



ANEXO 1

**FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE
INVESTIGACIÓN CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU**

1. Título del proyecto

CALIDAD DEL AGUA Y COLIFORMES TERMOTOLERANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE *Oncorhynchus mykiss* DE LOS CRIADEROS DE JAULAS FLOTANTES - MUELLE BARCO – CHUCUITO.

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Ciencias Biomédicas	Recursos Naturales y Medio Ambiente	Calidad Ambiental

3. Duración del proyecto (meses)

12 Meses

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	<input type="checkbox"/>
<u>Multidisciplinario</u>	<input checked="" type="radio"/>
<u>Director de tesis pregrado</u>	<input type="checkbox"/>

5. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Carpio Vásquez Buenaventura Optaciano (INVESTIGADOR PRINCIPAL) Pauro Roque Juan José (CO INVESTIGADOR) Choquehuanca Panclas Dante Joni (CO INVESTIGADOR) Colquehuanca Solis Joel (CO INVESTIGADOR)
Escuela Profesional	Biología
Celulares	951 888 575 957 727 771 953 281 850 935 305 765
Correo Electrónico	bocarpio@unap.edu.pe



I. Título

CALIDAD DEL AGUA Y COLIFORMES TERMOTOLERANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE *Oncorhynchus mykiss* DE LOS CRIADEROS DE JAULAS FLOTANTES - MUELLE BARCO – CHUCUITO.

II. Resumen del Proyecto de Investigación

El estudio tiene como objetivo determinar la resistencia a los diferentes antibióticos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), eritromicina (10 µg), oxafloxacina (30 µg), gentamicina, entre otros, en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* de las zonas de criadero de truchas - Chucuito, límite entre el distrito de Platería a Puno, provincia de Puno, departamento de Puno. Metodología: La determinación y el aislamiento de las bacterias coliformes totales y termotolerantes, se realizarán a partir de las heces del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss*, utilizando la técnica del número más probable (NMP), seguidamente se realizará la siembra por estría de los tubos positivos de Caldo Verde Brillante Bilis y Caldo EC a medio Agar Mc Conkey, para su identificación por pruebas bioquímicas convencionales, TSI, LIA, Citrato e Indol. La respuesta antimicrobiana se realizará mediante el método de Kirby Bauer. El método estadístico para determinar la resistencia antimicrobiana se realizará usando el Test de Shapiro – Wilk, Test de Bartlett, análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de TUKEY ($P \leq 0.05$); serán analizados con el software R-Studio 4.0.0 Resultados: Se lograrán aislar e identificar diferentes cepas bacterianas, con su respectiva sensibilidad antimicrobiana.

III. Palabras claves

Antibióticos, resistencia, calidad, coliformes, *Oncorhynchus mykiss*

IV. Justificación del proyecto

Las zonas de influencia de los criaderos de truchas en jaulas flotantes del sector Chucuito, resulta ser un punto estratégico de producción y venta de trucha “arco iris”, para la ciudad de Puno y demás localidades aledañas, incluso siendo el primer productor de trucha a nivel nacional que se exportan a Bolivia y otros países, constituyendo un punto de acopio de trucha, adquiridas de diferentes zonas que realizan acuicultura, esta actividad representa un alto riesgo para la salud humana.

Sin embargo, la identificación y determinación de las bacterias en un futuro permitirán monitorear el cuerpo de agua, ozonificar las zonas con mayor carga de bacterias resistentes a antibióticos, el cuerpo de agua, generar políticas públicas en la prevención del uso de antimicrobianos o alguna medida de mitigación.

V. Antecedentes del proyecto

Los cuerpos de agua, constituyen la principal fuente de microorganismo con potencial biotecnológico (Moraga et al., 2003). La utilización de diversos antimicrobianos, en sistemas acuícolas, origina el desarrollo de bacterias resistentes, que afectan el desarrollo y crecimiento de las especies ícticas (Naviner et al., 2011). A nivel de intestino y heces de salmón, existe la presencia de bacterias que son multirresistentes a tetraciclina, eritromicina, ampicilina y cloranfenicol (Higuera et al., 2018). Por otro lado, en heces de “pez dorado” (*Sparus aurata*), *Escherichia coli* posee genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (BLEE) tales como: bla SHV – 12 y bla TEM – 52, y otros genes de resistencia: cml A, tet A, aad A, sul 1, sul 2 y sul 3 (Sousa et al., 2011).

