudomonas* presentan una CMI de 1600 µg/ml. seguido de la estación C con un 67% de cepas resistentes, mientras que en la estaciones E y F no se registran cepas resistentes a dicha concentración.

D. Vicente A. y col., (1990), obtuvieron un 90% de cepas de *Pseudomonas* mayor a 1600 µg/ml., en tanto Moraga reporta que el 100% de sus cepas aisladas alcanzaron una CMI menor a 800 µg/ml.

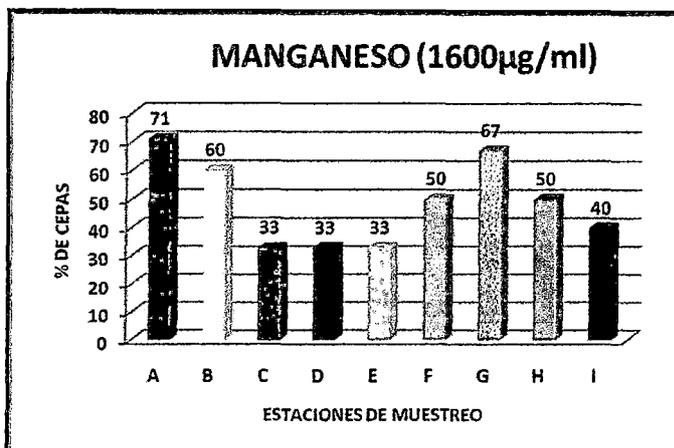
CUADRO N° 15

CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Manganeso

	Estación		Total cepas	Mn (1600 µg/ml)	
				Nº	%
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	5	71
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	3	60
	C	Aguas Arriba unión Rio Salado y Rio Tintaya	3	1	33
	D	Rio Tintaya	3	1	33
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	1	33
	F	Rio Salado (Altura Puente Salado)	2	1	50
	G	Unión Rio Cañipia Y Rio Salado	3	2	67
RIO CAÑIPIA	H	Rio Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	2	50
	I	Rio Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	2	40

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRÁFICO N° 11
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Manganeso



Con respecto a la resistencia mostrada frente a Manganeso según el Cuadro N° 15 y grafico N° 11, se aprecia que la CMI mas frecuente obtenido para éste, fue de 1600 µg/ml. Reportándose en todas las estaciones de muestreo de ambos ríos, siendo el mayor porcentaje de cepas resistentes (71%) en la estación A.

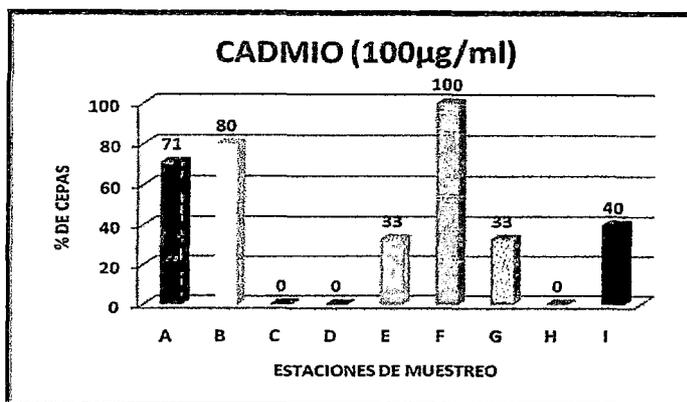
Se conoce que *Pseudomonas* presenta mecanismos de adaptación lo que conlleva a registrar altos niveles de resistencia. (Garrity G., 2004)

CUADRO N° 16
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cadmio

Estación			Total Cepas	Cd (100 µg/ml)	
				N°	%
RIO SALADOH	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	5	71
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	4	80
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	0	0
	D	Río Tintaya	3	0	0
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	1	33
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	1	33
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	0	0
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	2	40

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRÁFICO N° 12
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Cadmio



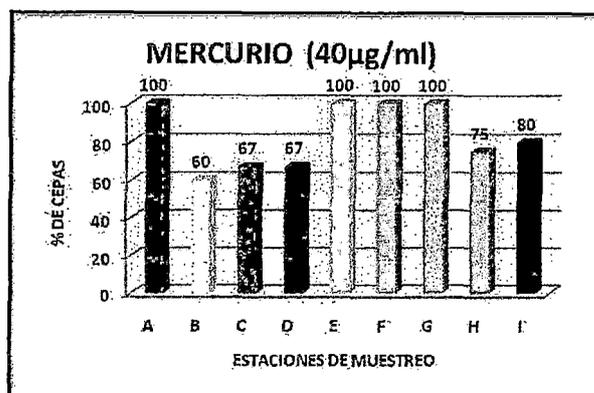
En el Cuadro N° 16 y Gráfico N° 12, se muestra que la concentración de 100 µg/ml de Cadmio fue la CMI más frecuente reportada por las cepas de *Pseudomonas*, observándose que en los puntos F seguido del B y A los mayores porcentajes de cepas inhibidas a la mencionada CMI, cabe resaltar que la CMI máxima frente a Cadmio reportando en el presente estudio, fue de 400 µg/ml (cuadro N° 08) al confrontar los resultados estos muestran cierta similitud con el estudio realizado por Moraga R. y col., (2003), quien registra CMI menores a 200 µg/ml. Sin embargo en el presente estudio también se observan cepas resistentes a concentraciones de 400 µg/ml.

CUADRO N° 17
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Mercurio

Estación		Total Cepas	Hg (40 µg/ml)		
			N°	%	
RIO SALADO	A	Estación de Monitoreo (RT04)	7	7	100
	B	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	5	3	60
	C	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3	2	67
	D	Río Tintaya	3	2	67
	E	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3	3	100
	F	Río Salado (Altura Puente Salado)	2	2	100
	G	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3	3	100
RIO CAÑIPIA	H	Río Cañipia (Altura Puente Amistad)	4	3	75
	I	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	5	4	80

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 09 y Anexo N° 10

GRÁFICO N° 13
CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Mercurio



Según el Cuadro N° 17 y grafico N° 13, se aprecia que la CMI reportada para Mercurio fue de 40 µg/ml, observándose el mayor nivel de resistencia en los puntos de muestreo A, E, F, y G, en tanto que en el resto de los puntos se observa similitud en cuanto al porcentaje de cepas resistentes.

En el estudio realizado por Silva J. y col., (1999), las cepas aisladas de *Pseudomonas* alcanzaron niveles de CMI superiores a 200 µg/ml, mientras que nuestros resultados el total de cepas de *Pseudomonas* alcanzaron 40 µg/ml de CMI. En tanto Moraga R. y col., (2003), reporto que el 100% de las cepas de *Pseudomonas* mostraron una CMI menor a 10 µg/ml.

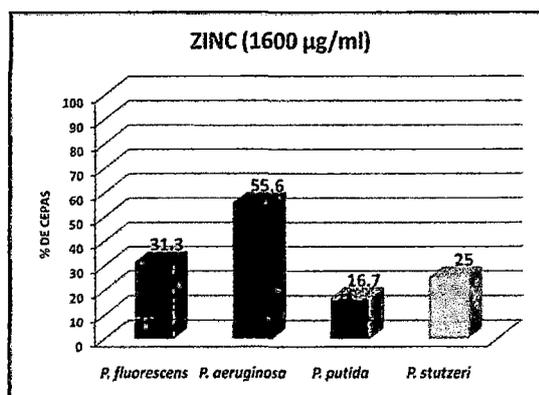
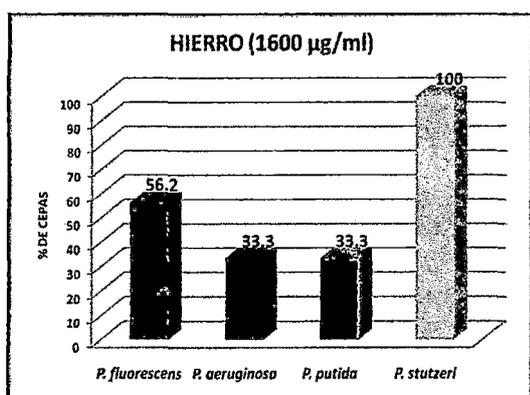
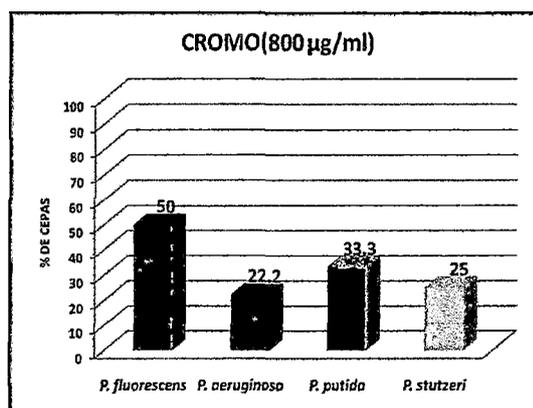
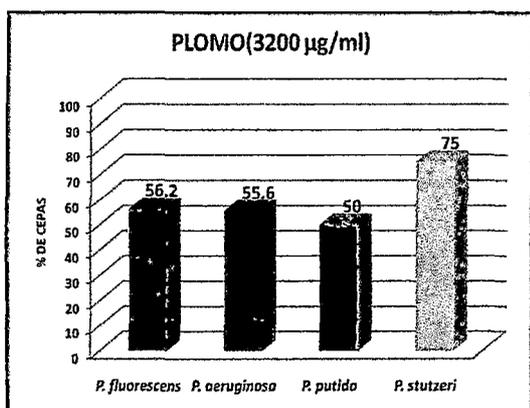
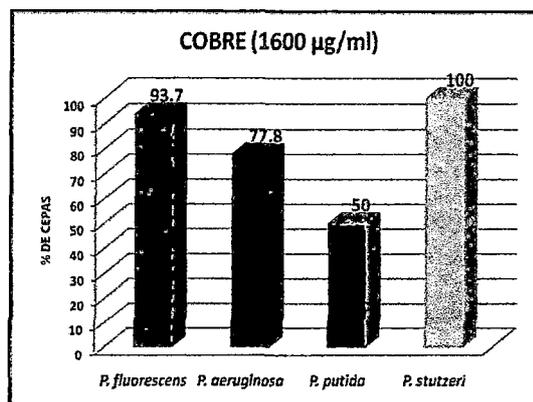
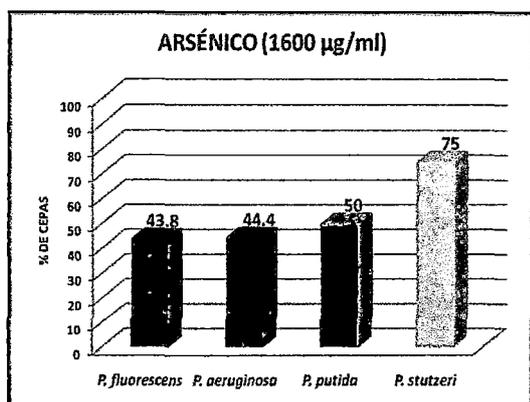
CUADRO N° 18
Comparación de la resistencia a los metales pesados de las especies de *Pseudomonas* aisladas.

PORCENTAJE DE RESISTENCIA (CMI µg/ml)										
Especies	N° Cepas	As 1600	Cu 1600	Pb 3200	Cr 800	Fe 1600	Zn 1600	Mn 1600	Cd 100	Hg 40
<i>P. fluorescens</i>	16	43.8	93.7	56.2	50	56.2	31.3	56.2	37.5	87.5
<i>P. aeruginosa</i>	9	44.4	77.8	55.6	22.2	33.3	55.6	44.4	44.4	55.6
<i>P. putida</i>	6	50	50	50	33.3	33.3	16.7	33.3	50	83.4
<i>P. stutzeri</i>	4	75	100	75	25	100	25	75	75	100

Fuente: Elaboración propia de acuerdo al Anexo N° 11

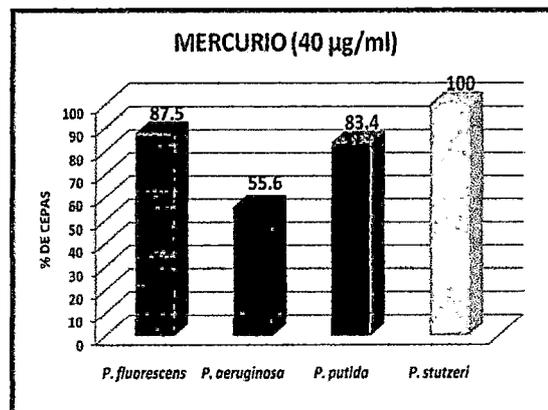
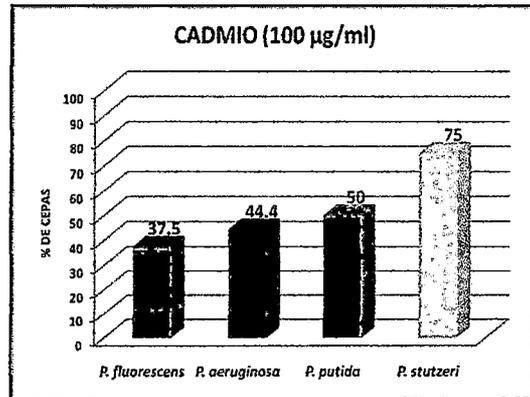
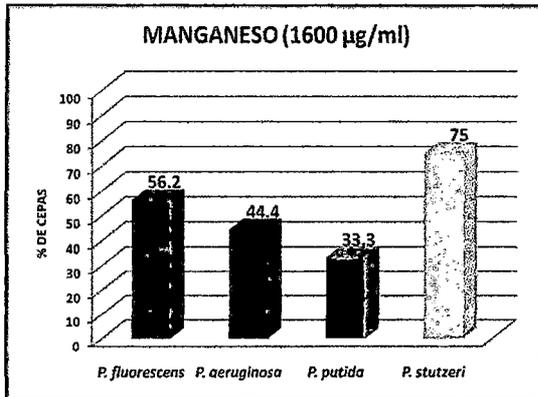
GRAFICO N° 14

Comparación de la resistencia a los metales pesados de las especies de *Pseudomonas* aisladas.



//...

...//



Como se aprecia en el Cuadro N° 18 y Grafico N° 14, la comparación de resistencia entre las especies aisladas de *Pseudomonas*, frente a los diferentes metales ensayados muestra que las cepas de *P. stutzeri* presentan de 75-100% la CMI de 1600 frente a As, Cu, Fe y Mn, 3200 µg/ml frente a Pb, 100 µg/ml y 40 µg/ml frente a Cd y Hg respectivamente.

Seguido por *P. fluorescens* que reporta un 50 a 94% de sus cepas la CMI 1600 frente a Cu, Fe y Mn, 3200 µg/ml frente a Pb, 40 µg/ml frente a Hg.

Asimismo el 87.5 % *P. aeruginosa* presenta CMI más frecuente 40 µg/ml frente a mercurio seguida de *P. putida* con un 83.4%.

Estos resultados sugieren la presencia de determinantes genéticos en las células bacterianas que estarían confiriendo esta capacidad de resistencia (Moraga R. y col., 2003)

En las pruebas ensayadas frente a los diferentes metales pesados, se utilizaron cepas patrón como: *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. fluorescens* ATCC 13525, las cuales mostraron CMI bajas con respecto a las cepas aisladas (Ver Anexo N° 09).

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA A ANTIBIÓTICOS

CUADRO N° 19

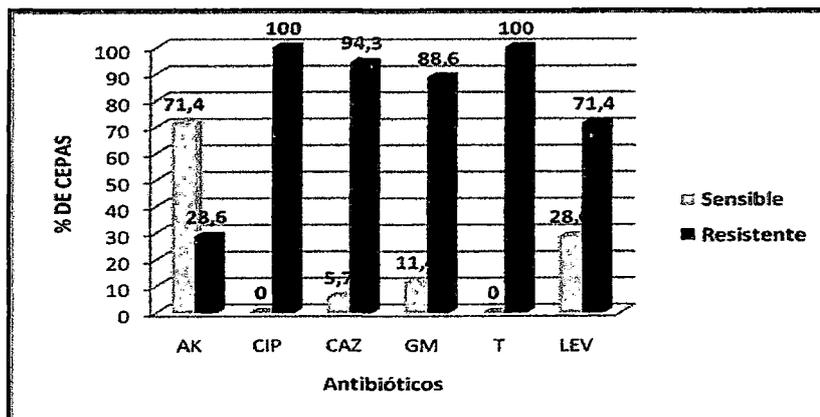
Porcentaje de Susceptibilidad y Resistencia a Antibióticos del Total de Cepas de *Pseudomonas*

Antibiótico	Total de cepas	Cepas Sensibles		Cepas Resistentes	
		N°	%	N°	%
Amikacina	35	25	71,4	10	28,6
Ciprofloxacino	35	0	0	35	100
Ceftazidime	35	2	5,7	33	94,3
Gentamicina	35	4	11,4	31	88,6
Tetraciclina	35	0	0	35	100
Levofloxacino	35	5	28,6	30	71,4

Fuente: Elaboración propia; redactado de acuerdo a los valores de corte de las CMI establecidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006. (Ver Anexo N° 12 y Anexo N° 13).

GRAFICO N° 15

Porcentaje de Susceptibilidad (S) y Resistencia (R) a Antibióticos del Total de Cepas de *Pseudomonas*



Donde:

AK : Amikacina

CIP: Ciprofloxacino

CAZ : Ceftazidime

GM : Gentamicina

T : Tetraciclina

LEV : Levofloxacino

Según el cuadro N° 19 y gráfico N° 15, se observa que de las cepas aisladas de *Pseudomonas* el mayor porcentaje muestran resistencia frente a los diferentes antibióticos evaluados a excepción de Amikacina donde se observa que el 71,4% de las cepas aisladas son sensibles.

La determinación de los porcentajes de resistencia o susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Pseudomonas* fueron ensayadas mediante los valores de corte de las CMI establecidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (C.L.S.I) 2006. Un gran número de cepas exhibieron alta resistencia a los antimicrobianos, que va desde una CMI de 0,25 a 1024 µg/ml., cuyo resultado muestra que el 100 % de las cepas son resistentes a Ciprofloxacino y Tetraciclina, seguido de Ceftazidime con 94.3%, Gentamicina con 88.6% y Levofloxacino con 85.7% y solo 28.6% del total de cepas muestran resistencia frente a Amikacina.

