

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y
MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA DE EFLUENTES DEL
RÍO CHILLÓN DURANTE LOS MESES ENERO A JUNIO DEL 2019**

CLAUDIA PIERINA COSTA RODRIGUEZ

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA**

Director: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña
Asesora: Ing. Nadia Cristina Chulluncuy Camacho

Lima, Perú

2021

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS Y
MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA DE EFLUENTES DEL
RÍO CHILLÓN DURANTE LOS MESES ENERO A JUNIO DEL 2019**

CLAUDIA PIERINA COSTA RODRIGUEZ

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA**

**Director: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña
Asesora: Ing. Nadia Cristina Chulluncuy Camacho**

Lima, Perú

2021

Dedicatoria

A mis padres:

Dante y Rosario, por darme fuerza y enseñarme a ser perseverante para culminar esto.

Se los debo a ustedes.

Agradecimientos

A mis padres que son el motivo para seguir adelante día a día. Quienes con su apoyo incondicional y sabios consejos pude terminar mi carrera universitaria.

Al Mag. Juan Carlos Ramos Gorbeña por su asesoría, orientación, enseñanzas, paciencia y amistad durante todo este tiempo y concluir esta investigación.

A la empresa Consorcio Agua Azul S.A. que me permitieron el desarrollo de la investigación, en especial a la Ing. Nadia Chulluncuy y al Ing. Dante Chumpitaz por todo el apoyo durante la realización de la tesis. También al Sr. Marco Uríol por acompañarnos a tomar las muestras.

A Aderly por todo su cariño, motivación y siempre recordarme que debo de terminar la tesis.

A Jeffrey por siempre estar apoyarme a lo largo de la carrera con su amistad sincera y motivación siempre.

A todos que de una u otra manera me apoyaron, brindaron las facilidades y conocimientos necesarios para realizar esta investigación.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
IV. OBJETIVOS	7
4.1. Objetivo General.....	7
4.2. Objetivos Específicos	7
V. MARCO TEÓRICO.....	8
5.1. El agua superficial	8
5.2. Río Chillón	8
5.3. Calidad de agua	10
5.3.1. Contaminación del agua	¡Error! Marcador no definido.
5.4. Aguas residuales.....	10
5.4.1. Clasificación de aguas residuales:	10
5.5. Evaluación de calidad de las aguas	11
5.5.1. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas	11
5.5.1.1. Microorganismos indicadores de contaminación fecal	11
a. Coliformes totales.....	12
b. Coliformes Termotolerantes (fecales)	12
5.6. Método para la identificación y enumeración de los microorganismos indicadores	12
5.6.1. Técnica de la Fermentación en Tubos Múltiples.....	12
5.7. <i>Escherichia coli</i>	15
5.8. <i>Clostridium spp.</i>	16
5.8.1. Evaluación de la calidad física-química del agua.....	16
a. Turbiedad.....	16
b. Conductividad	16
c. Potencial de Hidrogeno (pH).....	17
d. Temperatura.....	17
e. Nitratos	17
f. Dureza total	17
g. Cloruros	17
5.9. Resistencia microbiana	18
5.9.1. Tipos de resistencia	18
5.9.2. Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos	19
5.9.3. Método de sensibilidad microbiana.....	20
5.9.3.1. Método del antibiograma disco-placa	20
5.10. Estándares de Calidad Ambiental.....	20

VI. ANTECEDENTES	25
VII. HIPÓTESIS	29
VIII. MATERIALES Y METODOS.....	30
8.1. <i>Lugar de ejecución</i>	30
8.2. <i>Tipo y diseño de la investigación</i>	30
8.3. <i>Variables</i>	30
8.4. <i>Operacionalización de las variables</i>	31
8.5. <i>Muestreo</i>	32
8.6. <i>Procedimiento y análisis de datos</i>	32
8.6.1. Obtención de Muestras	32
8.6.2. Procesamiento de las muestras.	33
8.6.3. Parámetros fisicoquímicos del agua	33
8.6.4. Método para detección de coliformes totales y termotolerantes por la técnica de la fermentación en tubos múltiples.....	37
8.6.5. Pruebas Bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>	39
8.6.6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> por difusión en agar.....	40
8.6.7. Método para detección de <i>Clostridium spp.</i> según el UNE-EN-ISO 14189:2017 modificado.....	41
8.7. <i>Aspecto ético</i>	42
IX. RESULTADOS.....	43
X. DISCUSIONES.....	56
XI. CONCLUSIONES.....	58
XII. RECOMENDACIONES.....	59
XIII. REFERENCIAS.....	60
XIV. ANEXOS.....	1

