

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias tolerantes a Plomo (Pb)
aisladas a partir de aguas de la margen izquierda del río Tumbes**

**TESIS para optar el título profesional de Ingeniero Forestal y Medio
Ambiente**

Autor:

Bach. Gonzales Ladines Jesús Edilberto

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias tolerantes a Plomo (Pb)
aisladas a partir de aguas de la margen izquierda del río Tumbes**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Cruz Cerro Gerardo (Presidente): _____

Dra. Solís Castro Rosa Liliana (Secretaria): _____

Mg. Feijoó Carrillo Cesar Yoel (Vocal): _____

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias tolerantes a Plomo (Pb)
aisladas a partir de aguas de la margen izquierda del río Tumbes**

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma.

Bach. Gonzales Ladines Jesús Edilberto (Autor): _____

Dr. Herrera Palacios Eber Leopoldo (Asesor): _____

Mg. Rimaycuna Ramírez John Henry (Co-asesor): _____

Tumbes, 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA



ANEXO VIII

"AÑO DEL BICENTENARIO DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA INDEPENDENCIA, Y DE LA
 CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PRESENCIAL

En Tumbes, a los veintiuno días del mes de mayo del dos mil veinticuatro, siendo las dos horas y treinta minutos, en el aula de Investigación IGA Pabellón Escuela Ingeniería Forestal y Medio Ambiente - Ciudad Universitaria, se reunieron el Jurado Calificador de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, designado por Resolución N° 091-2023/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D, **Dr. Gerardo Juan Francisco Cruz Cerro**, Presidente, **Dra. Rosa Liliana, Castro Solís**, Secretario, **Mg. Cesar Yoel Feijoo Carrillo**, Vocal, **Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios**, miembro Asesor, reconociendo en la misma resolución además, al **Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios**, como **Asesor**, y **Mg. Jhon Henry Rimaycuna Ramirez**, como **Co-Asesor**, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: "**Identificación molecular de bacterias tolerantes a Plomo (Pb) aisladas a partir de aguas de la margen izquierda del rio Tumbes.**", para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente, presentado por el **Bach. JESÚS EDILBERTO GONZALES LADINES**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 151 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al **Bach. JESÚS EDILBERTO GONZALES LADINES**, APROBADO por UNANIMIDAD con calificativo de BUENO. Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica. En consecuencia, queda APTO para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes. Siendo las 3 horas y 45 minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 21 de mayo del 2024

Dr. Gerardo Juan Francisco Cruz Cerro
 DNI N° 80661595
 CODIGO ORCID 0000-0001-6096-0183
 Presidente

Mg. Cesar Joel Feijoo Carrillo
 DNI N° 42766283
 CODIGO ORCID 0009-0007-6197-123x
 VOCAL

Dra. Rosa Liliana, Castro Solís
 DNI N° 17628592
 CODIGO ORCID 0000-0002-1813-8644
 Secretario

Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios
 DNI N° 42450218
 CODIGO ORCID 0000-0002-7255-9087
 Miembro - Asesor

Informe de Tesis Jesus Gonzales

by Jesus Ladines



Dr. Eber Cepolodo Herrera Palacios
<https://efcsd.sap.000030002.7255-9087>
DNI: 42450218
Docente Asesor

Submission date: 28-May-2024 08:08AM (UTC-0500)

Submission ID: 2389941079

File name: INFORME_FINAL_DE_TESIS-JESU_S_GONZALES_LADINES.docx (7.91M)

Word count: 12745

Character count: 70202

Informe de Tesis Jesus Gonzales

ORIGINALITY REPORT

17%	15%	5%	6%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repositorio.untumbes.edu.pe Internet Source	2%
2	dspace.esoch.edu.ec Internet Source	2%
3	www.scielo.org.mx Internet Source	1%
4	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Student Paper	1%
5	repositorio.ucv.edu.pe Internet Source	1%
6	hdl.handle.net Internet Source	1%
7	bonga.unisimon.edu.co Internet Source	1%
8	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Student Paper	1%
9	repositorio.xoc.uam.mx	