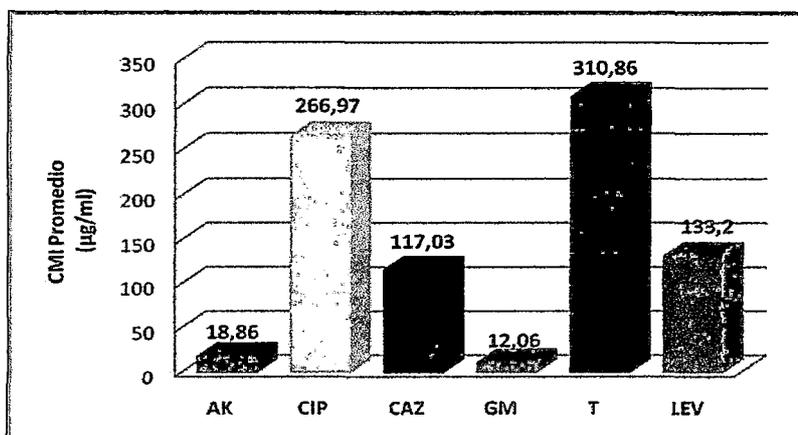
CUADRO N° 20

Rangos de CMI (µg/ml) alcanzados por *Pseudomonas* frente a diferentes Antibióticos

	AK	CIP	CAZ	GM	T	LEV
Cepas aisladas	35	35	35	35	35	35
CMI (Promedio)	18,86	266,97	117,03	12,06	310,86	133,214
Moda	16	256	32	8	256	8
CMI (min.)	4	64	8	2	64	0,25
CMI (max.)	64	1024	512	32	>1024	64,00

Fuente: Elaboración propia, de acuerdo al Anexo N° 12, realizado con el paquete estadístico SPSS versión 19

GRÁFICO N° 16
CMI Promedios Observados en *Pseudomonas*



De acuerdo al Cuadro N° 20 y Gráfico N° 16, la CMI promedio mayor es reportada para Tetraciclina (310,86 µg/ml), y la menor CMI promedio observada se da frente a Gentamicina (12,06 µg/ml).

En el cuadro N° 20, se muestran los rangos de las CMI de los diferentes antibióticos investigados en el total de cepas estudiadas, mostrando el mayor rango Levofloxacino (de 0,25 – 64 µg/ml), seguida de Tetraciclina (34 - >1024 µg/ml).

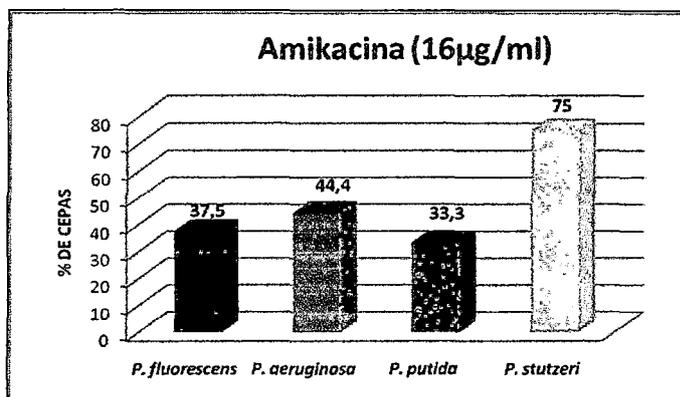
CUADRO N° 21
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Amikacina

Especie	Total de Cepas	AK (16 µg/ml)	
		N°	%
<i>P. fluorescens</i>	16	6	37,5
<i>P. aeruginosa</i>	9	4	44,4
<i>P. putida</i>	6	2	33,3
<i>P. stutzeri</i>	4	3	75
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 16 µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 17

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Amikacina



En el Cuadro N° 21 y Gráfico N° 17, la CMI frecuente reportada para Amikacina fue de 16µg/ml, observándose que de acuerdo al punto de corte dado por la C.L.S.I. (2006), la mayoría de cepas aisladas son sensibles al antibiótico. Asimismo se muestra que el 75% de las cepas de *P. Stutzeri* presentan la CMI mencionada.

De acuerdo a los resultados obtenidos se muestra una mayor susceptibilidad frente a Amikacina, apreciándose que la minoría de las cepas aisladas muestran resistencia frente al antibiótico, en tanto que los resultados reportados por D. Vicente M. y col. (1990), encuentran que todas las cepas aisladas son resistentes frente a Amikacina.

Esta susceptibilidad observada frente a Amikacina, se da por el mecanismo de acción que tiene el antibiótico frente a la bacteria, por mecanismos moleculares (resistencia adquirida), además Amikacina tiende a ser especialmente efectiva en contra de organismos resistentes, como *Pseudomonas*. (Garrity G. 2004; Barranco E., 2005; Perez. M. y col., 2006).

CUADRO N° 22

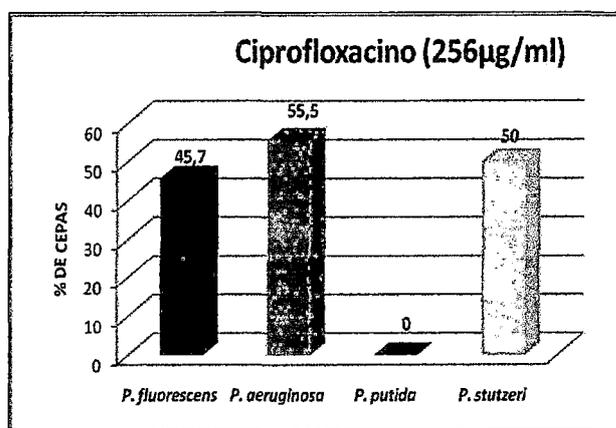
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Ciprofloxacino

Especie	Total de Cepas	CIP (256 µg/ml)	
		N°	%
<i>P. fluorescens</i>	16	7	45,7
<i>P. aeruginosa</i>	9	5	55,5
<i>P. putida</i>	6	0	0
<i>P. stutzeri</i>	4	2	50
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 1 µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 18

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Ciprofloxacino



Según el Cuadro N° 22 y Gráfico N° 18, la CMI mas frecuente reportada para Ciprofloxacino fue 256 µg/ml, apreciándose que la mayoría de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* presentan dicha concentración (55.5%), en tanto que *P. putida* no presentó cepas que llegaron a la concentración mencionada. Además se muestra que de acuerdo al punto de corte dado por C.L.S.I. (2006), todas las cepas aisladas de *Pseudomonas* son resistentes a Ciprofloxacino.

En cuanto a la resistencia mostrada frente a Ciprofloxacino por el total de cepas aisladas en el presente trabajo de investigación, se puede sugerir que dicha resistencia se da a que Ciprofloxacino es un antibiótico utilizado con mucha frecuencia en nuestra sociedad, y se presume que por la disposición de aguas servidas sin tratamiento, se llegó a contaminar las aguas estudiadas con cepas resistentes al antibiótico, por ende *Pseudomonas* por medio de sus factores de virulencia ha generado alta resistencia frente al antibiótico en mención. (Cué M. y col., 2005; Pérez. M. y col., 2006).

CUADRO N° 23

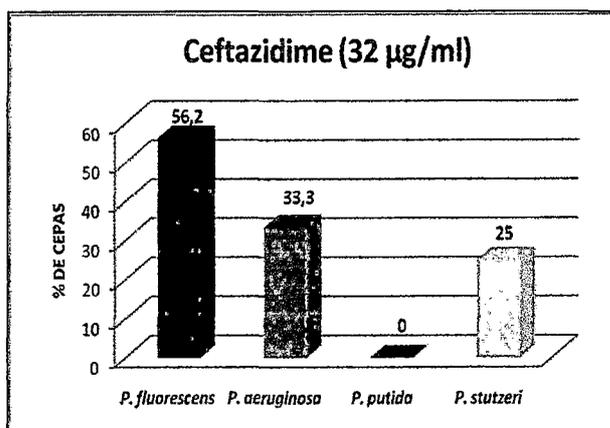
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Ceftazidime

Especie	Total de Cepas	CAZ (32 µg/ml)	
		Nº	%
<i>P. fluorescens</i>	16	9	56,2
<i>P. aeruginosa</i>	9	3	33,3
<i>P. putida</i>	6	0	0
<i>P. stutzeri</i>	4	1	25
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 8µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 19

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Ceftazidime



En el Cuadro N° 23 y Gráfico N° 19, la CMI reportada para Ceftazidime fue 32 µg/ml, observándose que *P. fluorescens* fue la especie con mayor número de cepas (56,2%) que alcanzaron esta concentración, seguida de *P. aeruginosa* (33,3 %).

En relación al estudio de resistencia a Ceftazidime, se encontró que las cepas aisladas de los ríos Salado y Cañipia (94,3% de cepas) presentaron una resistencia elevada frente a dicho antibiótico, a pesar de que muchos autores afirman que Ceftazidime es la Cefalosporina de más alta actividad contra *Pseudomonas* y de todo el grupo sólo Ceftazidime ha demostrado tener una confiable actividad bactericida sobre la bacteria. (Davalos M., 1998; Mesna J. y col., 2008).

CUADRO N° 24

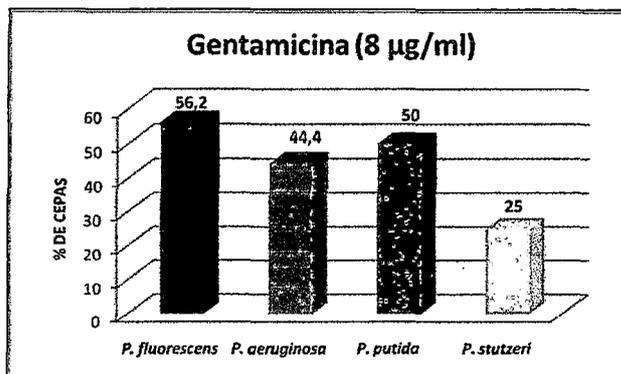
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Gentamicina

Especie	Total de Cepas	GM (8 µg/ml)	
		N°	%
<i>P. fluorescens</i>	16	9	56,2
<i>P. aeruginosa</i>	9	4	44,4
<i>P. putida</i>	6	3	50
<i>P. stutzeri</i>	4	1	25
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 4µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 20

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Gentamicina



El Cuadro N° 24 y Gráfico N° 20, muestra la CMI mas frecuente reportada para Gentamicina fue 8 µg/ml, observándose que la mayoría de cepas aisladas presentan dicha CMI, siendo *P. fluorescens* quien tiene tuvo mayor porcentaje de cepas resistentes (56,2%). Además se observa que la mayoría de las cepas aisladas son resistentes al antibiótico, de acuerdo al punto de corte dada por la C.L.S.I., (2006).

La alta resistencia observada frente a Gentamicina asemeja con los resultados obtenidos por D. Vicente M. y col. (1990), quienes encontraron que un gran numero de cepas aisladas de *Pseudomonas* (> 95%) son resistentes a dicho antibiótico, en tanto Marques A. y col. (1979) obtuvieron que el total de sus cepas aisladas son resistentes a Gentamicina.

Esta resistencia observada en los ensayos, sugiere que las cepas de *Pseudomonas* desarrollaron mecanismos de defensa frente a él, produciendo enzimas que inactivan al fármaco, bloqueando el ingreso del fármaco al interior de la célula y produciendo alteración en el receptor 30S, por mutación cromosómica. (Barranco E., 2005).

CUADRO N° 25

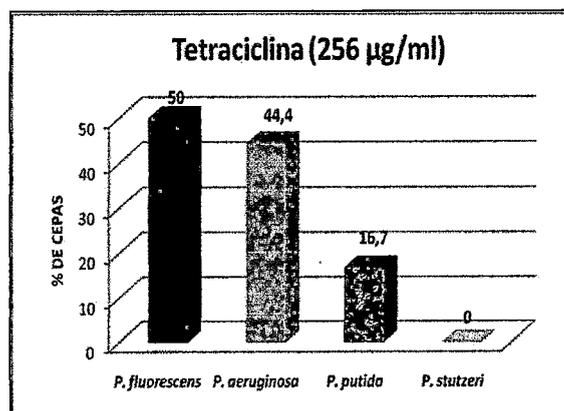
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Tetraciclina

Especie	Total de Cepas	T (256 µg/ml)	
		N°	%
<i>P. fluorescens</i>	16	8	50
<i>P. aeruginosa</i>	9	4	44,4
<i>P. putida</i>	6	1	16,7
<i>P. stutzeri</i>	4	0	0
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 4µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 21

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Tetraciclina



El Cuadro N° 25 y Gráfico N° 21, muestra que la CMI reportada para Tetraciclina fue 256 µg/ml, observándose que mediante los valores de corte de las CMI establecidas por la CLSI (Anexo N° 13), todas las cepas aisladas de *Pseudomonas* son resistentes al antibiótico. Asimismo se observa que *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* presentaron mayor numero de cepas que alcanzaron dicha concentración.

La pérdida de susceptibilidad a Tetraciclina, sugiere que es por su uso indiscriminado, lo cual genera cepas resistentes. (Pérez E. y col., 2003; Mendoza N. y col., 2009).

CUADRO N° 26

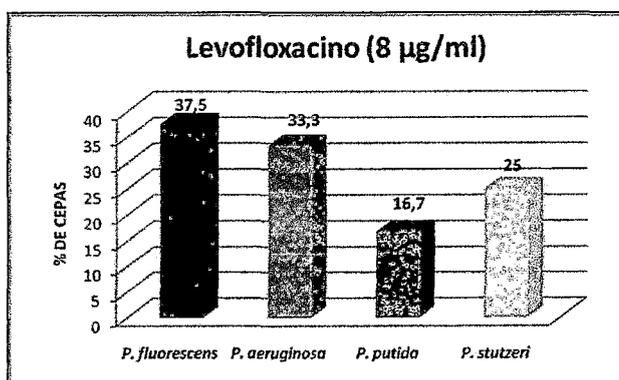
Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Levofloxacino

Especie	Total de Cepas	LEV (8 µg/ml)	
		N°	%
<i>P. fluorescens</i>	16	6	37,5
<i>P. aeruginosa</i>	9	3	33,3
<i>P. putida</i>	6	1	16,7
<i>P. stutzeri</i>	4	1	25
Punto de corte	Sensible (S) = ≤ 2µg/ml		

Fuente: Elaboración propia: realizado de acuerdo al Cuadro N° 20 y Anexo N° 15

GRÁFICO N° 22

Determinación de la CMI de las cepas aisladas de *Pseudomonas* frente a Levofloxacino



De acuerdo al Cuadro N° 26 y Gráfico N° 22, la CMI reportada para Levofloxacino fue 8 µg/ml, apreciándose que 6 cepas de *P. fluorescens* presentan mencionada concentración, del mismo modo se observa que la mayoría de cepas aisladas son resistentes al dicho antibiótico, de acuerdo los puntos de corte de CMI dada por el C.L.S.I., (2006).

Esta alta resistencia mostrada por *Pseudomonas* frente a Levofloxacino es causada por la mutación ejercida por la bacteria, estimulada por su extenso uso o por un inconcluso tratamiento con el antibiótico. (Garrity G. y col., 2004; Cué M. y col., 2005).

Estos resultados sugieren que esta elevada capacidad de resistencia frente a los antibióticos esta dada por la presencia de arreglos genéticos conferidos por plásmidos en las cepas de *Pseudomonas*. (Moraga R. y col., 2003; Garrity G. y col., 2004).

En relación a la multiresistencia que presentan las cepas de *Pseudomonas* aisladas de los diferentes puntos de muestreo se encontró cepas multiresistentes que incluían de 2 hasta 7 antibióticos simultáneamente, datos que coinciden con los reportados por Marques A. y col. (1979) y D. Vicente M. y col. (1990), esto representa un peligro potencial para la salud humana ya que estas cepas multiresistentes de *Pseudomonas* pueden producir infecciones y llegar a ser fatales, por la imposibilidad de administrar algún antibiótico que erradique la bacteria.