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nmp index and 95% confidence limits for various combinations of positive results when five tubes are used per dilution (10 ml, 1.0 ml, 0.1 ml).....	14
Tabla 2. Parámetros para la Categoría 3: Riego de vegetales y Bebida de animales	24
Tabla 3. Ubicaciones de las estaciones de muestreo	32
Tabla 4. Diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos y de la cepa referencial de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	40
Tabla 5. Promedio de turbiedad en cada mes de las seis estaciones.....	43
Tabla 6. Promedio de la turbiedad en cada estación durante los seis meses.	44
Tabla 7. Promedios de ph en cada mes de los seis estaciones.....	44
Tabla 8. Promedio de ph en cada estación durante los seis meses	45
Tabla 9. Promedio de temperaturas de las seis estaciones durante las seis meses	45
Tabla 10. Promedio de conductividad en cada mes de las seis estaciones	46
Tabla 11. Promedio de la conductividad de cada estación durante los seis meses.....	46
Tabla 12. Promedio de la concentración de nitratos de las seis estaciones en cada mes.....	47
Tabla 13. Promedio de la concentración de nitratos en las seis estaciones durante los seis meses.....	47
Tabla 14. Promedio de dureza total de las seis estaciones durante los seis meses	48
Tabla 15. Promedio de la concentración de cloruros en las seis estaciones durante los seis meses.....	49
Tabla 16. Promedio de NMP de los coliformes totales de los seis efluentes.	50
Tabla 17. Promedio de NMP de los coliformes termotolerantes de los seis efluentes.	50
Tabla 18. Patrones de resistencia de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de los seis efluentes.....	52
Tabla 19. Susceptibilidad microbiana antimicrobiana in vitro de las 28 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de los seis efluentes.	53
Tabla 20. Estadístico asociado a los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> efectuados por su susceptibilidad a 7 antibióticos.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la cuenca del Río Chillón	9
Figura 2. Prueba confirmativa.	38
Figura 3. Identificación presuntiva de <i>Escherichia coli</i> en medio EMB	39
Figura 4. Formación de los halos de inhibición para cada antibiótico.	41
Figura 5. Detección de colonias de <i>Clostridium</i> spp (negras) en el agar TSC	42
Figura 6. Pruebas bioquímicas positivas para <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 7. Identificación presuntiva de <i>Clostridium</i> spp. mostrando la doble hemólisis presente en el medio Agar sangre.....	54
Figura 8. Tinción Gram a partir del medio de agar sangre, donde se observa los bacilos Gram negativos de <i>Clostridium</i> spp. y algunas esporas presentes.....	55

ANEXOS

Anexo 1. Lista de abreviaturas.....	1
Anexo 2. Glosario de términos.....	2
Anexo 3. Mapa de la ubicación de las estaciones de muestreo cercanos al Río Chillón	7
Anexo 4. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias y diámetros del halo de inhibición para la cepa E. coli ATCC 25922 empleados como control de calidad.	8
Anexo 5. NMP de los coliformes totales obtenidos de las seis estaciones de muestreo durante los meses de enero y junio de 2019	10
Anexo 6. NMP de coliformes termotolerantes obtenidos de las seis estaciones de muestreo durante los meses de enero a junio de 2019.....	11

RESUMEN

El agua es un recurso natural imprescindible que se utiliza en casi todas las actividades que el hombre realiza. La contaminación de los ríos debido al vertimiento de las aguas residuales de origen doméstico es uno de los impactos más graves de carácter ecológico, social y económico. Esta situación se encuentra estrechamente relacionada con las bajas coberturas en el alcantarillado y el inadecuado tratamiento y disposición final de estas aguas. Por lo cual el objetivo del presente estudio es la evaluación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la calidad de agua de seis efluentes cercanos al margen del Río Chillón durante los meses de enero a junio de 2019. Para ello, se analizó un total 12 muestras por mes para realizar análisis fisicoquímicos tales como turbiedad, pH, temperatura, conductividad, dureza total, cloruros y nitratos, mientras para los análisis microbiológicos fueron coliformes totales, coliformes termotolerantes por la técnica de los números más probables, identificar la presencia de *Escherichia coli* y su resistencia antimicrobiana mediante la prueba de susceptibilidad por difusión en agar e identificar la presencia de *Clostridium spp.* mediante el método de presencia/ausencia. Los resultados fueron contrastados con los Estándares de Calidad Ambiental para aguas del Perú, y a partir de estos se demostró que en el mes de febrero y las estaciones 4, 5 y 6 eran los que tenían mayor concentración de sales, mientras que para los parámetros microbiológicos todos los puntos se encontraron contaminados por coliformes totales, termotolerantes, *Escherichia coli* y *Clostridium spp.* Además, las cepas aisladas de *E. coli* el 5% era resistente al menos de los 7 antibióticos, presentando mayor susceptibilidad antimicrobiana a los antibióticos ciprofloxacino, ceftadizima y ampicilina.