Dr. Eduardo Heredia Palacios
IDM: 4243078
Docente Asesor

	Internet Source	<1 %
10	riaa.uaem.mx Internet Source	<1 %
11	repositorio.concytec.gob.pe Internet Source	<1 %
12	grad.uprm.edu Internet Source	<1 %
13	W. Zhou. "The causes and clinical significance of fever in systemic lupus erythematosus: a retrospective study of 487 hospitalised patients", <i>Lupus</i> , 08/01/2009 Publication	<1 %
14	Ahmed Ali El-Sayed M. Ata, Mobarak H. Aly, Hend Hussein, Mohamed Hamdy Eid et al. "Hydrogeochemical characteristics and air quality risks associated with gold mining operations in Egypt using geochemical modeling and risk indices", <i>Heliyon</i> , 2024 Publication	<1 %
15	Christophe Len, Denis Postel, Boumediene Meddah, Pierre Villa, Gino Ronco. "SYNTHESIS OF POLY(DITHIO-, THIO-AND CARBAMOYL (THIO)ESTER) DERIVATIVES OF D-GLUCOSE", Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2001 Publication	<1 %



Dr. César Leopoldo Herrera Franco
 https://orcid.org/0000-0002-7250-9087
 ORCID: 0000-0002-7250-9087
 Docente Asesor

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a mi madre Judith Ladines, por el apoyo incondicional, por enseñarme con el ejemplo a cumplir todo lo que me proponga y vencer todos los obstáculos que se presenten en el camino.

A mis hermanos Martín y Anthuane por ser el motivo de salir adelante día a día, de superarme, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios por tenerme con vida y salud, por llegar a esta etapa en mi vida y culminar mi proyecto de tesis.

Un agradecimiento muy especial a mi Asesor Dr. Herrera Palacios Eber Leopoldo, mi Co Asesor Mg. Rimaycuna Ramírez John Henry, MSc. Suarez Peña Erick Antonio quienes me ayudaron en este proceso de investigación, su experiencia y sus enseñanzas fueron pieza clave en esta etapa profesional.

Agradecer al proyecto CANON financiado por la universidad Nacional de Tumbes *“Desarrollo de un kit de detección múltiple de bacterias indicadoras de contaminación de As y/o metales pesados en ambientes acuáticos, validado mediante técnicas moleculares”* cuyo responsable es el Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios.

A mis amigos Ing. Seminario Juárez Karla Lucía, Br. Paucar Córdova Kenyi Waldir y Br. Querevalú Dedios Rocío Anabelle por la ayuda que me brindaron, por el gran apoyo en el campo y en el laboratorio durante la ejecución de esta investigación de Tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.	Metales Pesados.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.	Plomo (Pb)	¡Error! Marcador no definido.
2.3.	Bacterias	¡Error! Marcador no definido.
2.4.	Análisis molecular	¡Error! Marcador no definido.
2.4.1.	Reacción en cadena de polimerasa (PCR) ...	¡Error! Marcador no definido.
2.4.2.	Electroforesis.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4.3.	Secuenciamiento	¡Error! Marcador no definido.
2.5.	Antecedentes.....	¡Error! Marcador no definido.
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1.	Ubicación del Área de estudio	¡Error! Marcador no definido.
3.2.	Muestreo	¡Error! Marcador no definido.
3.3.	Aislamiento y purificación bacteriana:	¡Error! Marcador no definido.
3.4.	Morfología de bacterias	¡Error! Marcador no definido.
3.5.	Tinción Gram	¡Error! Marcador no definido.
3.5.1.	Microscopía.....	¡Error! Marcador no definido.
3.6.	Extracción de ADN bacteriano:	¡Error! Marcador no definido.
3.7.	Amplificación del gen 16s ARNr:.....	¡Error! Marcador no definido.
3.8.	Reacción en la cadena de polimerasa (PCR)	¡Error! Marcador no definido.
3.8.1.	Secuencia de indicadores	¡Error! Marcador no definido.
3.8.2.	Reacciones de PCR	¡Error! Marcador no definido.
3.9.	Electroforesis.....	¡Error! Marcador no definido.
3.10.	Secuenciamiento y análisis filogenético.....	¡Error! Marcador no definido.
3.11.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	¡Error! Marcador no definido.
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
4.1.	Aislamiento y purificación bacteriana	¡Error! Marcador no definido.
4.2.	Morfología de las bacterias	¡Error! Marcador no definido.
4.3.	Electroforesis.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.	Secuenciamiento y análisis filogenético.....	¡Error! Marcador no definido.