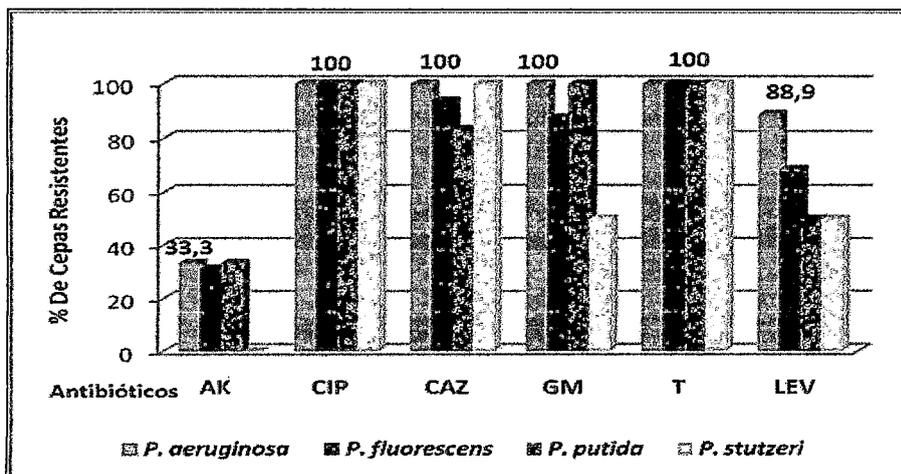
CUADRO N° 27
Distribución de la Resistencia de las Distintas Especies de
***Pseudomonas* Frente a los Antibióticos**

Especies de <i>Pseudomonas</i>	Total de Cepas	Porcentaje de Cepas Resistentes											
		AK		CIP		CAZ		GM		T		LEV	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>P. aeruginosa</i>	9	3	33,3	9	100	9	100	9	100	9	100	8	88,9
<i>P. fluorescens</i>	16	5	31,2	16	100	15	93,7	14	87,5	16	100	11	68,7
<i>P. putida</i>	6	2	33,3	6	100	5	83,3	6	100	6	100	3	50
<i>P. stutzeri</i>	4	0	0	4	100	4	100	2	50	4	100	2	50

Fuente: Elaboracion propia, realizado de acuerdo al Anexo N° 12

GRAFICO N° 23

Distribución de la Resistencia de las Distintas Especies de *Pseudomonas* Frente a los Antibióticos



Donde:

AK : Amikacina

CIP: Ciprofloxacino

NAL : Acido Nalidixico

CAZ : Ceftazidime

GM : Gentamicina

T : Tetraciclina

LEV : Levofloxacino

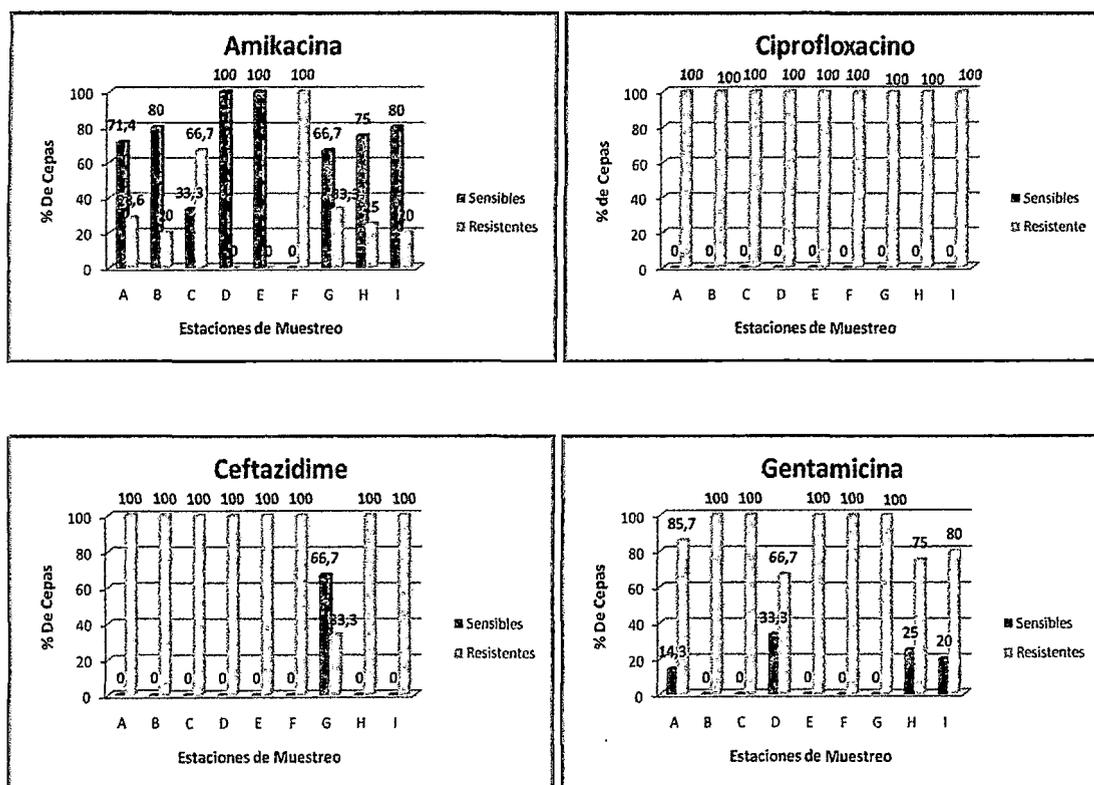
En el cuadro N° 27 y Grafico N° 23 se observa que las especies de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* presentaron mayor resistencia a los antibióticos ensayados (9 y 16 cepas respectivamente), seguidas de *P. putida* y *P. stutzeri*. En todas las especies hubo resistencia a Ciprofloxacino y Tetraciclina, en tanto que todas las cepas de *P. stutzeri* no ofrecieron resistencia frente a Amikacina.

En cuanto a la resistencia a los antimicrobianos observada en el presente estudio por las diferentes especies identificadas de *Pseudomonas*, se observó que es *P. aeruginosa* quien ofrece mayor resistencia a los antibióticos evaluados, es así que muestra un 100% de sus cepas resistentes frente a Ciprofloxacino y Tetraciclina, coincidiendo esta última con los datos obtenidos por D. Vicente A. y col., (1990). Cabe mencionar que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* ofrecen semejante resistencia frente a Amikacina, en tanto que las cepas aisladas de *P. stutzeri* no muestra resistencia alguna a Amikacina.

En las pruebas realizadas frente a los diferentes antimicrobianos evaluados, se utilizaron cepas patrón como: *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. fluorescens* ATCC 13525, quienes mostraron sensibilidad frente a todos los antibióticos evaluados, obteniendo niveles bajos de CMI (Ver Anexo N° 12). En el caso de la cepa patrón de *P. aeruginosa*, es utilizada por CLSI (2006) para generar los puntos de corte de susceptibilidad frente a los diferentes antimicrobianos.

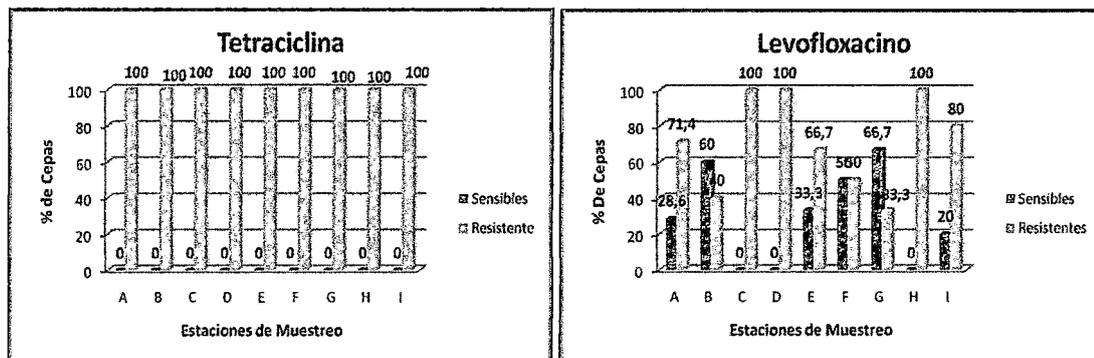
GRAFICO N° 24

Porcentajes de Susceptibilidad y Resistencia del total de cepas de *Pseudomonas* en relación a los sectores de aislamiento en los ríos Salado y Cañipia



//...

...//



A: Estación de Monitoreo (RT04)

E: Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado

B: Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata

F: Río Salado (Altura Puente Salado)

C: Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya

G: Unión Río Cañipia y Río Salado

D: Río Tintaya

H: Río Cañipia (Altura Puente Amistad)

I: Río Cañipia (Altura puente Cañipia)

En el Grafico N° 24 anteriores (Ver Anexo N° 16), se puede observar que los porcentajes de Susceptibilidad y Resistencia de las cepas de *Pseudomonas spp.* en relación a los sectores de aislamiento en los ríos Salado y Cañipia, son muy semejantes en todas las estaciones de muestreo, resaltando que solo frente al antibiótico Amikacina, hay una mayor susceptibilidad en todos los puntos muestreados, a excepción de la estación F (Río Salado (Altura Puente Salado)), donde se muestra resistencia en un 100% del total de sus cepas aisladas. También cabe resaltar que todas las cepas de *Pseudomonas* son resistentes a Ciprofloxacino y Tetraciclina en todas las estaciones de muestreo.

En cuanto a Ceftazidime, se observa que solo en la estación de muestreo Unión Río Cañipia y Río Salado hay susceptibilidad frente al antibiótico, en cambio en todas las demás estaciones son resistentes.

Por otra parte los resultados de nuestro estudio mostraron una alta incidencia de resistencia a la mayoría de los antibióticos y metales pesados estudiadas en las distintas especies de *Pseudomonas*, aisladas de los ríos Salado y Cañipia. Esto nos sugiere un incremento de agentes antimicrobianos y metales pesados en las aguas de los ríos, probablemente

como una consecuencia de disposición de aguas servidas domesticas no tratadas, desechos industriales de actividades mineras, agropecuaria, automotriz; y también; como lo han señalado algunos autores, como una consecuencia natural en el caso de la contaminación por metales. (Arroyo A. y col., 1999).

CUADRO N° 28
PRUEBA DE CHI-CUADRADO

Pruebas de Chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	96,127 ^a	6	0,000
Razón de verosimilitudes	93,285	6	0,000
N de casos válidos	210		
a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,14.			

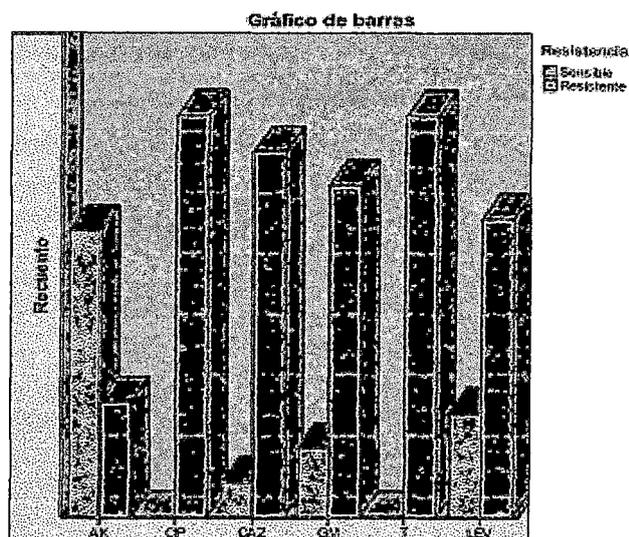
TABLA DE CONTINGENCIA: Concentraciones mínimas de Antibióticos
- Resistencia

Antibióticos – CMI (µg/ml)	Resistencia		Total
	Sensible	Resistente	
AK	25	10	35
CIP	0	35	35
CAZ	3	32	35
GM	6	29	35
T	0	35	35
LEV	9	26	35
Total	43	202	245

Fuente: Elaboración propia, de acuerdo al Anexo N ° 17

GRAFICO N° 25

Concentraciones mínimas de Antibióticos – Resistencia



Decisión:

Como el valor Sig. Asintótica (0.000) en la cuadro Chi-cuadrado es menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula (H_0)

Por tanto se acepta la hipótesis alterna (H_a).

Conclusión:

Con un 95% de confianza se asume que: La resistencia de las *Pseudomonas* está asociado a la exposición de éstas a distintos antibióticos (concentración mínima inhibitoria).

Además de la Tabla de contingencia anterior se observa que la mayoría de *Pseudomonas* si resistieron a los distintos tipos de antibióticos (en su concentración mínima inhibitoria).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir:

1. ***Pseudomonas spp.*** están presentes en el agua del Río Salado y Río Cañipia.
2. Por los parámetros evaluados en cuanto a calidad bacteriológica del agua se clasifica a los Ríos Salado y Cañipia dentro de la Categoría III, aguas para el riego de vegetales y bebida de animales y Categoría IV, aguas destinadas a la conservación del medio acuático.
3. ***Pseudomonas fluorescens*** fue la especie prevalente, seguida de ***P. aeruginosa***, ***P. putida*** y ***P. stutzeri***.
4. Las CMI más frecuentes mostradas por las cepas de ***Pseudomonas stutzeri***, ***P. fluorescens***, ***P. aeruginosa*** y ***P. putida*** fue: 3200 µg/ml frente a Pb; 1600 µg/ml frente a As, Cu, Fe, Zn y Mn; 800 µg/ml frente a Cr; 100 µg/ml frente a Cd y 80 µg/ml frente a Hg.
5. ***Pseudomonas aeruginosa***, ***P. fluorescens***, ***P. putida*** y ***P. stutzeri*** presentaron Concentración Mínima Inhibitoria de: 256 µg/ml frente a Ciprofloxacino y Tetraciclina; 32 µg/ml frente a Ceftazidime; 16 µg/ml frente a Amikacina y 8 µg/ml frente a Gentamicina y Levofloxacino.
6. ***Pseudomonas aeruginosa***, ***P. fluorescens***, ***P. putida*** y ***P. stutzeri*** presentaron una alta prevalencia de cepas multiresistentes a los antibióticos Ciprofloxacino, Ceftazidime, Gentamicina, Tetraciclina y Levofloxacino.

SUGERENCIAS

Se recomienda que se continúe realizando trabajos de evaluación de la calidad de agua, puesto que este recurso constituye una de las fuentes de abastecimiento de la localidad.

Investigar los genes de resistencia a metales pesados de *Pseudomonas* y su interacción con estos, continuando estudios para determinar los genotipos en las cepas de ***Pseudomonas spp.***

Los municipios distritales y provinciales deben establecer programas de vigilancia en las diversas fuentes de agua y controlar el vertido de aguas residuales previo tratamiento bacteriológico y químico, para garantizar su inocuidad.

LITERATURA CITADA:

- ✓ Agua Superficial, 1999. Procesamiento de datos presentados en: Instituto Nacional del Agua y del Ambiente. Reporte detallado de datos de calidad de agua recolectados durante el período Abril 1987-Marzo 1998 por la Contraparte Técnica Argentina. Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata. Control de la Calidad de las Aguas de la Cuenca del Plata.
- ✓ Alejo M., 2004. "Estudio de la presencia de metales pesados en peces en el Lago de Chapala". México.
- ✓ Alós J., 2003. "Quinolonas", Rev. Enferm Infecc Microbiol Clin España-Madrid; 21(5):261-8.
- ✓ Alsop D. y col., 1999. "Costs of chronic waterborne zinc exposure and the consequences of zinc acclimation on the gill/zinc interactions of rainbow trout in hard and soft water". Environ. Toxicol. Chem. 18(5): 1014-1025.
- ✓ Anisimova L. y col., 1993. "Resistance to metals Gram-negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions". Microbiology, 62(5): 505-508. India.
- ✓ APHA-AWA-WPCF, 2005. "Métodos normalizados para el análisis fisicoquímico y bacteriológico del agua" – España.
- ✓ Appanna V. y col., 1996. "Cellular response to a multiple metal stress in *Pseudomonas fluorescens*. J. Biotechnol". 48: 129–136.
- ✓ Arroyo A. y col., 1999. "Análisis de los eventos ocurridos en el río Loa. En: XII Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS", Chile.
- ✓ Ayala D., 2004. Investigación: "Organización Social y empresas extractivas: conflictos existentes sobre los recursos del subsuelo" Lima, Perú.
- ✓ Barranco E., 2005. "Aminoglucósidos", Rev. ACTA MÉDICA; 8(1):48-53. Perú.
- ✓ Bolanos E. y col., 1997 "Empleo de sueros diagnósticos producidos en la República Popular China para la serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*." Vol. 31. nº 2 [citado 14 Noviembre 2007]. pp. 107-112..

- ✓ Castro E. y col., 2007. "Estudio de línea de base del saneamiento básico ambiental del distrito de chinchero – Cusco ". (Tesis) Facultad de ciencias Biológicas- UNSAAC
- ✓ CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y ciencias del Ambiente) "microbiología para el análisis de Aguas". OMS/OPS Perú 1999
- ✓ Cervantes C. y col., 1990. "Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos." Ciencia y Desarrollo, Rev. Latinoam. Microbiol. 33:61-70. México.
- ✓ CODEPE, 2002. Consejo de Desarrollo de la Provincia la de Espinar: "Plan Maestro y Estrategias de Desarrollo Provincial".
- ✓ Cornelis P., 2008. "*Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*", 1st ed. edición, Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-19-6.
- ✓ Cué M. y col., 2005. "Actualidad de las quinolonas", Rev Cubana Farm v.39 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2005.
- ✓ Dávalos M., 1998. "Cefalosporinas de tercera generación". Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna - Vol. 11 N.º1.
- ✓ D'Argenio y col., 2002, "Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection." J. Bacteriol. 183: 1466-1471.
- ✓ Del Rio M. y col., 2007. "Determinación de metales pesados en agua residual en proceso de Galvanoplastia." México. Disponible en: www.estrucplan.com.ar
- ✓ Dickson T., 1999. "Química con enfoque ecológico", Editorial Limusa, México, Distrito Federal, México, pp 96-263.
- ✓ Doyle R., 1989. "How cell walls of Gram-positive bacteria interact with metal ions. *Metal Ions and Bacteria.*" USA. pp. 412-437.
- ✓ D Vicente A. y col., 1990 "Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters" Journal of Applied Bacteriology 68. 625 -632. España.
- ✓ Elomari M. y col., 1994. "Comparison of ribotyping analysis and numerical taxonomy studies of *Pseudomonas putida* biovar A." Syst. Appl. Microbiol. 17: 361–369.