En estanques de cultivo de Tilapia, *Enterobacter cloacae* MF68, *Enterobacter cloacae* MF86, *Proteus vulgaris* T17, *Proteus* sp. T51, *Klebsiella oxytoca* T106 y *Pseudomona* sp. T7, expresan genes de multirresistencia a los antibióticos (Poole, et al., 2017). Las bacterias que son multirresistentes a los antibióticos, también son resistentes a metales pesados (Martínez et al., 2010 y Gómez et al., 2002). Finalmente, los microorganismos que son capaces de ser resistentes a antibióticos y metales pesados, constituyen una de las herramientas biotecnológicas más prometedoras para la recuperación de los ecosistemas (Muñoz et al., 2012).

Escherichia coli, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp. y *Acinetobacter*, son resistentes a di-bromomercurio (Acevedo & Severiche, 2013). Por otro lado, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* presentaron multirresistencia a ampicilina, amikacina, cefomax, cefatoxima y nitrofurantoina (Moraga et al., 2003). Los metales, seleccionan microorganismos resistentes a antibióticos (Cervantes et al., 2006).

En estanques de cultivo de Tilapia, se determinaron genes de multirresistencia, en: *Enterobacter cloacae* MF68 [sul2 (resistencia a Sulfonamidas), strA – str B (resistencia a Streptomycin) y dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim)], *Enterobacter cloacae* MF86 [sul1 (resistencia a Sulfonamidas), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y blaTEM (resistencia a betalactamasas)], *Proteus vulgaris* T17 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas), strA,B (resistencia a estreptomycin), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y mefA (resistencia a eritromicina)], *Proteus* sp. T51 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas), strA,B (resistencia a estreptomycin), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim), blaTEM (resistencia a betalactamasas), mefA (resistencia a eritromicina) y cat 1 (resistencia a cloranfenicol)], *Klebsiella oxytoca* T106 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas) y blaTEM (resistencia a betalactamasas)] y *Pseudomona* sp. T7 [sul1 (resistencia a Sulfonamidas), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y blaTEM (resistencia a betalactamasas)] (Poole, et al., 2017). Al respecto, la multirresistencia presente en bacterias de tilapias silvestres y tilapias cultivadas, se debe al uso irresponsable de antimicrobianos (Álvarez et al., 2004).

Pseudomona sp. y *Serratia* sp, aisladas de intestino y heces de salmón, fueron multirresistentes a tetraciclina (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), eritromicina (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), ampicilina (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) y cloranfenicol (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$); así mismo se determinó la presencia de



genes de resistencia a tetraciclina: tetA, tetB, tetE, tetL, tetH, tet34 y tet35 (Higuera et al., 2018). Por otra parte, en muestras de heces de pez dorado (*Sparus aurata*), *Escherichia coli*, tiene genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (BLEE): bla SHV – 12 y bla TEM – 52 (genes de resistencia a betalactámicos tales como Ampicilina), además de otros genes de resistencia: cml A, tet A, aad A, sul 1, sul 2 y sul 3 (Sousa et al., 2011). Al respecto, los genes localizadas en un mismo Plásmido, que dan resistencia al cobre (Cu) (pcoA-D, silABC, pcoA-E), está ligado a genes de resistencia a diversos antibióticos (blaCTX-M-15 (BL), blaTEM-1 (BL), blaOXA-1 (BL), aac(6')-lb-cr (FQ), aadA2 (AG), tetA (TC), dhfrXII (TP), sul1 (SP), mphR-mxr-mphA (ML), qacEΔ1 (QACS), para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Poole et al., 2017). Finalmente, la resistencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* a múltiples antibióticos, se debería al mercurio (Hg) y hierro (Fe) (Rafiq et al. 2017).