4.5.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	¡Error! Marcador no definido.
4.6.	Descripción de las funciones de las bacterias	¡Error! Marcador no definido.
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.
5.1.	Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2.	Recomendaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	¡Error! Marcador no definido.
VII.	ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
7.1.	Evidencias de lo trabajado en campo y laboratorio..	¡Error! Marcador no definido.
7.2.	Tinción Gram (Bacterias observadas en el microscopio)...	¡Error! Marcador no definido.
7.3.	Panel fotográfico de la concentración mínima inhibitoria ...	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Fechas y puntos de muestras.....	29
Tabla N° 02: Características de las colonias bacterianas.....	32
Tabla N° 03: Secuencia de indicadores.....	35
Tabla N° 04: Reacciones de PCR.....	35
Tabla N° 05: Tolerancia de bacterias en 0,5 y 2ppm de Pb.....	37
Tabla N° 06: Morfología de la bacteria.....	39
Tabla N° 07: Resultados de electroforesis en gel.....	42
Tabla N° 08: Secuenciamiento y análisis filogenético.....	43
Tabla N° 09: Recuento de bacterias en concentraciones de Pb.....	46
Tabla N° 10: Descripción de las funciones de las bacterias.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: A) toma de coordenadas y B) muestra de agua.....	28
Figura N° 02: Mapa de los puntos de muestras en la margen izquierda del río Tumbes.....	30
Figura N° 03: Método de estrías cruzadas.....	31
Figura N° 04: Formas de las bacterias.....	33

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la margen izquierda del río Tumbes con la finalidad de aislar y caracterizar molecularmente bacterias tolerantes al Plomo (Pb). Las muestras de agua fueron recolectadas en los distritos de Corrales y San Jacinto. En el aislamiento bacteriano se utilizaron concentraciones iniciales de 0,5 y 2 ppm de Pb, usando medio de cultivo agar triptona-soja (TSA) y agar centrimide (CE) obteniendo un total de 44 bacterias; sin embargo, para la caracterización molecular se seleccionaron 23 bacterias. En el proceso de secuenciamiento y análisis filogenético se hizo la extracción de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la electroforesis se visualizó el DNA de 22 bacterias y en la identificación molecular mostró 17 bacterias, de las cuales destacan *Aeromonas sp* (5), *Bacillus sp* (4), *Pseudomonas tolaasii* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Comamonas aquatica* (1), *Pseudomonas sp* (1), *Acinetobacter sp* (1), *Acinetobacter tjernbergiae* (1) y *Bacillus infantis* (1). En la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó que las bacterias tienen tolerancia al plomo (Pb), ya que el 57% toleró la concentración de 10 ppm, el 18 % 20ppm, el 6% 30ppm y el 23% logró tolerar hasta 50ppm, las bacterias que toleraron una mayor concentración son *Bacillus sp*, *Aeromonas sp* y *Aeromonas Hydrophila* al tolerar 50 ppm.

Palabras clave: Bacterias, metal pesado, concentración, tolerancia.

ABSTRACT

The present research work was carried out on the left bank of the Tumbes River with the purpose of isolating and molecularly characterizing Lead (Pb) tolerant bacteria. The water samples were collected in the districts of Corrales and San Jacinto. In bacterial isolation, initial concentrations of 0.5 and 2 ppm of Pb were used, using tryptone-soy agar (TSA) and centrimide agar (CE) culture medium, obtaining a total of 44 bacteria; However, 23 bacteria were selected for molecular characterization. In the sequencing and phylogenetic analysis process, DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were performed. In the electrophoresis, the DNA of 22 bacteria was visualized and the molecular identification showed 17 bacteria, of which *Aeromonas* sp (5), *Bacillus* sp (4), *Pseudomonas tolaasii* (1), *Aeromonas hydrophila* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Comamonas aquatica* (1), *Pseudomonas* sp (1), *Acinetobacter* sp (1), *Acinetobacter tjernbergiae* (1) and *Bacillus infantis* (1). In the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC), it was determined that the bacteria have tolerance to lead (Pb), since 57% tolerated the concentration of 10 ppm, 18% 20ppm, 6% 30ppm and 23% achieved tolerate up to 50ppm, the bacteria that tolerated a higher concentration are *Bacillus* sp, *Aeromonas* sp and *Aeromonas Hydrophila* when tolerating 50 ppm.

Keywords: Bacteria, heavy metal, concentration, tolerance.

l.