- ✓ Espinoza H., 2006. "Efecto de las actividades humanas sobre la resistencia antibióticos y metales pesados en *Aeromonas spp.* presentes en aguas del rio Loa, II Region Chile." (Posgrado) Facultad Ciencias de la salud – Universidad de Antofagasta.
- ✓ Evans K. y col., 1998. "Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quórum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." J. Bacteriol. 180: 5443-5447.
- ✓ Ferris F., 1989. "Metallic ion interactions with the outer membrane of Gram-negative bacteria. Metal Ions and Bacteria." USA. pp. 341-362.
- ✓ Flores D., 2008. "Marcadores de Comportamiento Ecologico de Origen en *Enterococcus spp.* Resistentes a Antimicrobianos en la Ciudad del Cusco." (Postgrado). Unidad de Post – Grado de la Facultad de Ciencias Naturales y Formales de la Universidad Nacional de San Agustin de Arequipa.
- ✓ Garrity G. y col., 2004. "Taxonomic Outline of the Prokaryotes - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" - 2nd. ed.
- ✓ Golder Associates Perú S.A. 2010 Estudio de impacto ambiental proyecto antapaccay – expansión- Resumen Ejecutivo pag. 23-25
- ✓ Hancock R. y col., 1988. "Roles of porin and blactamase in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*." Rev. Infect. Dis. 10: 770-775.
- ✓ Hardalo C. y col., 1997. "*Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water." Crit. Rev. Microbiol. 23: 47-75.
- ✓ Holcombe G. y col., 1978. "The acute toxicity of zinc to rainbow and brook trout, comparisons in hard and soft water." U.S. Environmental Agency, Duluth, Minnesota. EPA-600/3-78-094. En: U.S. EPA. 1987 Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Zinc. Criteria and Standards Division, U.S. Environmental Agency, Washington, D.C. EPA-440/5- 87-003.
- ✓ INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática) Censos Nacionales 2007, XI de Población y VI de Vivienda

- ✓ INHEM, 1992. "Agua y salud". Editorial Ciencias Médicas. Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología, La Habana, Cuba pp 20-59. 4.
- ✓ Lalucat J. y col., 2008. "**Biology of *Pseudomonas stutzeri***." Disponible en: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/25137807.html
- ✓ Lau G. y col., 2004 "The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection" *Trends in molecular medicine*. Vol. 10. nº 12. pp. 599-606.
- ✓ Lebeque Y. y col., 2006 "Infecciones nosocomiales: incidencia de las *Pseudomonas aeruginosa*". Rev. Cubana Med V. 45 n. 1, Ciudad de la Habana- Cuba
- ✓ Lodish H. y col., 2002 *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W H Freeman & Co.
- ✓ Lopez S. y col., 2002. "*Pseudomonas aeruginosa*, Resistente a Betalactámicos e Inhibidores De Betalactamasas Piperacilina / Tazobactam)" Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - Nº 121
- Madigan M. y col., 2005. "Brock Biology of Microorganisms", 11th ed. edición, Prentice Hall
- ✓ Lujan D. y col., 2008 "Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un Hospital Universitario en Lima, Perú". Rev. Biomed, 19: 156-160
- ✓ Malbrán C., 2001. Manual de Procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antimicrobianos, Argentina.
- ✓ Malbrán C., 2006. C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standards Institute).
- ✓ Malik A. col., 2002 "Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas spp.* from de river waters, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater". Rev. Environmental monitoring and assessment. India
- ✓ Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión – Ministerio de Salud de Perú (2002).
- ✓ Manual Merck. 2004. Revisada el 05/02/2010. Disponible en: www.service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods.
- ✓ Marchand E. 2002. "Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consume Humano en Lima Metropolitana". Perú

- ✓ Márques A. y col., 1979. "Antibiotic and heavy metals resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils." *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 347-350. España.
- ✓ Martínez A. y col., 2001. "Microbiología y Parasitología." Tomo I. Cap. 29: 307-316.
- ✓ Matthijs S. y col., 2007 "Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity" *Environ. Microbiol.* Vol. 9. nº 2. pp. 425-34
- ✓ Mayers D. y col., 2009. "Antimicrobial Drug Resistance" Volume 1: *Mechanisms of Drug Resistance. Vassil St. Georgiev Series Editor.*
- ✓ Mayers D. y col., 2009. Antimicrobial Drug Resistance Volume 2: *Clinical and Epidemiological Aspects. Vassil St. Georgiev Series Editor.*
- ✓ Mendoza N. y col., 2009. "Actualidades farmacológicas: Tetraciclinas" México.
- ✓ Mesna J. y col., 2008. "Guía de terapéutica antimicrobiana." 18Ed. P: 56-68. España.
- ✓ Meyer J, et al 2002 "Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads" *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68. n. ° 6. pp. 2745-53.
- ✓ Mills W. y col., 1985. "Water Quality Assessment: A Screening Procedure for Toxic and Conventional Pollutants in Surface and Ground Water." EPA/600/6-85/002 a. U.S. Environmental Protection Agency.
- ✓ MINSA Ministerio de Salud 2007. Comisión intersectorial para la prevención y mitigación de la contaminación por plomo y otros metales pesados.
- ✓ Montuelle B. y col., 1994. "Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments." *Bull. Environ. Contm.Toxicol.* 53 (5): 753-758.
- ✓ Moraga R, y col., 2003. "Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique – Chile" *Rev. Investigaciones Marinas*, Vol. 31(1).
- ✓ Morales E. y col., 2009 "Evaluación Ambiental de las Operaciones de Xstrata Tintaya". Perú

- ✓ Murray P. y col., 2006. "Microbiología Médica." Versión en español de la 5.^a edición de la obra en inglés *Medical Microbiology*. 34: 356 – 365
- ✓ N.A.S., 1977. "Medical and biologic effects of environmental pollutants: Arsenic". Washington, D.C., National Academy of Sciences
- ✓ Nelson, K. y col., 2002. "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolic versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
- ✓ NRC (National Research Council)., 1989. National Academy of Sciences. Recommended Dietary Allowances, 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC. En: U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). IRIS (Integrated Risk Information System). January, 1992. 0426. Zinc and Compounds.
- ✓ Pérez E. y col., 2003. "Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol", *Enferm Infecc Microbiol Clin*, España-Madrid; 21(9):520-9.
- ✓ Perez M. y col., 2006. "Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística." *Rev Cubana Med Trop* 2006;58(3).
- ✓ Pliego A. y col., 2005. *Pseudomonas spp.* multirresistentes. Susceptibilidad in vitro a combinaciones de dos antibióticos. *Rev. Cir Ciruj.* Vol 73; Nº 6: 465-470.
- ✓ Ramirez A., 2002. "Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos." *Anales de la Facultad de Medicina* Vol. 63, Nº 1 Págs. 51 – 64 Perú
- ✓ Ramírez, M., 1999. "Diseño de un modelo de saneamiento de suelos contaminados con metales pesados derivados de la explotación minera." Tesis Profesional, Maestría en Ingeniería de Proyectos, Universidad de Guadalajara, México
- ✓ Rivera M. y col., 1988. "Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length." *J. Bacteriol.* 170: 512-521.
- ✓ Robertson W. y col., 1988. "Toxicología clínica." Editorial Manual Moderno, México.

- ✓ Rodríguez S., 2000. "Gestión y técnicas básicas de saneamiento ambiental para el fortalecimiento de las comunidades organizadas." Colombia.
- ✓ Rojas. A y col., 2003 "Epidemiología de las infecciones intrahospitalarias por *Pseudomona aeruginosa* en el Hospital Arzobispo Loayza". Rev. Acta Médica Peruana Vol. XX N° 3; 125-129,
- ✓ Rojas R., 2002 "Metales pesados en el agua destinada al consumo humano. Control de calidad de agua." Primera edición. Perú
- ✓ Römling U. y col. 1994. "A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats." Appl Environ Microbiol. 60: 1734-1738.
- ✓ Römling U. y col., 1997. "Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats." J. Mol. Biol. 271: 386- 404.
- ✓ Ruiz L., 2007. "*Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a sus resistencia a los antimicrobianos" tesis doctoral. España.
- ✓ Salazar D. y col., 2002. et al. "Susceptibilidad antimicrobiana y Serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA." Rev Cubana Med Trop. [online]. Vol. 54. n. ° 2 [citado 14 Noviembre 2007]. pp. 142-146
- ✓ Samaniego E., 1999. "Inhibidores de la girasa: Quinolonas. En: Fundamentos de Farmacología Médica." 5 ed. Quito: Editorial de la Universidad Central del Ecuador. pp. 1272-8.
- ✓ Sancha A., 2002. "Presencia de Cobre en Aguas de Consumo Humano: Causas, Efectos y Soluciones." Chile
- ✓ Silva J. y col., 1999. "Efecto de la polución por metales pesados sobre los niveles de resistencia en poblaciones bacterianas de la Bahía de San Jorge, Antofagasta". Rev. Ciencia y Salud, 3:3-15. Chile
- ✓ Silver S. y col., 1992. "Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria." Microbiol. Rev., 56(1): 195-228.

- ✓ Silver S. y col., 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. Ann. Rev. Microbiol., 53: 2725- 2732.
- ✓ SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología). Estación Meteorológica representativa de las Provincias Altas de la Región Cusco. 2008
- ✓ Soloaga R. y col., 1996. "Revisión de los mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a diversas familias de antibióticos." Rev. Infectología y Microbiología Clínica, 8: 57-63.
- ✓ Suárez P. y col., 2002. "La Incorporación de Metales Pesados en las Bacterias y su Importancia para el Ambiente". Rev. INTERCIENCIA, VOL. 27 N° 4. Venezuela.
- ✓ SUNASS "Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento- Control de calidad del agua". Primera Edición, Mayo 2003.
- ✓ Trias J. y col., 1990. "Diffusion of antibiotics via specific pathways across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. p. 319-327. In: .Silver S. y col. *Pseudomonas*: Biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology ". ASM Press, Washington, D. C.
- ✓ Vullo D., 2003. "Microorganismos y Metales Pesados: Una Interacción En Beneficio Del Medio Ambiente". Revista Química Viva Vol. 2, N° 3, Argentina.
- ✓ Yang C. y col., 1993. "Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil. Appl. Environ. Microbiol". 59: 580–584.
- ✓ Young J. y col., 1994. "Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* Van Hall 1902". J. Appl. Bacteriol. 77: 195–207.
- ✓ Zhitkovih A., 2005 "Importance of chromium- DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI.)" Chem Res Toxicol 18:3-11

REFERENCIAS DE INTERNET:

www.lenntech.es/Zinc-y-agua.htm#ixzz0woYlc278(10/9/10)

[http://www.micromacro.tv/pdfs/saber_mas_espanol/agua/14contaminacion de e aguas.pdf](http://www.micromacro.tv/pdfs/saber_mas_espanol/agua/14contaminacion_de_aguas.pdf) (15/09/10)

www.estrucplan.com.ar (8/10/10)

<http://home.mdconsult.com/das/drug/body/0/1/3313.html#D003313>

ANEXOS

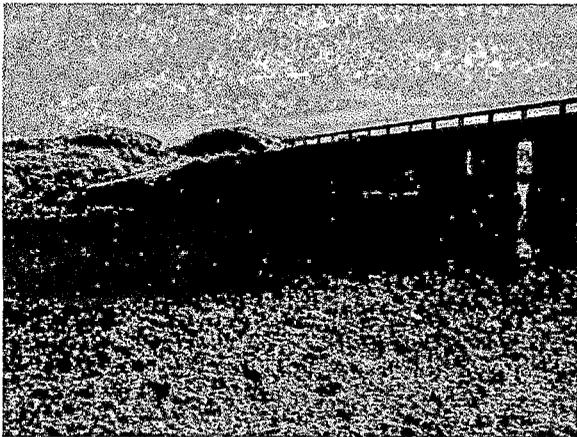
ANEXO N° 01
FOTOGRAFIAS



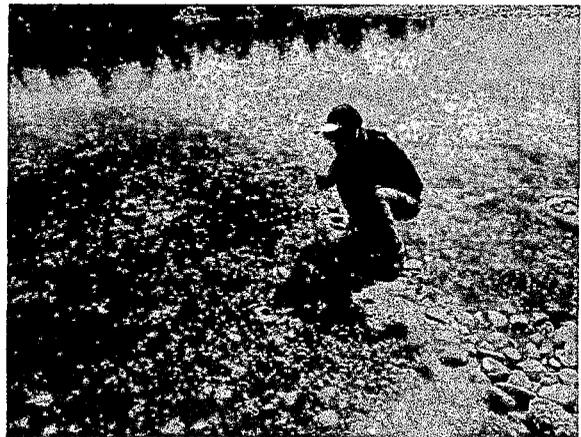
Rio Cañipia



Toma de Muestra

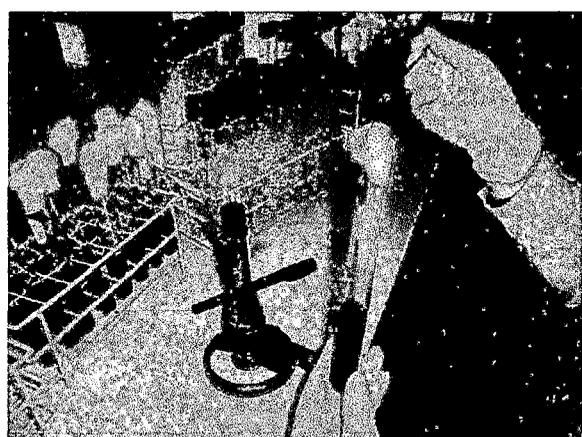
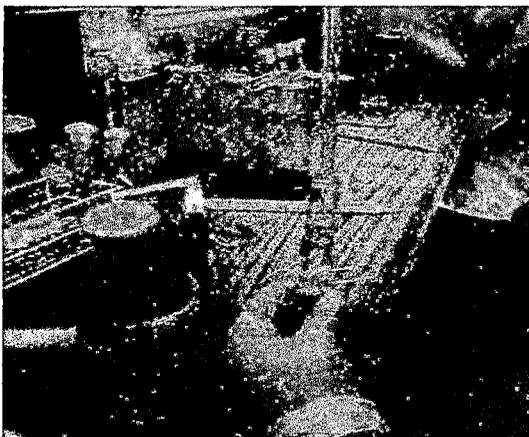


Rio Salado

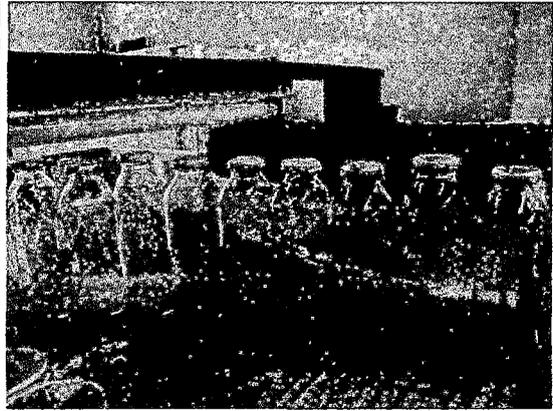


Toma de Muestra

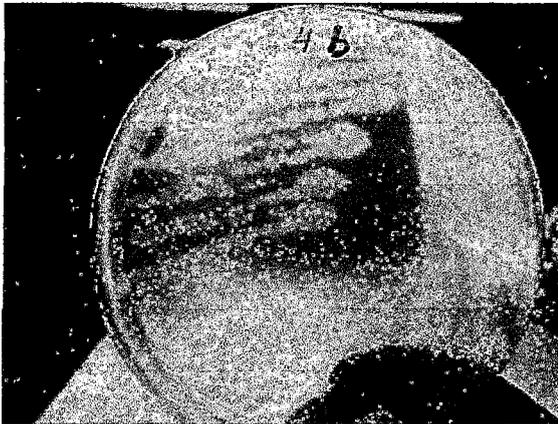
PROCESAMIENTO DELAS MUESTRAS EN LABORATORIO



Determinación de Coliformes

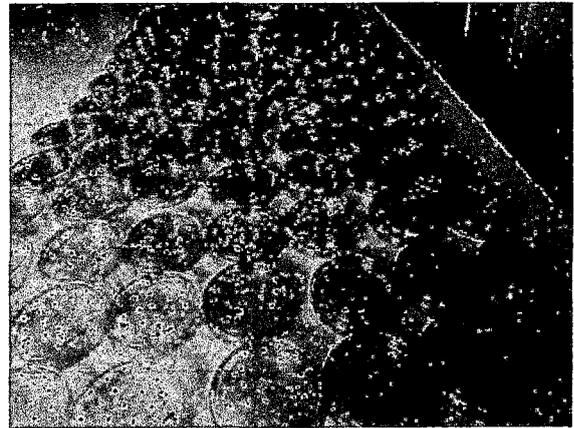
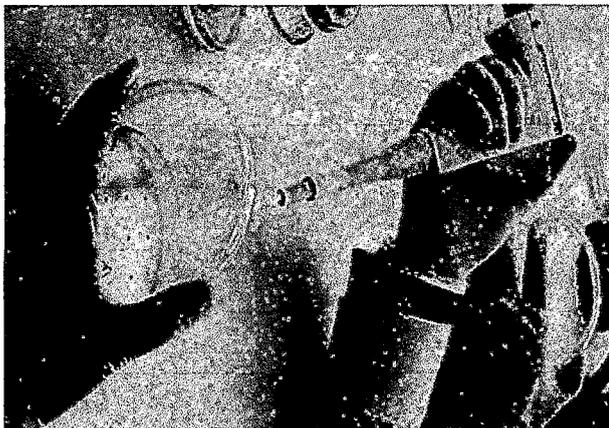


Aislamiento de *Pseudomonas* spp. en Caldo Olson

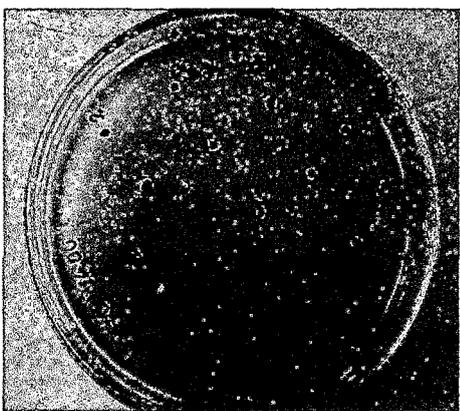
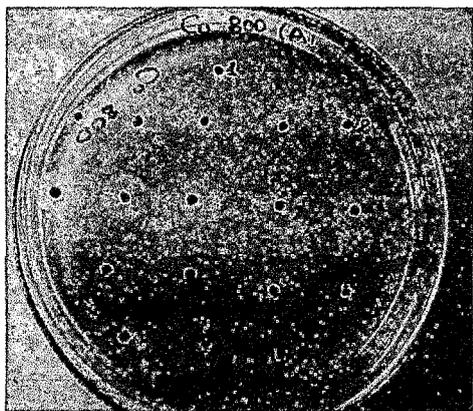
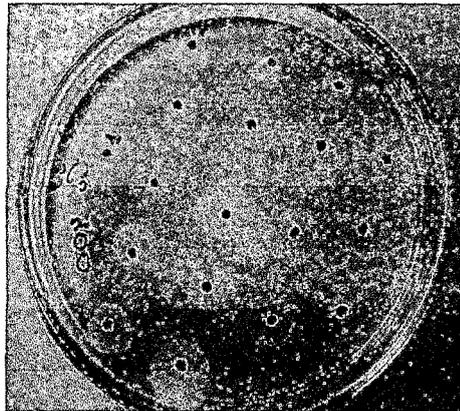
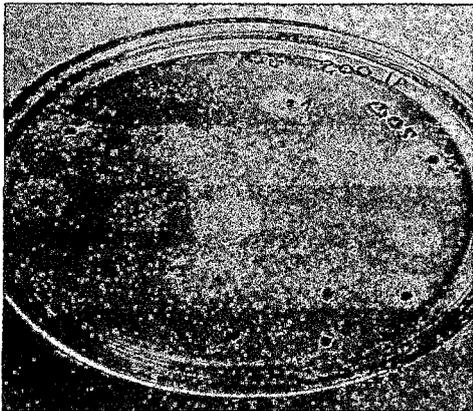
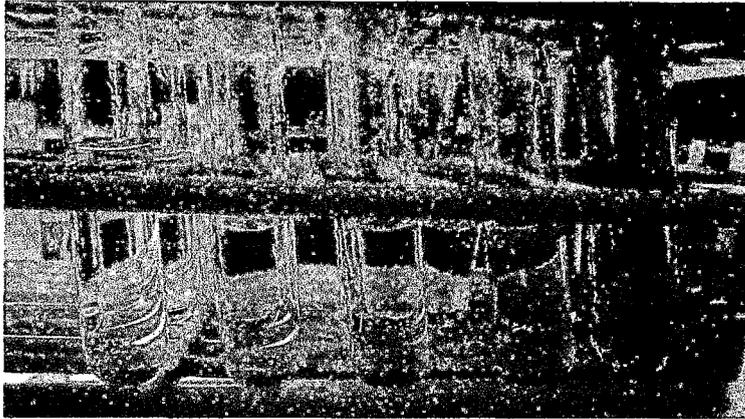