Escherichia coli, *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp., presentan una sensibilidad a cefotaxima, cefalexima y ceftriaxona, mostrando halos de inhibición mayores a 18, 20 y 21 mm; además, de que dichas bacterias presentan mayores recuentos en presencia de Pb (Coila, 2017). El Ministerio del Ambiente (MINAM, 2013), menciona que, en quince puntos de las aguas de la bahía interior de Puno, el recuento de coliformes totales y termotolerantes, superan los límites máximos permisibles de los estándares de calidad ambiental (ECA).

VI. Hipótesis del trabajo

1.1. Hipótesis General:

La calidad del agua del área de estudio cumple con los estándares nacionales de calidad ambiental, mientras que los coliformes totales y termotolerantes aislados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* de los criaderos de jaulas flotantes - muelle Barco – Chucuito, son resistentes a los diferentes antibióticos.

1.2. Hipótesis Específicos:

La calidad del agua del área de influencia de los criaderos de trucha en jaulas flotantes de Chucuito, cumplen con los estándares nacionales de calidad ambiental.

Las bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del área de influencia de los criaderos de trucha en jaulas flotantes, son resistentes a los antibióticos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg), oxafloxacina (30 µg), gentamicina, entre otros.

VII. Objetivo general

Determinar la calidad del agua y coliformes termotolerantes resistentes a antibióticos del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* de los criaderos de jaulas flotantes muelle Barco – Chucuito.

VIII. Objetivos específicos

Evaluar la calidad del agua del área de influencia de los criaderos de trucha en jaulas flotantes de Chucuito, con los estándares de calidad ambiental.

Determinar la resistencia a los antibióticos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg), oxafloxacina (30 µg), gentamicina, entre otros, en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del área de influencia de los criaderos de trucha en jaulas flotantes.

IX. Metodología de investigación

3.1 Área de Estudio.

El aislamiento de las muestras de bacterias de coliformes totales y termotolerantes, se realizará a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arco iris”. La colecta de “trucha arco iris” en estado juvenil, con apariencia saludable, será a través de compras directas de los expendedores de forma personal de los criaderos de truchas en jaulas flotantes durante los meses de febrero a junio de 2021. Seguidamente, se transportarán al laboratorio de Zoología donde se realizó el siguiente procesamiento: disección aséptica, se retirará del tracto gastrointestinal, la colecta de heces, pruebas de resistencia antimicrobiana.

3.2 Tipo de Estudio.

El proyecto de investigación, es de tipo experimental.

3.3 Población y Muestra

Constituida por:

Muestras de agua

Heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arco iris”.

Coliformes Totales: se obtendrán a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arco iris”.

Coliformes Termotolerantes: se obtendrán a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arco iris”.

3.4 Diseño de la Investigación

Para determinar la calidad del agua y resistencia antimicrobiana se utilizara un diseño de análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), considerando que los tratamientos para la resistencia antimicrobiana estuvieron conformados por los discos de sensibilidad ampicilina 10 µg (T1), tetraciclina 30 µg (T2), ciprofloxacino 5 µg (T3), eritromicina 10 µg (T4), entre otros, datos que serán analizados en el software R-Studio 4.0.0.

3.5 Metodología.

a. Calidad de agua.

Técnica: Método número más probable (NMP)



Fundamento: La técnica se basa en la determinación del número más probable (NMP) consta de dos fases, una fase presuntiva, donde se observa la presencia de gas en los tubos con caldo Lauril triptosa y una fase confirmatoria, donde los tubos positivos de caldo Lauril triptosa son inoculados en tubos con verde brillante bilis y medio E.C, incubándose a 44.5 en baño con temperatura constante, durante 24 horas.

Procedimientos:

El método consiste en utilizar como medio de cultivo para la prueba presuntiva, Caldo Lauril Triptosa en volúmenes de 10 mL de concentración simple (X), para inóculos de 1 mL y de doble concentración (2X) para inóculos de 10 mL.

Luego de inocular la muestra de heces, se incubó a 37 °C por 24 - 48 horas, considerándose como positivos los tubos con presencia de gas y turbidez.

De los tubos positivos, para la prueba confirmatoria, se transfirió una asada a tubos con Caldo Verde Brillante bilis (Coliformes totales) y Caldo EC (Coliformes termotolerantes). Se incubó a 37 °C por 24 – 48 horas los tubos de Caldo Brillante bilis y a 44, 5°C durante 24 horas los tubos con Caldo EC en baño María.