Crecimiento de *Pseudomonas* spp. en Agar Cetrimide

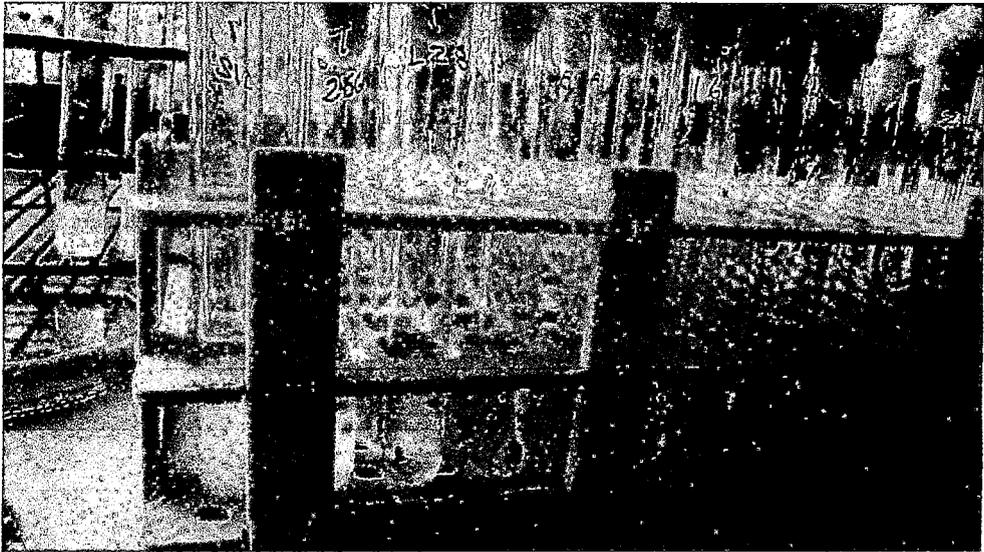
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)



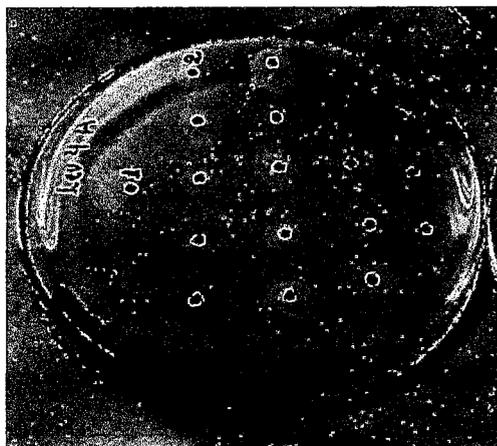
Determinación de la CMI para Metales Pesados



Determinación de la CMI para Antibióticos



Dilución de Antibióticos



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• **APARTADO POSTAL**

N° 921 - Cusco - Perú

• **FAX:** 238156 - 238173 - 222512

• **RECTORADO**

Calle Tigre N° 127

Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398

• **CIUDAD UNIVERSITARIA**

Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226

• **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232398 - 252210

243835 - 243836 - 243837 - 243838

• **LOCAL CENTRAL**

Plaza de Armas s/n

Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015

• **MUSEO INKA**

Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380

• **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**

San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246

• **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**

Av. De la Cultura N° 721

"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

ANEXO N ° 02

INFORME DE CALCULOS PARA LA OBTENCION DE LAS CONCENTRACIONES REQUERIDAS POR CADA METAL

**SOLICITANTE: CINTIA DUEÑAS PACHECO
FRIDA QUISPE APAZA**

Mediante la presente se da constancia de la preparación de soluciones de metales pesados a diferentes concentraciones.

Sales de Metales	Concentración requerida	Gramos de sal requerida
------------------	-------------------------	-------------------------

✓ Arsénico	(Na AsO ₂)	[32000 µg/ml]	→	55,5 g/L
✓ Cadmio	(CdCl ₂ H ₂ O)	[4000 µg/ml]	→	8 g/L
✓ Cobre	(CuSO ₄ 5H ₂ O)	[32000 µg/ml]	→	125,7 g/L
✓ Cromo	(K ₂ CrO ₄)	[32000 µg/ml]	→	119 g/L
✓ Hierro	(FeSO ₄ 7H ₂ O)	[16000 µg/ml]	→	79,4 g/L
✓ Manganeso	(MnSO ₄ H ₂ O)	[16000 µg/ml]	→	35 g/L
✓ Mercurio	(HgSO ₄)	[800 µg/ml]	→	1,2 g/L
✓ Plomo	(Pb(NO ₃) ₂)	[32000 µg/ml]	→	51,5 g/L
✓ Zinc	(ZnSO ₄)	[16000 µg/ml]	→	39,6 g/L

Cusco, 15 de Junio de 2010



MARIO CUMPA CAYURI
INGENIERO QUIMICO
Reg. del Colegio de Ingenieros N° 16199

ANEXO N ° 03
MÉTODO DE WINKLER

Reactivos

Solución 1: Sulfato manganoso (MnSO₄).

Solución 2: Hidróxido de Potasio (KOH) y Ioduro de potasio (KI).

Ácido Sulfúrico (H₂SO₄).

Solución indicadora de almidón 1 %.

Solución de Tiosulfato Sódico.

PROCEDIMIENTO.

1.- TERRENO

Obtener la muestra en las botellas de 250 ml, evitando la formación de burbujas, hasta que el agua rebase el frasco. Adicionar 1 ml de la solución 1 (MnSO₄).

Adicionar 1 ml de la solución 2 (KOH + KI).

Tapar herméticamente y agitar.

Agregar 1 ml H₂SO₄. Agitar hasta disolver el precipitado.

Sacar 50 ml de muestra y valorar en con Tiosulfato sódico hasta que el color amarillo desaparezca.

Agregar 1 ml de almidón y continuar titulando hasta que el azul desaparezca.

Realizar los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de Oxígeno Disuelto.

$$\text{mg/l de O}_2 = \text{milimoles de O}_2 / 0,05 \text{ L} \times \text{Pm}(\text{O}_2) = \text{mg/L}$$

ANEXO N° 04

CALDO OLSON:

Composición:

Triptona	5 g
Glucosa	1g
Extracto de levadura	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada por calentamiento y repartir en volúmenes según lo requerido. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Después de la esterilización agregar de una solución de cristal violeta al 0.01 % esterilizada por filtración, 10 ml por litro. (Manual CLEIBA, 1982)

MEDIO GELATINA

Composición:

Triptosa	15 g
Extracto de levadura	10 g
Lactosa	10 g
Rojo fenol	0.05 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Suspender los componentes en el agua y calentar hasta que la disolución quede concluida. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 y distribuir 5 ml en tubos. Esterilizar a 121 ° C por 10 minutos. (Guía técnica- OPS, 1994)

Procedimiento.

Partiendo de cultivos puros trasplantar a tubos que contengan medio de gelatina Incubar a 30 °C por 24 horas. Antes de la lectura dejar durante unas dos horas bajo refrigeración. La licuefacción del medio caracteriza una reacción positiva (Guía técnica- OPS, 1994)

ANEXO N° 05

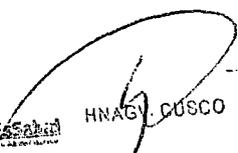


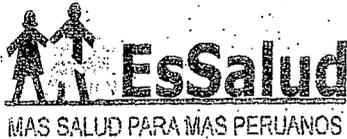
EL QUE SUSCRIBE: JEFE DEL SERVICIO DE LABORATORIO CLÍNICO DEL HOSPITAL NACIONAL "ADOLFO GUEVARA VELASCO" EsSalud Cusco HACE CONSTAR QUE:

Que las **Srtas Bachilleres Cintia Dueñas Pacheco y Frida Quispe Apaza**, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, realizaron los exámenes de identificación de cepas para el trabajo de investigación intitulado: **Resistencia de *Pseudomonas spp* a metales pesados y antibióticos, aislados de los ríos salados y Cañipia - Espinar -Cusco**, al realizar dichos exámenes de identificación los resultados fueron: ***Pseudomonas fluorescens, Pseudomona putida, Pseudomona aeruginosa y Pseudomona stutzeri.***

Se expide la presente constancia a petición de las interesadas para los fines del caso.

Cusco, 29 de Noviembre del 2010


HNAGV. CUSCO
.....
Dr Yun L. Ponce de León Olazá
JEFE SERVICIO LAB. CL-7 A.P.
C.I.A.P. 23205



DIRECCION HNAGV		
SECRETARIA		
12 NOV. 2010		
NOVA	PECUDO	REGISTRO

CARTA N° 010-CIE-UCDI-GRACU-ESSALUD-2010

CUSCO, 12 DE NOVIEMBRE DEL 2010.

Señor
DR URIEL VARGAS CABALLERO.
DIRECTOR DEL HNAGV
PRESENTE.-

ASUNTO: COMUNICA OPINIÓN FAVORABLE PARA EJECUCIÓN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

REF: PROYECTO INVEST.: "RESISTENCIA DE PSEUDOMONAS SPP. A METALES PESADOS Y ANTIBIÓTICOS AISLADOS DE LOS RIOS SALADOS Y CAÑIPIA-ESPINAR-CUSCO.

De mi mayor consideración;

Previo un atento saludo, la presente es para comunicarle que el Comité de Investigación de la Red Asistencial de Essalud-Cusco, ha revisado el Proyecto de Investigación mencionado en el epígrafe superior; presentado por las **Bachilleres de la Facultad de Ciencias Biológicas: Srta Cintia Dueñas Pacheco y Srta Frida Quispe Apaza**, aprobado por el comité que preside el suscrito, coincidiendo con la opinión vertida por la Jefatura del Servicio de Laboratorio, para tal efecto los gastos de los insumos que se deriven por el estudio de investigación serán asumidos por las interesadas.

Sin otro particular me suscribo de Usted

Atentamente;

PROV. N° 0195 DHNAGV-GRACU-ESSALUD 200

A: 1) Interesadas

PARA: 2) Serv. Laboratorio

- Su conocimiento y firma
- Su aprobación
- Su P.O.
- Su Evaluación e Informe
- Conocimiento, Difusión y Cumplimiento
- Para Opinión
- Autorizado
- Archivo

HOSPITAL NACIONAL SUR ESTE
ESSALUD

Dr. Carlos Antonio Zee Nutez
C.M.P. 27471
DE ENDOCRINOLOGÍA

CZN/ter
cc. arch.
1307-2010-3482

2. Brindar facilidades

Fecha: 16, 11, 10



DIRECCION HNAGV

ANEXO N° 06 - A

VIGILANCIA DE LOS RECURSOS HIDRICOS: CUENCA DEL RIO APURIMAC

Código de campo	Origen de la fuente	Clasificación del recurso hidricos	Puntos de muestreo	Localidad, urb., AA HH	Distrito	Provincia	Departamento
RCA-01	Rio Cayumani	Categoría 3: Riego de Vegetales y Bebida de Animales. Resolucion Jefatural N° 202-2010-ANA	Aguas debajo de la localidad de Suykutambo	Suykutambo	Suykutambo	Espinar	Cusco
RST-01	Rio Sierratambo		Aguas arriba de la unión con el río Apurimac	Tres cañones	Suykutambo	Espinar	Cusco
RA-01	Rio Apurimac		Aguas arriba de la unión con los ríos Sierratambo y Cayumani	Tres cañones	Suykutambo	Espinar	Cusco
RA-02	Rio Apurimac		Aguas abajo de la unión con los ríos Sierratambo y Cayumani	Maukallaqta	Suykutambo	Espinar	Cusco
RA-03	Rio Apurimac		Aguas abajo del Machupunte	Machupunte	Coporaque	Espinar	Cusco
RA-04	Rio Apurimac		Altura puente Santo Domingo aguas arriba con el rio Salado	Santo Domingo	Coporaque	Espinar	Cusco
RA-05	Rio Apurimac		Aguas abajo de la union con el rio Salado	Sillota	Pichigua	Espinar	Cusco
RS-01	Rio Salado		Aguas arriba de la caseta de bombeo XSTRATA-TINTAYA	Tintaya Marquiri	Espinar	Espinar	Cusco
QCA-01	Quebrada camacmayo		Aguas arriba union con el rio Salado	Tintaya Marquiri	Espinar	Espinar	Cusco
RS-02	Rio Salado		Aguas abajo union con el rio Tintaya	Tintaya Marquiri	Espinar	Espinar	Cusco
RT-01	Rio Tintaya		Aguas arriba de la union con el rio Salado	Tintaya Marquiri	Espinar	Espinar	Cusco
RT-02	Rio Tintaya		Aguas abajo de la mina XSTRATA Tintaya	Tintaya Marquiri	Espinar	Espinar	Cusco
RS-03	Rio Salado		Aguas abajo de la unión con el rio Cañipia	Espinar	Espinar	Espinar	Cusco
RC-01	Rio Cañipia		Aguas arriba de la union con el riachuelo Kjuluyumayo	Huisacjuluyo	Espinar	Espinar	Cusco
RC-02	Rio Cañipia		Aguas abajo de la union con el riachuelo Kjuluyumayo	Huisacjuluyo	Espinar	Espinar	Cusco
RC-03	Rio Cañipia		Altura puente Amistad	Espinar	Espinar	Espinar	Cusco
RC-04	Rio Cañipia		Altura puente Cañipia	Espinar	Espinar	Espinar	Cusco
QKU-01	Quebrada Kjuluyumayo		Aguas arriba de la unión con el Río Cañipia.	Espinar	Espinar	Espinar	Cusco



ANEXO N° 07

Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión - Instituto Nacional de Salud

6.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

6.3.1 Grupo I:

6.3.1.2 Ceftazidima

6.3.1.3 Imipenem y/o Meropenem

6.3.1.4 Gentamicina

6.3.1.5 Amikacina

6.3.1.6 Ciprofloxacina

6.3.2 Grupo II:

6.3.2.2 Aztreonam

6.3.2.3 Cefoperazona/sulbactam

6.3.2.4 Cefepime

6.3.2.5 Norfloxacina(1)

6.3.2.6 Ofloxacina(1)

(1) Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias

6.3.3 Resistencias Naturales:

Pseudomonas aeruginosa es resistente a Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, Cefotaxima, Ceftriaxona, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Ácido Nalidíxico y Ácido Pipemídico.

ANEXO N° 06 - B

RESULTADOS DE LA VIGILANCIA SANITARIA DE LOS RECURSOS HIDRICOS AÑO 2009-CUENCA DEL RIO APURIMAC

CODIGO	FECHA	pH	C.E (µ S/cm)	C tot (NMP/dl)	C. term (NMP/Dl)	Cd mg/L	Cu mg/L	Cr mg/L	Fe mg/L	Mn mg/L	Pb mg/L	Zn mg/L	Hg mg/L	Ac y g mg/L
ECAS/DIS. N° 008-2009-MINAM		6.5-8.5	<2000	5000	1000	0.005	0.2	0.1	1	0.2	0.05	2	0.001	1
RCA-01	27/03/2009	7.57	589	25	17	<0.010	<0.005	<0.050	0.178	0.071	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RA-01	27/03/2009	7.59	1085	60	58	<0.010	<0.005	<0.050	0.073	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RA-02	27/03/2009	7.52	919	94	47	<0.010	<0.005	<0.050	0.118	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RA-03	27/03/2009	7.52	71.3	16	13	<0.010	<0.005	<0.050	0.132	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RA-04	27/03/2009	7.44	62.4	100	21	<0.010	<0.005	<0.050	0.147	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RA-05	27/03/2009	8.50	319.9	116	60	<0.010	<0.005	<0.050	0.177	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RS-01	27/03/2009	8.1	393.3	80	30	<0.010	<0.005	<0.050	0.081	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
QCA-01	27/03/2009	7.6	560	115	55	<0.010	0.007	<0.050	<0.038	0.029	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RS-02	27/03/2009	7.8	633	50	9	<0.010	0.013	<0.050	0.158	0.040	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RT-01	27/03/2009	7.9	765	36	7	<0.010	0.019	<0.050	0.188	<0.025	0.030	<0.038	<0.00011	<1.8
RS-03	27/03/2009	8.31	333.5	760	80	<0.010	0.006	<0.050	0.130	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RC-01	27/03/2009	8.1	1432	28	13	<0.010	0.009	<0.050	<0.038	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RC-02	27/03/2009	8.10	145.2	15	15	<0.010	0.007	<0.050	<0.038	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RC-03	27/03/2009	8.10	171	330	90	<0.010	0.009	<0.050	<0.038	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8
RC-04	27/03/2009	8.19	180	31	27	<0.010	0.028	<0.050	<0.038	<0.025	<0.025	<0.038	<0.00011	<1.8

RESULTADOS DE LA VIGILANCIA SANITARIA DE LOS RECURSOS HIDRICOS AÑO 2010-CUENCA DEL RIO APURIMAC

CODIGO	FECHA	pH	C.E (µ S/cm)	OD (mg/L)	C tot (NMP/dl)	term (NMP/D)	Cd mg/L	Cu mg/L	Cr mg/L	Fe mg/L	Mn mg/L	Pb mg/L	Zn mg/L
ECAS/DIS. N° 008-2009-MINAM		6.5-8.5	<2000	>4	5000	1000	0.005	0.2	0.1	1	0.2	0.05	2
RCA-01	28/04/2010	7.4	695	6.83	298	231	<0,010	<0,010	<0,028	0.045	<0,013	<0,025	<0,011
RST-01	28/04/2010	7.1	504	6.5	176	78	<0,010	<0,010	<0,028	<0,038	<0,013	<0,025	<0,011
RA-01	28/04/2010	8.2	1711	6.19	49	19	<0,010	<0,010	<0,028	0.137	0.026	<0,025	<0,011
RA-02	28/04/2010	7.36	1544	5.69	73	39	<0,010	<0,010	<0,028	0.059	<0,013	<0,025	<0,011
RA-03	28/04/2010	7.47	1285	5.3	89	49	<0,010	<0,010	<0,028	0.066	<0,013	<0,025	<0,011
RA-04	28/04/2010	8.15	1150	5.55	6	5	<0,010	<0,010	<0,028	0.062	<0,013	<0,025	<0,011
RA-05	28/04/2010	8.26	362.5	6.62	39	1	<0,010	<0,010	<0,028	0.069	<0,013	<0,025	<0,011
RS-01	28/04/2010	7.83	763	6.2	19	8	<0,010	<0,010	<0,028	0.068	<0,013	<0,025	<0,011
QCA-01	28/04/2010	7.8	524	6.51	90	30	<0,010	<0,010	<0,028	0.241	0.084	<0,025	<0,011
RS-02	28/04/2010	7.83	901	7.04	130	60	<0,010	<0,010	<0,028	0.065	0.022	<0,025	<0,011
RT-01	28/04/2010	7.8	1084	5.45	58	41	<0,010	0.020	<0,028	0.136	0.046	<0,025	<0,011
RT-02	28/04/2010	7.85	1041	5.43	72	52	<0,010	0.020	<0,028	0.167	0.034	<0,025	<0,011
RS-03	28/04/2010	8.3	670	6.4	250	68	<0,010	0.013	<0,028	0.080	0.017	<0,025	<0,011
RC-01	28/04/2010	7.57	320	5.16	26	1	<0,010	<0,010	<0,028	<0,038	<0,013	<0,025	<0,011
RC-02	28/04/2010	8.18	358	6.07	9	2	<0,010	<0,010	<0,028	<0,038	<0,013	<0,025	<0,011
RC-03	28/04/2010	8.05	367	6.13	82	28	<0,010	<0,010	<0,028	0.058	<0,013	<0,025	<0,011
RC-04	28/04/2010	8.1	365	4.85	3000	3500	<0,010	<0,010	<0,028	0.101	0.024	<0,025	<0,011
QKU-01	28/04/2010	7.9	852	5.66	128	98	<0,010	<0,010	<0,028	0.051	<0,013	<0,025	<0,011



ANEXO N° 08

DATOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES MUESTREOS

1° MUESTREO (13/03/2010)									
N°	HORA DE MUESTREO	PUNTO DE MUESTREO	ALTITUD (m.s.n.m)	T °C	pH	O.D (mg/l)	Recuento C. Totales	Recuento C. Termoto	Recuento Pseudomonas
1	11:00	Río Cañipia altura Puente Amistad	3905	12	8	7.3	90	60	110
2	11:45	Estación de Monitoreo (RT04)	3943	14	7	6.2	30	11	18
3	12:20	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	3914	11	7	7.6	17	11	23
4	12:42	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3911	10	7	8.8	170	170	0
5	13:10	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3907	12	8	6.6	50	30	58
6	13:30	Río Tintaya	3913	12	7	7.7	110	50	460
7	14:45	Río Salado (Altura Puente Salado)	3874	11	7	6.1	350	350	0
8	14:00	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	3895	13	6	5.9	16 x 10 ⁵	16 x 10 ⁵	950
9	14:30	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3873	13	8	4.0	170	50	0
2° MUESTREO (14/05/2010)									
N°	HORA DE MUESTREO	PUNTO DE MUESTREO	ALTITUD (m.s.n.m)	T °C	pH	O.D (mg/l)	Recuento C. Totales	Recuento C. Termoto	Recuento Pseudomonas
1	12:00	Río Cañipia altura Puente Amistad	3908	14	8	7.4	130	80	124
2	12:45	Estación de Monitoreo (RT04)	3943	14	7	6.6	50	13	35
3	13:20	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	3915	11	7	6.9	23	13	19
4	13:42	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3909	10	7	8.4	240	240	46
5	14:10	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3908	10	8	6.7	50	23	46
6	14:30	Río Tintaya	3913	12	7	7.5	130	80	378
7	15:40	Río Salado (Altura Puente Salado)	3876	9	6	5.7	500	500	370
8	16:00	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	3897	11	6	6.2	16 x 10 ⁵	16 x 10 ⁵	2170
9	16:30	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3871	10	8	4.1	130	80	256
3° MUESTREO (19/06/2010)									
N°	HORA DE MUESTREO	PUNTO DE MUESTREO	ALTITUD (m.s.n.m)	T °C	pH	O.D (mg/l)	Recuento C. Totales	Recuento C. Termoto	Recuento Pseudomonas
1	10:21	Río Cañipia altura Puente Amistad	3902	7	6	7.5	50	50	0
2	10:52	Estación de Monitoreo (RT04)	3954	11	8	6.4	13	13	22
3	11:45	Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	3917	7	8	7.2	13	13	12
4	12:15	Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	3910	9	7	8.0	130	80	20
5	12:22	Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	3913	8	6	6.6	50	50	0
6	12:36	Río Tintaya	3913	9	6	7.3	70	8	0
7	13:20	Río Salado (Altura Puente Salado)	3880	11	7	5.3	220	140	410
8	13:50	Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	3895	11	6	6.1	16 x 10 ⁵	16 x 10 ⁵	1980
9	14:00	Unión Río Cañipia Y Río Salado	3873	13	6	4.3	240	17	344

TABLA DE CALCULO PARA OBTENER EL NMP DE M. COLIFORMES

Serie 1 (10ml)	Serie 2 (1ml.)	Serie 3 (0.1ml.)	NMP / 100ml.	Límite de confianza	
				Inferior	Superior
0	0	0	<1.8	-	6.80
0	0	1	1.80	0.09	6.80
0	1	0	1.80	0.09	6.90
0	1	1	3.60	0.70	10.00
0	2	0	3.70	0.70	10.00
0	2	1	5.50	1.80	15.00
0	3	0	5.60	1.80	15.00
1	0	0	2.00	0.10	10.00
1	0	1	4.00	0.70	10.00
1	0	2	6.00	1.80	15.00
1	1	0	4.00	0.71	12.00
1	1	1	6.10	1.80	15.00
1	1	2	8.10	3.40	22.00
1	2	0	6.10	1.80	22.00
1	2	1	8.20	3.40	22.00
1	3	0	8.30	3.40	22.00
1	3	1	10.00	3.50	15.00
1	4	0	10.00	0.79	15.00
2	0	0	4.50	1.80	22.00
2	0	1	6.80	3.40	17.00
2	0	2	9.10	1.80	22.00
2	1	0	6.80	3.40	26.00
2	1	1	9.20	4.10	22.00
2	1	2	12.00	3.40	26.00
2	2	0	9.30	4.10	36.00
2	2	1	12.00	5.90	26.00
2	2	2	14.00	4.10	36.00
2	3	0	12.00	5.90	36.00
2	3	1	14.00	5.90	22.00
2	4	0	15.00	2.10	23.00
3	0	0	7.80	3.50	35.00
3	0	1	11.00	5.60	26.00
3	0	2	13.00	3.50	36.00
3	1	0	11.00	5.60	36.00
3	1	1	14.00	6.00	36.00
3	1	2	17.00	5.70	40.00
3	2	0	14.00	6.80	40.00
3	2	1	17.00	6.80	40.00
3	2	2	20.00	6.80	40.00
3	3	0	17.00	6.80	70.00
3	3	1	21.00	9.80	40.00
3	3	2	24.00	6.80	70.00
3	4	0	21.00	9.80	70.00
3	4	1	24.00	9.80	35.00
3	5	0	25.00	4.10	36.00
4	0	0	13.00	5.90	40.00
4	0	1	17.00	6.80	
4	0	2	21.00		

Serie 1 (10ml)	Serie 2 (1ml.)	Serie 3 (0.1ml.)	NMP / 100ml.	Límite de confianza	
				Inferior	Superior
4	0	3	25	9.8	70
4	1	0	17	6	40
4	1	1	21	6.8	42
4	1	2	26	9.8	70
4	1	3	31	10	70
4	2	0	22	6.8	50
4	2	1	26	9.8	70
4	2	2	32	10	70
4	2	3	38	14	100
4	3	0	27	9.9	70
4	3	1	33	10	70
4	3	2	39	14	100
4	4	0	34	14	100
4	4	1	40	14	100
4	4	2	47	15	120
4	5	0	41	14	100
4	5	1	48	15	120
5	0	0	23	6.8	70
5	0	1	31	10	70
5	0	2	43	14	100
5	0	3	58	22	150
5	1	0	33	10	100
5	1	1	46	14	120
5	1	2	63	22	150
5	1	3	84	34	220
5	2	0	49	15	150
5	2	1	70	22	170
5	2	2	94	34	230
5	2	3	120	36	250
5	2	4	150	58	400
5	3	0	79	22	220
5	3	1	110	34	250
5	3	2	140	52	400
5	3	3	170	70	400
5	3	4	210	70	400
5	4	0	130	36	400
5	4	1	170	58	400
5	4	2	220	70	400
5	4	3	280	100	710
5	4	4	350	150	710
5	4	5	430	220	1100
5	5	0	240	400	710
5	5	1	350	700	1100
5	5	2	540		1700
5	5	3	920		2600
5	5	4	1600		4600
5	5	5	>1600		

ANEXO N° 09

Distribución de las especies de Pseudomonas aisladas de los ríos Salado y Cañipia y su CMI frente a Metales Pesados

Estaciones	Nº	Especie	Zn	Pb	Mn	Fe	Hg	Cu	Cr	Cd	As
Río Cañipia altura Puente Amistad	1	<i>P. aeruginosa</i>	1600	3200	>1600	1600	10	1600	1600	200	800
	2	<i>P. fluorescens</i>	1600	>3200	400	1600	40	1600	800	200	800
	3	<i>P. stutzeri</i>	1600	3200	1600	1600	40	1600	800	200	400
	4	<i>P. aeruginosa</i>	1600	>3200	1600	1600	40	3200	3200	200	1600
Estación de Monitoreo (RT04)	5	<i>P. aeruginosa</i>	1600	>3200	1600	>1600	40	3200	>3200	100	400
	6	<i>P. fluorescens</i>	400	3200	1600	1600	40	1600	800	100	1600
	7	<i>P. fluorescens</i>	1600	>3200	800	>1600	40	1600	1600	50	1600
	8	<i>P. stutzeri</i>	400	3200	1600	1600	40	1600	1600	100	1600
	9	<i>P. fluorescens</i>	1600	3200	1600	>1600	40	3200	1600	50	800
	10	<i>P. stutzeri</i>	400	>3200	800	1600	40	1600	400	100	1600
	11	<i>P. fluorescens</i>	1600	>3200	1600	>1600	40	1600	3200	100	800
Aguas Arriba Casetta de Bombeo Xstrata	12	<i>P. fluorescens</i>	1600	3200	>1600	>1600	10	1600	800	200	1600
	13	<i>P. putida</i>	800	>3200	>1600	>1600	20	3200	3200	100	400
	14	<i>P. fluorescens</i>	800	3200	1600	>1600	40	1600	3200	100	<200
	15	<i>P. fluorescens</i>	800	3200	1600	1600	40	1600	>3200	100	1600
	16	<i>P. stutzeri</i>	400	3200	1600	1600	40	1600	1600	100	1600
Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	17	<i>P. aeruginosa</i>	>1600	3200	>1600	>1600	20	1600	800	200	3200
	18	<i>P. aeruginosa</i>	800	3200	1600	>1600	40	1600	1600	200	3200
	19	<i>P. fluorescens</i>	1600	3200	>1600	>1600	40	1600	800	400	<200
Río Tintaya	20	<i>P. putida</i>	>1600	>3200	>1600	>1600	80	3200	3200	400	1600
	21	<i>P. fluorescens</i>	>1600	>3200	1600	1600	20	1600	800	50	1600
	22	<i>P. fluorescens</i>	200	>3200	400	1600	40	1600	1600	200	800
Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	23	<i>P. aeruginosa</i>	800	>3200	1600	1600	40	1600	>3200	100	1600
	24	<i>P. fluorescens</i>	200	>3200	400	>1600	40	1600	1600	<25	1600
	25	<i>P. aeruginosa</i>	800	3200	>1600	>1600	40	1600	>3200	400	800
Río Salado (Altura Puente Salado)	26	<i>P. fluorescens</i>	800	3200	1600	1600	40	1600	800	100	<200
	27	<i>P. putida</i>	800	3200	>1600	1600	40	1600	800	100	1600
Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	28	<i>P. putida</i>	>1600	>3200	>1600	>1600	40	3200	800	100	1600
	29	<i>P. aeruginosa</i>	1600	>3200	>1600	>1600	10	1600	1600	100	1600
	30	<i>P. aeruginosa</i>	400	3200	1600	1600	40	1600	800	50	800
	31	<i>P. fluorescens</i>	800	3200	1600	>1600	40	1600	>3200	<25	1600
	32	<i>P. fluorescens</i>	400	>3200	800	1600	40	1600	800	200	1600
Unión Río Cañipia Y Río Salado	33	<i>P. putida</i>	800	3200	1600	>1600	40	1600	1600	<25	400
	34	<i>P. fluorescens</i>	400	3200	800	1600	40	1600	800	100	800
	35	<i>P. putida</i>	1600	3200	1600	1600	40	1600	1600	200	800
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525			400	<200	<100	<100	<2.5	<200	<200	<25	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			400	<200	200	200	5	<200	400	25	<200

ANEXOS N° 10 A

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DE ESTACION DE MONITOREO (RT04) – A

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	1	14	2	29	4	57	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	5	71	2	29	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	3	43	4	57
Cr	0	0	1	14	1	14	3	43	1	14	1	14

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	3	43	4	57
Zn	0	0	0	0	3	43	0	0	4	57	0	0
Mn	0	0	0	0	0	0	2	29	5	71	0	0

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	2	29	5	71	0	0	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	0	0	7	100	0	0

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DE AGUAS ARRIBA DE CASETA DE BOMBEO XSTRATA - B

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	1	20	1	20			3	60				
Cu	0	0	0	0	0	0	4	80	1	20	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	4	80	1	20
Cr	0	0	0	0	1	20	1	20	2	40	1	20

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	40	3	60
Zn	0	0	0	0	1	20	3	60	1	20	0	0
Mn	0	0	0	0	0	0	0	0	3	60	2	40

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	0	0	4	80	1	20	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	1	20	1	20	3	60	0	0

ANEXO N° 10 B
DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS
AISLADAS DE AGUAS ARRIBA UNION RIO SALADO Y RIO TINTAYA - C

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	1	33	0	0	0	0	0	0	0	0	2	67
Cu	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0
Cr	0	0	0	0	2	67	1	33	0	0	0	0

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100
Zn	0	0	0	0	0	0	1	33	1	33	1	33
Mn	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	0	0	0	0	2	67	1	33	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67	0	0

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS
AISLADAS DE RIO TINTAYA - D

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	0	0	1	33	2	67	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	2	67	1	33	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100
Cr	0	0	0	0	1	33	1	33	1	33	0	0

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	67	1	33
Zn	0	0	0	0	1	33	0	0	1	33	1	33
Mn	0	0	0	0	1	33	0	0	1	33	1	33

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	1	33	0	0	1	33	1	33	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	1	33	1	33	1	33

ANEXO N° 10 C

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DE AGUAS ABAJO UNION RIO TINTAYA Y RIO SALADO – E

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	0	0	1	33	2	67	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67
Cr	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67
Zn	0	0	1	33	0	0	2	67	0	0	0	0
Mn	0	0	0	0	1	33	0	0	1	33	1	33

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	1	33	0	0	1	33	0	0	1	33	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DEL RIO SALADO (ALTURA PUENTE SALADO) - F

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	1	50	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0
Cr	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0
Zn	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0
Mn	0	0	0	0	0	0	0	0	1	50	1	50

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0

ANEXO N° 10 D
DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS
AISLADAS DEL UNION RIO CAÑIPIA Y RIO SALADO - G

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	1	33	2	67	0	0	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0
Cr	0	0	0	0	1	33	2	67	0	0	0	0

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	67	1	33
Zn	0	0	0	0	1	33	1	33	1	33	0	0
Mn	0	0	0	0	0	0	1	33	2	67	0	0

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	1	33	0	0	1	33	1	33	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS
AISLADAS DEL RIO CAÑIPIA (ALTURA DEL PUENTE AMISTAD) - H

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	1	25	2	50	1	25	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	3	75	1	25	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	2	50	2	50
Cr	0	0	0	0	2	50	1	25	1	25	0	0

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0
Zn	0	0	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0
Mn	0	0	0	0	1	25	0	0	2	50	1	25

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	1	25	0	0	3	75	0	0

ANEXO N° 10 E
DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DEL RIO CAÑIPIA (ALTURA DEL PUENTE CAÑIPIA) – I

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	0	0	0	0	1	20	4	80	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0	0	0	4	80	1	20	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	2	40	3	60
Cr	0	0	0	0	3	60	1	20	0	0	1	20

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	40	3	60
Zn	0	0	0	0	2	40	1	20	1	20	1	20
Mn	0	0	0	0	0	0	1	20	2	40	2	40

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	1	20	1	20	2	40	1	20	0	0	0	0

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	0	0	0	0	1	20	0	0	4	80	0	0

ANEXO N° 11 A

**DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE
CEPAS AISLADAS DE *Pseudomonas fluorescens*.**

Concentración (µg/ml) Metal Pesado	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	3	18.8	-	-	6	37.5	7	43.8*	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	15	93.7*	1	6.3	-	-
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	9	56.2*	7	43.8
Cr	-	-	-	-	8	50*	4	25	2	12.5	2	12.5

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	9	56.2*	7	43.8
Zn	-	-	2	12.5	4	25	4	25	5	31.3*	1	6.3
Mn	-	-	-	-	3	18.8	3	18.8	9	56.2*	1	6.3

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	2	12.5	4	25	6	37.5*	3	18.8	1	6.3	-	-

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	-	-	-	-	-	-	2	12.5	14	87.5*	-	-

(*) Representa los altos porcentajes de cepas de *Pseudomonas fluorescens* frente a las diferentes concentraciones de metales pesados evaluados.

ANEXO N° 11 B
DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE
CEPAS AISLADAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración (µg/ml) Metal Pesado	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	-	-	1	11.1	2	22.2	4	44.4*	2	22.2	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	7	77.8*	2	22.2	-	-
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	5	55.6*	4	44.4
Cr	-	-	-	-	2	22.2	3	33.3	1	11.1	3	33.3

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	-	-	-	-	--	-	-	-	3	33.3	6	66.7*
Zn	-	-	-	-	-	-	3	33.3	5	55.6*	1	11.1
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	4	44.4	5	55.6*

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	-	-	-	-	4	44.4	5	55.6*	1	11.1	-	-

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	-	-	-	-	3	33.3	1	11.1	5	55.6*	-	-

(*) Representa los altos porcentajes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a las diferentes concentraciones de metales pesados evaluados.