La formación de gas y turbiedad en los tubos de Caldo Verde Brillante bilis y Caldo EC, se les consideró como positivos para Coliformes Totales y Coliformes Termotolerantes, respectivamente.

Finalmente, se realizará el recuento con la tabla del número más probable.

b. Resistencia antimicrobiana

Aislamiento de bacterias coliformes totales y termotolerantes

Técnica: Método número más probable (NMP)

Fundamento: La técnica se basa en la determinación del número más probable (NMP) consta de dos fases, una fase presuntiva, donde se observa la presencia de gas en los tubos con caldo Lauril triptosa y una fase confirmatoria, donde los tubos positivos de caldo Lauril triptosa son inoculados en tubos con verde brillante bilis y medio E.C, incubándose a 44.5 en baño con temperatura constante, durante 24 horas.

Procedimientos:

El método consiste en utilizar como medio de cultivo para la prueba presuntiva, Caldo Lauril Triptosa en volúmenes de 10 mL de concentración simple (X), para inóculos de 1 mL y de doble concentración (2X) para inóculos de 10 mL.

Luego de inocular la muestra de heces, se incubó a 37 °C por 24 - 48 horas, considerándose como positivos los tubos con presencia de gas y turbidez.

De los tubos positivos, para la prueba confirmatoria, se transfirió una asada a tubos con Caldo Verde Brillante bilis (Coliformes totales) y Caldo EC (Coliformes termotolerantes). Se incubó a 37 °C por 24 – 48 horas los tubos de Caldo Brillante bilis y a 44, 5°C durante 24 horas los tubos con Caldo EC en baño María.

La formación de gas y turbiedad en los tubos de Caldo Verde Brillante bilis y Caldo EC, se les consideró como positivos para Coliformes Totales y Coliformes Termotolerantes, respectivamente.

Finalmente, se realizó el aislamiento de los tubos positivos con Caldo Verde Brillante Bilis y Caldo EC a medio Agar MackConkey, para su identificación.

Caracterización de bacterias coliformes totales y termotolerantes (INS, 2002)

Técnica: Pruebas bioquímicas por medios diferenciales

Fundamento: Los medios diferenciales son medios que contienen sustancias o indicadores que permiten la diferenciación de un microorganismo de otros.

Procedimientos:

Las colonias que desarrollaron en el medio Agar MackConkey, se sembraron en



los medios diferenciales, para luego ser incubadas a 37°C por 24 horas.

La interpretación de resultados será de acuerdo al viraje de color:

- a. TSI: presencia de gas y viraje a color amarillo (lactosa positivo (+)).
- b. LIA: Viraje a color rojizo es positivo (+).
- c. Citrato de Simmons: Viraje a color azul es positivo (+).
- d. INDOL: Adición del Reactivo de Kovac para la formación de un anillo de color fucsia (positivo (+)).

Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana (INS, 2002)

Técnica: Disco Difusión

Fundamento: Este método está basado en el trabajo de Kirby Bauer, está recomendado para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco – placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculado con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

Procedimiento:

Identificación de las cepas bacterianas.

Realizar la preparación de caldo Mueller Hinton a una escala de MacFarland de 0.5.

Depositar en la superficie de Cultivo de Mueller Hinton por agotamiento.

Colocar los discos de sensibilidad: ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (30 µg) y eritromicina (10 µg).

Incubar a 37°C por 24 Horas, para luego realizar su respectiva lectura.

La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:

La evaluación del efecto antibacteriano se realizó midiendo los halos de inhibición bacteriana (mm) con un vernier calibrado, asimismo se midió los halos de inhibición del blanco (agua destilada) y el control positivo, para ello se utilizó la amoxicilina comercial.

El porcentaje de inhibición de los discos de antibióticos se calculó reemplazando los diámetros en la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\emptyset \text{ de la muestra} - \emptyset \text{ del blanco})}{(\emptyset \text{ del control} - \emptyset \text{ del blanco})} \times 100$$

Dónde: % = porcentaje y \emptyset = diámetro

Variables que se analizarán:

Variable independiente: Coliformes totales y termotolerantes

Variable dependiente: Halos de inhibición bacteriana

Aplicación de Prueba estadística.