ANEXO N° 11 C

DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE CEPAS AISLADAS DE *Pseudomonas putida*

Concentración (µg/ml) Metal Pesado	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
As	-	-	2	33.3	1	16.7	3	50*	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	3	50*	3	50	-	-
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	3	50*	3	50
Cr	-	-	-	-	2	33.3	2	33.3	2	33.3	-	-

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	2	33.3	4	66.7*
Zn	-	-	-	-	-	-	3	50*	1	16.7	2	33.3
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	2	33.3	4	66.7*

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	1	16.7	-	-	3	50*	1	16.7	1	16.7	-	-

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	-	-	-	-	-	-	1	16.7	4	66.7*	1	16.7

(*) Representa los altos porcentajes de cepas *Pseudomonas putida* frente a las diferentes concentraciones de metales pesados evaluados.

ANEXO N° 11 D

**DETERMINACIÓN DE LA CMI A DIFERENTES METALES PESADOS DE
CEPAS AISLADAS DE *Pseudomonas stutzeri***

Concentración (µg/ml)	200		400		800		1600		3200		>3200	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Metal Pesado												
As	-	-	1	25	-	-	3	75*	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	4	100*	-	-	-	---
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	3	75*	1	25
Cr	-	-	1	25	1	25	2	50	-	-	-	-

	100		200		400		800		1600		>1600	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100*	-	-
Zn	-	-	-	-	3	75*	-	-	1	25	-	--
Mn	-	-	-	-	-	-	1	25	3	75*	-	-

	25		50		100		200		400		>400	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cd	-	-	-	-	3	75*	1	25	-	-	-	-

	2.5		5		10		20		40		80	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hg	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100*	-	-

(*) Representa los altos porcentajes de cepas de *Pseudomonas stutzeri* frente a las diferentes concentraciones de metales pesados evaluados.

ANEXO N° 12

Distribución de las especies de *Pseudomonas* aisladas de los ríos Salado y Cañipia y su CMI frente a Antibióticos.

Estaciones	Nº	Especie	AK	CIP	CAZ	GM	T	LEV
Río Cañipia altura Puente Amistad	1	<i>P. aeruginosa</i>	32	256	32	16	256	8
	2	<i>P. fluorescens</i>	16	128	32	16	256	16
	3	<i>P. stutzeri</i>	16	256	32	4	>1024	8
	4	<i>P. aeruginosa</i>	4	256	64	8	256	16
Estación de Monitoreo (RT04)	5	<i>P. aeruginosa</i>	32	256	32	16	256	8
	6	<i>P. fluorescens</i>	16	256	256	8	64	16
	7	<i>P. fluorescens</i>	8	256	32	8	128	2
	8	<i>P. stutzeri</i>	16	256	64	16	512	16
	9	<i>P. fluorescens</i>	32	128	32	8	256	8
	10	<i>P. stutzeri</i>	8	64	64	4	128	1
	11	<i>P. fluorescens</i>	8	128	512	8	256	16
Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata	12	<i>P. fluorescens</i>	32	256	32	16	256	8
	13	<i>P. putida</i>	8	1024	64	16	64	4
	14	<i>P. fluorescens</i>	16	128	32	8	256	8
	15	<i>P. fluorescens</i>	4	128	32	8	256	4
	16	<i>P. stutzeri</i>	16	512	64	8	128	4
Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya	17	<i>P. aeruginosa</i>	4	512	128	16	>1024	64
	18	<i>P. aeruginosa</i>	32	128	128	8	1024	32
	19	<i>P. fluorescens</i>	32	256	32	16	256	8
Río Tintaya	20	<i>P. putida</i>	16	512	512	32	>1024	32
	21	<i>P. fluorescens</i>	16	128	128	4	>1024	16
	22	<i>P. fluorescens</i>	16	256	256	8	128	16
Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado	23	<i>P. aeruginosa</i>	16	512	32	8	64	16
	24	<i>P. fluorescens</i>	16	256	512	8	128	8
	25	<i>P. aeruginosa</i>	16	256	64	8	256	2
Río Salado (Altura Puente Salado)	26	<i>P. fluorescens</i>	32	256	32	32	256	8
	27	<i>P. putida</i>	64	64	64	8	128	1
Río Cañipia (Altura puente Cañipia)	28	<i>P. putida</i>	32	1024	16	32	512	64
	29	<i>P. aeruginosa</i>	16	256	256	16	64	16
	30	<i>P. aeruginosa</i>	16	128	128	16	64	8
	31	<i>P. fluorescens</i>	8	64	256	8	64	16
	32	<i>P. fluorescens</i>	8	128	32	2	64	<0.25
Unión Río Cañipia Y Río Salado	33	<i>P. putida</i>	8	128	128	8	64	8
	34	<i>P. fluorescens</i>	32	128	8	16	128	4
	35	<i>P. putida</i>	16	64	8	8	256	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525			< 0.25	< 0.25	< 0.25	2	0.5	0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			1	0.5	<0.25	2	0.5	1

Tabla 2B-1. Puntos de Corte Estandarizados para la Interpretación del Diámetro de la Zona de Inhibición y el Equivalente a la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Condiciones de las pruebas

MEDIO: Agar Mueller Hinton
 INOCULO: Método de Crecimiento o Suspensión directa de la Colonia
 INCUBACION: 35 °C; Ambiente aeróbico; de 16 a 18 horas

Recomendaciones mínimas de Control de Calidad (Ver tabla 3 para los rangos aceptables de Control de Calidad)

Escherichia coli ATCC® 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853

Escherichia coli ATCC® 35218 (Para combinaciones de B-lactámico/Inhibidor de Betalactamasas)

COMENTARIOS GENERALES

- (1) La susceptibilidad de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística debe de determinarse por el método de difusión, pero puede requerir aumento en el tiempo de incubación hasta 24 horas antes de reportarse susceptible.
- (2) *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia durante la terapia prolongada con cualquier antibiótico. Por lo tanto los aislamientos que son inicialmente susceptibles pueden convertirse en resistentes en tres a cuatro días después de iniciada la terapia. Debe de garantizarse la repetición del antibiograma.

NOTA: La información resaltada en negrita es tentativa por un año.

Test/Grupo de Reporte	Agente Antimicrobiano	Carga del Disco	Diámetro de la Zona de Inhibición en mm			Puntos de Corte Equivalente en CIM (µg/mL)		Comentarios
			R	I	S	R	S	
PENICILINAS								
A	Mezlocilina o Ticarcilina	75 µg	≤ 15	-----	≥ 16	≥ 128	≤ 64	
A	Piperacilina	100 µg	≤ 14	-----	≥ 15	≥ 128	≤ 64	
U	Carbenicilina	100 µg	≤ 17	-----	≥ 18	≥ 128	≤ 64	
U	Azlocilina	100 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 512	≤ 128	
O	Azlocilina	75 µg	≤ 17	-	≥ 18	≥ 128	≤ 64	
β-LACTAMICO/INHIBIDOR DE β-LACTAMASAS								
O	Piperacilina/Tazobacta	100/10 µg	≤ 17	-	≥ 18	≥ 128/4	≤ 64/4	
O	Ticarcilina/Ac. Clavulá	75/10 µg	≤ 14	-	≥ 15	≥ 128/2	≤ 64/2	
CEFEMES (PARENTERAL) (Incluyendo cefalosporinas I, II, III, IV. Referirse al glosario I.)								
A	Ceftazidima	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	
B	Cefepime	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	

ANEXO N° 13 - B

Test/Grupo de Reporte	Agente Antimicrobiano	Carga del Disco	Diámetro de la Zona de Inhibición en mm			Puntos de Corte Equivalente en CIM (µg/mL)		Comentarios
			R	I	S	R	S	
B	Cefoperazóna	75 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 64	≤ 16	
O	Cefotaxima o	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8	
O	Ceftriaxona	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21	≥ 64	≤ 8	
O	Ceftizoxima	30 µg	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 32	≤ 8	
O	Moxalactam	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8	
CARBAPENEMES								
B	Imipenem	30 µg	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
B	Meropenem	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
MONOBACTAMES								
B	Aztreonam	30 µg	≤ 15	16-21	≥ 22	≥ 32	≤ 8	
AMINOGLUCOSIDOS								
A	Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
B	Amikacina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16	
B	Tobramicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
C	Netilmicina	30 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 32	≤ 12	
TETRACICLINAS								
O	Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	(3) Los microorganismos que son susceptibles a tetraciclina son también considerados susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos que son intermedios o resistentes a tetraciclina pueden ser susceptibles a doxiciclina o minociclina o ambos.
O	Doxiciclina	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
O	Minociclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	
FLUOROQUINOLONAS								
B	Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	
B	levofloxacina	5 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	≤ 2	
U	Lomefloxacina o	10 µg	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 8	≤ 2	
U	Norfloxacina u	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 16	≤ 4	
U	Ofloxacina	5 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	≤ 2	
O	Gatifloxacina	5 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 8	≤ 2	(4) Estos puntos de cortes son aplicables solo a aislamientos del tracto urinario.

ANEXO N° 16

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE LAS ESPECIES DE *Pseudomonas spp.* EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO

Estación	N° De Cepas	Amikacina				Ciprofloxacino				Ceftazidime			
		S ≤ 16		R ≥ 32		S ≤ 1		R ≥ 4		S ≤ 8		R ≥ 32	
		N°	%	N	%	N°	%	N°	%	N	%	N	%
A	7	5	71,4	2	28,6	0	0	7	100	0	0	7	100
B	5	4	80	1	20	0	0	5	100	0	0	5	100
C	3	1	33,3	2	66,7	0	0	3	100	0	0	3	100
D	3	3	100	0	0	0	0	3	100	0	0	3	100
E	3	3	100	0	0	0	0	3	100	0	0	3	100
F	2	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0	2	100
G	3	2	66,7	1	33,3	0	0	3	100	2	66,7	1	33,3
H	4	3	75	1	25	0	0	4	100	0	0	4	100
I	5	4	80	1	20	0	0	5	100	0	0	5	100

Estación	N° De Cepas	Gentamicina				Tetraciclina				Levofloxacino			
		S ≤ 4		R ≥ 8		S ≤ 4		R ≥ 16		S ≤ 2		R ≥ 8	
		N°	%	N	%	N°	%	N°	%	N	%	N	%
A	7	1	14,3	6	85,7	0	0	7	100	2	28,6	5	71,4
B	5	0	0	5	100	0	0	5	100	3	60	2	40
C	3	0	0	3	100	0	0	3	100	0	0	3	100
D	3	1	33,3	2	66,7	0	0	3	100	0	0	3	100
E	3	0	0	3	100	0	0	3	100	1	33,3	2	66,7
F	2	0	0	2	100	0	0	2	100	1	50	1	50
G	3	0	0	3	100	0	0	3	100	2	66,7	1	33,3
H	4	1	25	3	75	0	0	4	100	0	0	4	100
I	5	1	20	4	80	0	0	5	100	1	20	4	80

A: Estación de Monitoreo (RT04)

E: Aguas Abajo unión Río Tintaya y Río Salado

B: Aguas Arriba Caseta de Bombeo Xstrata

F: Río Salado (Altura Puente Salado)

C: Aguas Arriba unión Río Salado y Río Tintaya

G: Unión Río Cañipia y Río Salado

D: Río Tintaya

H: Río Cañipia (Altura Puente Amistad)

I: Río Cañipia (Altura puente Cañipia)

ANEXO N° 17

Tabla de contingencia Antibioticos * Resistencia * Especies de Pseudomonas					
Especies de Pseudomonas			Resistencia		Total
			Sensible	Resistente	
P. fluorescens	Antibioticos	AK	11	5	16
		CIP	0	16	16
		CAZ	1	15	16
		GM	2	14	16
		T	0	16	16
		LEV	3	13	16
	Total		17	95	112
P. aeruginosa	Antibioticos	AK	6	3	9
		CIP	0	9	9
		CAZ	0	9	9
		GM	2	7	9
		T	0	9	9
		LEV	1	8	9
	Total		9	54	63
P. putida	Antibioticos	AK	4	2	6
		CAZ	2	4	6
		GM	0	6	6
		T	0	6	6
		LEV	3	3	6
Total		9	33	42	
P. stutzeri	Antibioticos	AK	4	0	4
		CIP	0	4	4
		CAZ	0	4	4
		GM	2	2	4
		T	0	4	4
		LEV	2	2	4
Total		8	20	28	
Total	Antibioticos	AK	25	10	35
		CIP	0	35	35
		CAZ	3	32	35
		GM	6	29	35
		T	0	35	35
		LEV	9	26	35
	Total		43	202	245

INFORME N° 236-2010-MPE-GDURMA/SGMARN-EFVQ

MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE ES
GDURMA
N° Folio _____ N° Reg. 12
Fecha 01 Julio 2010
Firma _____

A : ARQ. JUAN MENA ARMENDARIZ
Gerente DURMA – MPE

DE : BLGO. E. FERNANDO VALDIVIA QUISPE
Jefe del Dpto. de Medio Ambiente y RRNN – MPE

ASUNTO : AUTORIZACION PARA TOMA DE MUESTRAS DE AGUA

FECHA : ESPINAR, 01 DE JULIO DEL 2010

Mediante el presente me dirijo a Usted, con la finalidad de **REMITIRLE** la autorización correspondiente a lo solicitado en el Oficio S/N por parte de la Dra. Bióloga Daniela Flores Calderon, Directora del Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco,

En merito a su solicitud de **AUTORIZACION** para la toma de muestras de los ríos Salado y Cañipia de la ciudad de Espinar para fines de **ELABORACION DE LA TESIS "CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA A METALES PESADOS Y ANTIBIOTICOS"** la cual será elaborada por las Srtas. Bach. Cintia Dueñas Pacheco y Frida Quispe Apaza, las cuales una vez concluida sus investigaciones harán llegar toda la información correspondiente a la Municipalidad Provincial de Espinar para su consideración correspondiente.

Es todo cuanto tengo que informar a usted, para su conocimiento.

Atentamente,

MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE ESPINAR
MEDIO AMBIENTE Y RRNN


Blgo. E. Fernando Valdivia Quispe
C.B.P. N° 7278

Diagnóstico y el usuario esté dispuesto a proporcionarlos, el valor de dichos insumos será descontado del precio del servicio, previa presentación de la copia del comprobante de pago. Los insumos requeridos deberán ceñirse a las especificaciones técnicas exigidas por el SENASA.

Regístrase, comuníquese y publíquese.

OSCAR M. DOMINGUEZ FALCON
Jefe (e)
Servicio Nacional de Sanidad Agraria

232229-1

AMBIENTE

Aprueban los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua

DECRETO SUPREMO
N° 002-2008-MINAM

EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que, en el inciso 22 del artículo 2° de la Constitución Política del Perú establece que toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida; señalando en su artículo 67° que el Estado determina la Política Nacional del Ambiente;

Que, el artículo I del Título Preliminar de la Ley N° 28611-Ley General del Ambiente, establece que toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes, asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país;

Que, el artículo 1° de la Ley N° 28817-Ley que establece los plazos para la elaboración y aprobación de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y de Límites Máximos Permisibles (LMP) de Contaminación Ambiental, dispuso que la Autoridad Ambiental Nacional culminaría la elaboración y revisión de los ECA y LMP en un plazo no mayor de dos (02) años, contados a partir de la vigencia de dicha Ley;

Que con fecha 16 de junio de 1999 se instaló el GESTA AGUA, cuya finalidad fue elaborar los Estándares de Calidad Ambiental para Agua - ECA para Agua, estando conformado dicho Grupo de Trabajo por 21 instituciones del sector público, privado y académico, actuando la Dirección General de Salud Ambiental - DIGESA como Secretaría Técnica;

Que, mediante Oficio N° 8262-2006/DG/DIGESA de fecha 28 de diciembre de 2006, la Dirección General de Salud Ambiental - DIGESA, en coordinación con el Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA, en calidad de Secretaría Técnica Colegiada del GESTA

AGUA, remitió al CONAM, la propuesta de Estándares de Calidad Ambiental-ECA para Agua con la finalidad de tramitar su aprobación formal;

Que, por Acta del Grupo de Trabajo GESTA AGUA, de fecha 24 de octubre de 2007, se aprobó la propuesta de Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua;

Que, mediante Decreto Legislativo N° 1013 se aprobó la Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente, señalándose su ámbito de competencia sectorial y regulándose su estructura orgánica y funciones, siendo una de sus funciones específicas la de elaborar los Estándares de Calidad Ambiental y Límites Máximos Permisibles;

Que, contando con la propuesta de Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua, corresponde aprobarlos mediante Decreto Supremo, conforme a lo establecido en el artículo 7° del Decreto Legislativo N° 1013;

De conformidad con lo dispuesto en la Ley General del Ambiente, Ley N° 28611 y el Decreto Legislativo N° 1013;

En uso de las facultades conferidas por el artículo 118° de la Constitución Política del Perú;

DECRETA:

Artículo 1°.- Aprobación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua

Aprobar los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, contenidos en el Anexo I del presente Decreto Supremo, con el objetivo de establecer el nivel de concentración o el grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos presentes en el agua, en su condición de cuerpo receptor y componente básico de los ecosistemas acuáticos, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni para el ambiente. Los Estándares aprobados son aplicables a los cuerpos de agua del territorio nacional en su estado natural y son obligatorios en el diseño de las normas legales y las políticas públicas siendo un referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental.

Artículo 2°.- Refrendo

El presente Decreto Supremo será refrendado por el Ministro del Ambiente.

**DISPOSICIÓN COMPLEMENTARIA
TRANSITORIA**

Única.- El Ministerio del Ambiente dictará las normas para la implementación de los Estándares de Calidad Ambiental para Agua, como instrumentos para la gestión ambiental por los sectores y niveles de gobierno involucrados en la conservación y aprovechamiento sostenible del recurso agua.

Dado en la Casa de Gobierno, en Lima, a los treinta días del mes de julio del año dos mil ocho.