Se realizará el Test de Shapiro – Wilk, para comprobar la normalidad de datos, seguido del Test de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas, y finalmente el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con la prueba de TUKEY ($P \leq 0.05$). Considerando que los tratamientos estuvieron conformados por los discos de



sensibilidad ampicilina 10 μg (T1), tetraciclina 30 μg (T2), ciprofloxacino 5 μg (T3), eritromicina 10 μg (T4), entre otros. Finalmente, los datos obtenidos de Halos de inhibición, fueron analizados en el software R-Studio 4.0.0.

X. Referencias

- ACEVEDO R. & SEVERICHE C. (2013). Identificación de bacterias resistentes a di – bromo – mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. *AVANCES Investigaciones e Ingeniería*. 10(2): p. 73 – 79.
- ALVAREZ, J., AGURTO, C., ALVAREZ, A y OBREGON, J. (2004). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Revista Científica*. 14(6), 1 -16.
- ALVAREZ, A. (2018). Evaluación de Metales pesados en agua del río Ramis sector Crucero – San Antón y su interpretación en software. Tesis para optar el grado académico de Magister Scientiae en Tecnologías de Protección Ambiental. Puno, Perú 2018.
- ALONSO, A. ET AL. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3, 1–9.
- APHA, WEF, AWWA., (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19 th edition. American Public Health Association. Washington DC.
- ARA S., CHOQUE A. & AVENDAÑO E. (2009). Resistencia y degradación de arsénico por las comunidades bacterianas de las aguas del rio maure – Tacna, Perú, *Ciencia y Desarrollo*. 11: P. 41 -44.
- ARAOZ M. (2018). Evaluación de la resistencia de *Escherichia coli* al cloruro de mercurio en la bahía interior de Puno. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.
- AUSTIN B, AUSTIN DA. (2016). 6 th ed. *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish*. Suiza: Springer International. 761 p.
- BELTRÁN, M. & GÓMEZ, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Facultad de Ciencias Básicas*. 12 (2). Recuperado de <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>.
- BAKER-AUSTIN, C., WRIGHT, M.S., STEPANAUSKAS, R., MC ARTHUR, J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 1, 176-182.
- BERG J., TOM – PETERSEN A., NYBROE O. (2005). Copper amendment of agricultura soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:146-151.
- BERTOLOTTI R. F. & NOE M.N. Concentración de plomo, mercurio y cadmio en músculos de peces y muestras de agua procedentes del Río Santa, Ancash – Perú. *Salud tecnol. Vet.* 2018;1: 35-41.
- BURRIDGE L., WEIS J. S., CABELLO F., PIZARRO J., BOSTICK K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7–23.
- BUSH K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277: 84-90.
- CAÑIZARES, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42 (1), 131 -143.



- CERVANTES, C., Espino, A., ACEVEDO, F., LEÓN, I., RIVERA, M. ÁVILA, M., WROBEL, K., WROBEL, K., GUTIERREZ, J., RODRIGUEZ, J. y MORENO, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2), 203 – 2010.
- CHAPMAN, J.S. (2003) Disinfectant resistance mechanisms, cross resistance, and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 51, 271–276
- COILA A. (2017). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en Bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación espinar de la ciudad de Puno. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.
- COYNE R, BERGH Ø, SAMUELSEN O, ANDERSEN K, LUNESTAD BT, NILSEN H, DALSGAARD I, SMITH P. (2004). Attempt to validate breakpoint MIC values estimated from pharmacokinetic data obtained during oxolinic acid therapy of winter ulcer disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 238:51-66
- DAZA RM. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998 (22): 57-67
- DEAN R. J., SHIMMIELD T. M., BLACK K. D. (2007). Copper, zinc and cadmium in marine cage fish farm sediments: an extensive survey. *Environ. Pollut.* 145, 84–95 10.1016/j.envpol.2006.03.050.
- GARCÍA A., GARCÍA E., HERNÁNDEZ A., RUIZ J., YAGÜE G., HERRERO J., GÓMEZ JOAQUÍN. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter.* 24 (2), p 57 – 66.
- GARCÍA M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. *Resistencia. Sanid. Mil.*; 69 (4): 244-248; ISSN: 1887-8571.
- GHOSH, A. ET AL. (2000). Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 6–11
- GOMEZ Y., COTO O., ABÍN L. & HERNÁNDEZ C. 2002. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Cuba.* 33(1): 27 – 31.
- HASMAN, H. AND AARESTRUP, F.M. (2002). *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1410–1416
- HERNÁNDEZ R., FERNÁNDEZ C. & BAPTISTA M. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p.
- HIGUERA-LLANTÉN, S., VÁSQUEZ-PONCE, F., BARRIENTOS-ESPINOZA, B., MARDONES, FO, MARSHALL, SH, Y OLIVARES-PACHECO, J. (2018). El tratamiento antibiótico extendido en granjas de salmón selecciona bacterias intestinales multirresistentes con una alta prevalencia de genes de resistencia a antibióticos. *PloS one*, 13 (9), e0203641.
- HOLD J. AND HENDRICKS D. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Edición Ilustrada. Editor Lippincott Williams & Wilkins. 789 p.
- HUANG Y, ZHANG L, TIU L, WANG HH. (2016). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front Microbiol* 6: 9-14.



- INS, Instituto Nacional de Salud. (2012). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N°. 30. Lima – Perú. 67p.
- JACOBY GA. (2009). AMPC BETA-LACTAMASES. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 22(1): 161-182.
- KONEMAN W. Y ALLEN KONEMAN. (2008). Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6ta Edición Argentina. Ed. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0895-4
- MANAGE P. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. Sri Lanka J. Aquat. Sci. 23 (1): 13-27.
- MARTINEZ A., CRUZ M., VERANES O., CARBALLO M., SALGADO I., OLIVARES S., et al. 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas de río Almedares. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 41: 1 – 10.
- MILLER RA, HARBOTTLE H. (2017). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. Microbiol Spectrum 6(1): ARBA-0017-2017.
- MINAM. 2017. Normas Legales, Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua N° 004 – 2017 – MINAM. La ley de Recursos Hídricos. Ley N° 29338. Lima.
- MINAM. 2013. Línea base ambiental de la cuenca del lago Titicaca. Dirección General de Calidad Ambiental. Viceministerio de Gestión Ambiental. Lima – Perú. 85p.
- MINSA, Ministerio de Salud. 2007. Protocolo de monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). Lima – Perú. 21 p.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto

Los resultados del trabajo permitirán monitorear el cuerpo de agua, ozonificar las zonas con mayor carga de bacterias resistentes a antibióticos, generar políticas públicas en la prevención del uso de antimicrobianos o alguna medida de mitigación.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

El impacto será positivo por cuanto nos permitirá evaluar los resultados que serán divulgados a la sociedad.

ii. Impactos económicos

El impacto económico será la implementación de una nueva alternativa de alimentación a los peces, que sean más accesibles y posean menor costo.

iii. Impactos sociales

Permitirá generar políticas públicas de salud, en la prevención de infecciones



a las personas que están en contacto con estas aguas tales como el sembrador, el transportador y manipulador.

iv. Impactos ambientales

Proporcionar el conocimiento del estado actual del ecosistema respecto a la contaminación con antimicrobianos

XIII. Recursos necesarios

Infraestructura. Laboratorio de Zoología UNA PUNO
Equipos: Estufa, auto clave, incubadora, baño María, medios de cultivo diferenciales, placas Petry, matraces, pipetas manuales, discos de sensibilidad, Mac Farland, entre otros.

XIV. Localización del proyecto

Laboratorio de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Presentación del formato de investigación	x												
Muestreo y ejecución del proyecto		x	x	x	x	x	x						
Realización de ensayos de laboratorio			x	x	x	x	x	x	x				
Análisis del resultado de los ensayos						x	x	x	x	x	x		
Redacción del informe de investigación									x	x	x		
Presentación del informe final													x

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Materiales y equipos	Varios	Varios	Varios	6,000.00
Medios de cultivo	ensayos	300	10	3,000.00
Placas Petry	Ensayos	50.	20	1,000.00
Frascos de vidrio	Ensayos	10	18	180.00
Otros gastos	--	--	--	10,180.00