ALAN GARCÍA PÉREZ
Presidente Constitucional de la República

ANTONIO JOSÉ BRACK EGG
Ministro del Ambiente

El Peruano
DIARIO OFICIAL

REQUISITO PARA PUBLICACIÓN DE NORMAS LEGALES Y SENTENCIAS

Se comunica al Congreso de la República, Poder Judicial, Ministerios, Organismos Autónomos y Descentralizados, Gobiernos Regionales y Municipalidades que, para efecto de publicar sus dispositivos y sentencias en la Separata de Normas Legales y Separatas Especiales respectivamente, deberán además remitir estos documentos en disquete o al siguiente correo electrónico. normaslegales@editoraperu.com.pe

LA DIRECCIÓN

ANEXO I

ESTÁNDARES NACIONALES DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA

CATEGORÍA 1: POBLACIONAL Y RECREACIONAL

PARAMETRO	UNIDAD	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable			Aguas superficiales destinadas para recreación	
		A1	A2	A3	B1	B2
		Agua que pueden ser potabilizadas con desinfección	Agua que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	Agua que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado	Contacto Primario	Contacto Secundario
		VALOR	VALOR	VALOR	VALOR	VALOR
FÍSICOS Y QUÍMICOS						
Aceites y grasas (MEH)	mg/L	1	1,00	1,00	Ausencia de película visible	**
Cianuro Libre	mg/L	0,005	0,022	0,022	0,022	0,022
Cianuro Wad	mg/L	0,08	0,08	0,08	0,08	**
Cloruros	mg/L	250	250	250	**	**
Color	Color verdadero escala Pt/Co	15	100	200	sin cambio normal	sin cambio normal
Conductividad	us/cm ¹⁰⁰	1 500	1 600	**	**	**
D.B.O.	mg/L	3	5	10	5	10
D.Q.O.	mg/L	10	20	30	30	50
Dureza	mg/L	500	**	**	**	**
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,5	0,5	na	0,5	Ausencia de espuma persistente
Fenoles	mg/L	0,003	0,01	0,1	**	**
Fluoruros	mg/L	1	**	**	**	**
Fósforo Total	mg/L P	0,1	0,15	0,15	**	**
Materiales Flotantes		Ausencia de material flotante	**	**	Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante
Nitratos	mg/L N	10	10	10	10	**
Nitritos	mg/L N	1	1	1	1(5)	**
Nitrógeno amoniacal	mg/L N	1,5	2	3,7	**	**
Olor		Aceptable	**	**	Aceptable	**
Oxígeno Disuelto	mg/L	>= 6	>= 5	>= 4	>= 5	>= 4
pH	Unidad de pH	6,5 - 8,5	5,5 - 9,0	5,5 - 9,0	6-9 (2,5)	**
Sódos Disueltos Totales	mg/L	1 000	1 000	1 500	**	**
Sulfatos	mg/L	250	**	**	**	**
Sulfuros	mg/L	0,05	**	**	0,05	**
Turbiedad	UNT ⁹⁰	5	100	**	100	**
INORGÁNICOS						
Aluminio	mg/L	0,2	0,2	0,2	0,2	**
Antimonio	mg/L	0,006	0,006	0,006	0,006	**
Arsénico	mg/L	0,01	0,01	0,05	0,01	**
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	0,7	**
Berilio	mg/L	0,004	0,04	0,04	0,04	**
Boro	mg/L	0,5	0,5	0,75	0,5	**
Cadmio	mg/L	0,003	0,003	0,01	0,01	**
Cobre	mg/L	2	2	2	2	**
Cromo Total	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	**
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	**
Hierro	mg/L	0,3	1	1	0,3	**
Manganeso	mg/L	0,1	0,4	0,5	0,1	**
Mercurio	mg/L	0,001	0,002	0,002	0,001	**
Níquel	mg/L	0,02	0,025	0,025	0,02	**
Plata	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	0,05
Plomo	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	**
Selenio	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	**
Uranio	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Vanadio	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zinc	mg/L	3	5	5	3	**
ORGÁNICOS						
I. COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES						
Hidrocarburos totales de petróleo, HTPP	mg/L	0,05	0,2	0,2		
Trihalometanos	mg/L	0,1	0,1	0,1	**	**
Compuestos Orgánicos Volátiles, COVs						
1,1,1-Tricloroetano - 71-55-6	mg/L	2	2	**	**	**
1,1-Dicloroetano - 75-35-4	mg/L	0,03	0,03	**	**	**
1,2-Dicloroetano - 107-06-2	mg/L	0,03	0,03	**	**	**
1,2-Diclorobenceno - 95-50-1	mg/L	1	1	**	**	**
Hexaclorobutadieno - 87-68-3	mg/L	0,0006	0,0006	**	**	**
Tetracloroetano - 127-18-4	mg/L	0,04	0,04	**	**	**
Tetracloro de Carbono - 56-23-5	mg/L	0,002	0,002	**	**	**
Tricloroetano - 79-01-6	mg/L	0,07	0,07	**	**	**
BETX						

DESCARGADO DESDE WWW.CIPICERUDO.COM.PE

PARAMETRO	UNIDAD	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable			Aguas superficiales destinadas para recreativa	
		A1	A2	A3	B1	B2
		Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado	Contacto Primario	Contacto Secundario
		VALOR	VALOR	VALOR	VALOR	VALOR
Benceno - 71-43-2	mg/L	0,01	0,01	**	**	**
Etilbenceno - 100-41-4	mg/L	0,3	0,3	**	**	**
Tolueno - 108-88-3	mg/L	0,7	0,7	**	**	**
Xilenos - 1330-20-7	mg/L	0,5	0,5	**	**	**
Hidrocarburos Aromáticos						
Benzo(a)pireno - 50-32-8	mg/L	0,0007	0,0007	**	**	**
Pentaclorofenol (PCP)	mg/L	0,009	0,009	**	**	**
Triclorobenzenos (Totales)	mg/L	0,02	0,02	**	**	**
Plaguicidas						
Organofosforados:						
Malatión	mg/L	0,0001	0,0001	**	**	**
Metamidofós (restringido)	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Paraquat (restringido)	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Paraatión	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Organoclorados (COP)*:						
Aldrin - 349-00-2	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Clordano	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
DDT	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Dieldrin - 60-57-1	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Endosulfán	mg/L	0,000056	0,000056	*	**	**
Endrín - 72-20-8	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Heptacloro - 76-44-8	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Heptacloro epóxido 1024-57-3	mg/L	0,0003	0,0003	*	**	**
Lindano	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Carbamatos:						
Aldicarb (restringido)	mg/L	Ausencia	Ausencia	Ausencia	**	**
Policloruros Bifenilos Totales (PCBs)						
(PCBs)	mg/L	0,000001	0,000001	**	**	**
Otros						
Asbesto	Miliones de fibras/L	7	**	**	**	**
MICROBIOLÓGICO						
Coliformes Termotolerantes (44,5 °C)	NMP/100 mL	0	2 000	20 000	200	1 000
Coliformes Totales (35 - 37 °C)	NMP/100 mL	50	3 000	50 000	1 000	4 000
Enterococos fecales	NMP/100 mL	0	0		200	**
Escherichia coli	NMP/100 mL	0	0		Ausencia	Ausencia
Formas parasitarias	Organismo/Litro	0	0		0	
Giardia duodenalis	Organismo/Litro	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella	Presencia/100 mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	0	0
Vibrio Cholerae	Presencia/100 mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

UNT Unidad Nefelométrica Turbiedad
NMP/100 mL Número más probable en 100 mL

* Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP)

** Se entenderá que para esta subcategoría, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la Autoridad competente determine.

CATEGORÍA 2: ACTIVIDADES MARINO COSTERAS

PARAMETRO	UNIDADES	AGUA DE MAR		
		Sub Categoría 1	Sub Categoría 2	Sub Categoría 3
		Extracción y Cultivo de Moluscos Bivalvos (C1)	Extracción y cultivo de otras especies hidrobiológicas (C2)	Otras Actividades (C3)
ORGANOLÉPTICOS				
Hidrocarburos de Petróleo		No Visible	No Visible	No Visible
FISICQUÍMICOS				
Aceites y grasas	mg/L	1,0	1,0	2,0
DBO ₅	mg/L	**	10,0	10,0
Oxígeno Disuelto	mg/L	≥4	≥3	≥2,5
pH	Unidad de pH	7 - 8,5	6,8 - 8,5	6,8 - 8,5
Sólidos Suspendedos Totales	mg/L	**	50,0	70,0
Sulfuro de Hidrógeno	mg/L	**	0,06	0,06
Temperatura	grados Celsius	**delta 3 °C	**delta 3 °C	**delta 3 °C
INORGÁNICOS				
Amoniaco	mg/L	**	0,08	0,21
Arsénico total	mg/L	0,05	0,05	0,05
Cadmio total	mg/L	0,0093	0,0093	0,0093
Cobre total	mg/L	0,0031	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05
Fosfatos (P-PO4)	mg/L	**	0,03 - 0,09	0,1

PARÁMETRO	UNIDADES	AGUA DE MAR		
		Sub Categoría 1	Sub Categoría 2	Sub Categoría 3
		Extracción y Cultivo de Moluscos Bivalvos (C1)	Extracción y cultivo de otras especies fitoplanctónicas (C2)	Otras Actividades (C3)
Mercurio total	mg/L	0,0034	0,0001	0,0001
Níquel total	mg/L	0,0082	0,1	0,1
Nitratos (N-NO3)	mg/L	**	0,07 - 0,28	0,3
Piomo total	mg/L	0,0081	0,0081	0,0081
Silicatos (Si-Si O3)	mg/L	**	0,14 - 0,70	**
Zinc total	mg/L	0,081	0,081	0,081
ORGÁNICOS				
Hidrocarburos de petróleo totales (fracción aromática)	mg/L	0,007	0,007	0,01
MICROBIOLÓGICOS				
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 mL	* ≤14 (área aprobada)	≤30	1000
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 mL	* ≤88 (área restringida)		

NMP/ 100 mL Número más probable en 100 mL.

* Área Aprobada: Áreas de donde se extraen o cultivan moluscos bivalvos seguros para el comercio directo y consumo, libres de contaminación fecal humana o animal, de organismos patógenos o cualquier sustancia deletérea o venenosa y potencialmente peligrosa.

** Área Restringida: Áreas acuáticas impactadas por un grado de contaminación donde se extraen moluscos bivalvos seguros para consumo humano luego de ser depurados.

** Se entenderá que para este uso, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la Autoridad competente lo determine.

*** La temperatura corresponde al promedio mensual mensual del área evaluada.

CATEGORÍA 3: RIEGO DE VEGETALES Y BEBIDAS DE ANIMALES

PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES DE TALLO BAJO Y TALLO ALTO		
PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR*
Fisicoquímicos		
Bicarbonatos	mg/L	370
Calcio	mg/L	200
Carbonatos	mg/L	5
Cloruros	mg/L	100-700
Conductividad	(uS/cm)	<2 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	15
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40
Fluoruros	mg/L	1
Fosfatos - P	mg/L	1
Nitratos (NO3-N)	mg/L	10
Nitritos (NO2-N)	mg/L	0,06
Oxígeno Disuelto	mg/L	> =4
pH	Unidad de pH	6,5 - 8,5
Sodio	mg/L	200
Sulfatos	mg/L	300
Sulfuros	mg/L	0,05
Inorgánicos		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,05
Bario total	mg/L	0,7
Boro	mg/L	0,5-6
Cadmio	mg/L	0,005
Cianuro Wad	mg/L	0,1
Cobalto	mg/L	0,05
Cobre	mg/L	0,2
Cromo (6+)	mg/L	0,1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Níquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Piomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	2
Orgánicos		
Acetas y Grasas	mg/L	1
Fenoles	mg/L	0,001
S.A.A.M. (detergentes)	mg/L	1
Plaguicidas		
Aldicarb	ug/L	1
Aldrin (CAS 309-00-2)	ug/L	0,004
Clordano (CAS 57-74-9)	ug/L	0,3
DDT	ug/L	0,001
Dieldrin (N° CAS 72-20-8)	ug/L	0,7
Endrin	ug/L	0,004

PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES DE TALLO BAJO Y TALLO ALTO		
PARAMETROS	UNIDAD	VALOR
Endosulfán	ug/L	0,02
Heptacloro (N° CAS 76-44-8) y heptacloropóxido	ug/L	0,1
Lindano	ug/L	4
Paratión	ug/L	7,5

CATEGORÍA 3: RIEGO DE VEGETALES Y BEBIDAS DE ANIMALES

PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES			
PARAMETROS	Unidad	Vegetales Tallo Bajo	Vegetales Tallo Alto
		Valor	Valor
Biológicos			
Coformes Termotolerantes	NMP/100mL	1 000	2 000(3)
Coformes Totales	NMP/100mL	5 000	5 000(3)
Enterococos	NMP/100mL	20	100
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100mL	100	100
Huevos de Helminfos	huevos/litro	<1	<1(1)
<i>Salmonella</i> sp.		Ausente	Ausente
<i>Vibrio cholerae</i>		Ausente	Ausente
PARÁMETROS PARA BEBIDAS DE ANIMALES			
PARAMETROS	UNIDAD	VALOR	
Fisicoquímicos			
Conductividad Eléctrica	(uS/cm)	≤5000	
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	≤15	
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40	
Fluoruro	mg/L	2	
Nitratos (NO3-N)	mg/L	50	
Nitritos (NO2-N)	mg/L	1	
Oxígeno Disuelto	mg/L	> 5	
pH	Unidades de pH	6,5 – 8,4	
Sulfatos	mg/L	500	
Sulfuros	mg/L	0,05	
Inorgánicos			
Aluminio	mg/L	5	
Arsénico	mg/L	0,1	
Berilio	mg/L	0,1	
Boro	mg/L	5	
Cadmio	mg/L	0,01	
Cianuro WAD	mg/L	0,1	
Cobalto	mg/L	1	
Cobre	mg/L	0,5	
Cromo (6+)	mg/L	1	
Hierro	mg/L	1	
Litio	mg/L	2,5	
Magnesio	mg/L	150	
Manganeso	mg/L	0,2	
Mercurio	mg/L	0,001	
Níquel	mg/L	0,2	
Plata	mg/L	0,05	
Plomo	mg/L	0,05	
Selenio	mg/L	0,05	
Zinc	mg/L	24	
Orgánicos			
Aceites y Grasas	mg/L	1	
Fenoles	mg/L	0,001	
S.A.A.M. (detergentes)	mg/L	1	
Plaguicidas			
Aldicarb	ug/L	1	
Aldrin (CAS 309-00-2)	ug/L	0,03	
Clordano (CAS 57-74-9)	ug/L	0,3	
DDT	ug/L	1	
Dieldrin (N° CAS 72-20-8)	ug/L	0,7	
Endosulfán	ug/L	0,02	

Endrín	ug/L	0,004
Heptacloro (N° CAS 76-44-8) y heptacloripóvodo	ug/L	0,1
Lindano	ug/L	4
Paratión	ug/L	7,5
Biológicos		
Coliformes Termotolerantes	NMP/100mL	1 000
Coliformes Totales	NMP/100mL	5 000
Enterococos	NMP/100mL	20
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100mL	100
Huevos de Helminfos	huevo/filtro	<1
<i>Salmonella</i> sp.		Ausente
<i>Vibrio cholerae</i>		Ausente

NOTA:

NMP/100: Número más probable en 100 ml.

Vegetales de Tallo alto: Son plantas cultivables o no, de porte arbustivo o arbóreo y tienen una buena longitud de tallo, las especies leñosas y forestales tienen un sistema radicular pivotante profundo (1 a 20 metros). Ejemplo: Forestales, árboles frutales, etc.

Vegetales de Tallo bajo: Son plantas cultivables o no, frecuentemente porte herbáceo, debido a su poca longitud de tallo alcanzan poca altura. Usualmente, las especies herbáceas de porte bajo tienen un sistema radicular difuso o fibroso, poco profundo (10 a 50 cm). Ejemplo: Hortalizas y verdura de tallo corto, como ajo, lechuga, fresas, col, repollo, apio y arveja, etc.

Animales mayores: Entiéndase como animales mayores a vacunos, ovinos, porcinos, camélidos y equinos, etc.

Animales menores: Entiéndase como animales menores a caprinos, cuyes, aves y conejos

SAAM: Sustancias activas de azul de metileno

CATEGORÍA 4: CONSERVACIÓN DEL AMBIENTE ACUÁTICO

PARÁMETROS	UNIDADES	LAGUNAS Y LAGOS	RIOS			ECOSISTEMAS MARINO COSTEROS	
			COSTA Y SIERRA	SELVA	ESTUARIOS	MARINOS	
FÍSICOS Y QUÍMICOS							
Aceites y grasas	mg/L	Ausencia de película visible	Ausencia de película visible	Ausencia de película visible	1	1	
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	mg/L	<5	<10	<10	15	10	
Nitrógeno Amoniacal	mg/L	<0,02	0,02	0,05	0,05	0,08	
Temperatura	Celsius						delta 3 °C
Oxígeno Disuelto	mg/L	≥5	≥5	≥5	≥4	≥4	
pH	unidad	6,5-8,5	6,5-8,5		6,8-8,5	6,8 - 8,5	
Sólidos Disueltos Totales	mg/L	500	500	500	500		
Sólidos Suspensivos Totales	mg/L	≤25	≤25 - 100	≤25 - 400	≤25-100	30,00	
INORGÁNICOS							
Arsénico	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05	
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	—	
Cadmio	mg/L	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	
Cianuro Libre	mg/L	0,022	0,022	0,022	0,022	—	
Clorofila A	mg/L	10	—	—	—	—	
Cobre	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,05	0,05	
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Fenoles	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,001	—	
Fosfatos Total	mg/L	0,4	0,5	0,5	0,5	0,031 - 0,093	
Hidrocarburos de Petróleo Aromáticos Totales	Ausente				Ausente	Ausente	
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,001	0,0001	
Nitratos (N-NO3)	mg/L	5	10	10	10	0,07 - 0,28	
INORGÁNICOS							
Nitrógeno Total	mg/L	1,6	1,6		—	—	
Níquel	mg/L	0,025	0,025	0,025	0,002	0,0082	
Plomo	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,0081	0,0081	
Silicatos	mg/L	—	—	—	—	0,14-0,7	
Sulfuro de Hidrógeno (H2S indisoluble)	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,002	0,06	
Zinc	mg/L	0,03	0,03	0,3	0,03	0,081	
MICROBIOLÓGICOS							
Coliformes Termotolerantes	(NMP/100mL)	1 000	2 000		1 000	≤30	
Coliformes Totales	(NMP/100mL)	2 000	3 000		2 000		

NOTA: Aquellos parámetros que no tienen valor asignado se debe reportar cuando se dispone de análisis

Dureza: Medir "dureza" del agua muestreada para contribuir en la interpretación de los datos (método/técnica recomendada: APHA-AWWA-WPCF 2340C)

Nitrógeno total: Equivalente a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (Nitrógeno orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato y nitrógeno en forma de nitrilo (NO)

Amonio: Como NH3 no ionizado

NMP/100 mL: Número más probable de 100 mL

Ausente: No deben estar presentes a concentraciones que sean detectables por olor, que afecten a los organismos acuáticos comestibles, que puedan formar depósitos de sedimentos en las orillas o en el fondo, que puedan ser detectados como películas visibles en la superficie o que sean nocivos a los organismos acuáticos presentes.