Palabras clave: efluentes, fisicoquímico, microbiológico, *Escherichia coli*, *Clostridium spp*

ABSTRACT

Water is an essential natural resource that is used in almost all the activities that man does. The contamination of rivers due to the discharge of domestic wastewater is one of the most serious ecological, social and economic impacts. This situation is closely related to the low coverage in the sewage system and the inadequate treatment and final disposal of these waters. Therefore, the objective of this study is the evaluation of the physicochemical and microbiological parameters of the water quality of six effluents near the Chillón River margin during the months of January to June 2019. For this, a total of 12 samples were analyzed per month to perform physicochemical analyzes such as turbidity, pH, temperature, conductivity, total hardness, chlorides and nitrates, while for the microbiological analyzes were total coliforms, thermotolerant coliforms by the technique of the most probable numbers, identify the presence of *Escherichia coli* and its antimicrobial resistance by means of the susceptibility test by diffusion in agar and to identify the presence of *Clostridium spp.* using the presence / absence method. The results were contrasted with the Environmental Quality Standards for Peruvian waters, and from these it was shown that in the month of February and stations 4, 5 and 6 were those with the highest concentration of salts, while for the microbiological parameters all the points were found to be contaminated by total coliforms, thermotolerant, *Escherichia coli* and *Clostridium spp.* In addition, the 5% *E.coli* isolates were resistant to at least the 7 antibiotics, presenting greater antimicrobial susceptibility to the antibiotics ciprofloxacin, ceftadizine and ampicillin.

Key words: effluents, physicochemical, microbiological, *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural imprescindible para la sociedad siendo utilizada en casi todas las actividades que el hombre realiza. No obstante, en la actualidad existen severos problemas de escasez y contaminación del agua (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007, citado en Hernández, *et al.*, 2012, p. 90).

El vertimiento de aguas residuales de origen doméstico es uno de los impactos más importantes que se le atribuye al crecimiento urbano, y son los ecosistemas acuáticos los más afectados. La contaminación de los ríos se debe a la incorporación de microorganismos, productos químicos y residuos industriales generando graves problemas de carácter ecológico, social y económico, los cuales van deteriorando la calidad del agua y disminuyendo su disponibilidad (Chávez *et al.*, 2016, p. 19).

Desde el punto de vista de la salud pública, las aguas residuales son responsables del 80% de las muertes en los países en vías de desarrollo. Esta situación se encuentra estrechamente relacionada con las bajas coberturas en el alcantarillado, el inadecuado tratamiento y la disposición final de las aguas en estos países. Se estima que 1,1 millones de personas en todo el mundo, especialmente en las zonas rurales y comunidades de bajos ingresos no tienen acceso al agua potable (Chávez *et al.*, 2016, p. 17).

El río Chillón es una de las tres cuencas más importantes de la ciudad de Lima, donde el uso de sus aguas son para consumo humano, agricultura e industrial, que a la vez sirve como cuerpo receptor y medio de transporte de desechos domésticos, industriales y humanos, en su trayectoria se han asentado botaderos de residuos domésticos y curtiembres, actividad minera formal e informal, plantas de fundición informales, plantas papeleras y textil que descargan sus efluentes, asimismo, la agricultura (plaguicidas y fertilizantes) y la crianza informal de cerdos generan una contaminación al agua (Reyes, 2005, p. 22).

La calidad microbiológica del agua se analiza utilizando las bacterias indicadoras de contaminación fecal entre las más utilizadas se encuentran las coliformes totales, coliformes fecales o termotolerantes, mientras la abundancia de *Escherichia coli*, virus, enterococos fecales, parásitos, etc., también demuestran contaminación (Larrea, *et al.*, 2013, p. 25). Una vez que se ha demostrado la presencia de estos grupos indicadores, se puede decir que los microorganismos patógenos están presentes y cual es su comportamiento frente a diferentes factores físicos como pH, temperatura, presencia de nutrientes y tiempo de retención hídrica (Gesche, *et al.*, 2003, p. 101).

El objetivo del presente estudio es evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la calidad de agua de seis efluentes cercanos al margen del Río Chillón durante los meses de enero a junio de 2019.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación de los ríos es la problemática más antigua de contaminación ambiental debido a la falta de plantas de tratamiento para las aguas residuales que descargan sus residuos en los ríos, mares, lagos, etc.

La cuenca del río Chillón a través de los años ha sido deteriorada debido al poblador ribereño que cada vez se viene adaptando de lo agro a lo urbano más la ausencia de planificación urbana haciendo que se degeneren los ecosistemas de su entorno (Reyes, 2012, p. 25). Los asentamiento humanos y pequeños poblados que se encuentran cerca al margen del río carecen de redes de desagüe y agua potable por lo que existen botaderos de residuos domésticos, industriales y agrícolas que generan una contaminación microbiológica alta para los efluentes que pasan por las chacras. Estas son regadas con aguas residuales, que se unen y desembocan en el Río Chillón, donde aguas abajo la gente usa el río para recreación y como consumo humano para preparación de alimentos, lavado de ropa, etc.

Por esta razón las zonas afectadas presentan malos olores debido a los compuestos orgánicos en descomposición convirtiéndose en aguas ácidas, siendo una reacción toxica para la flora y fauna de la zona y sobre los pobladores que utilizan estas aguas y presentando un potencial de infección de enfermedades mediante el riego de plantas alimenticias influyendo en una epidemia.

Por lo tanto, esta contaminación trae consigo bacterias que actúan sobre la materia orgánica afectando a los pobladores, animales y vegetales que tienen contacto o consumo de ella. Las bacterias que se pueden encontrar en el agua residual son *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrío cholerae*, *Shigella spp.*, que son los principales patógenos causantes de diarreas crónicas, cólera, hepatitis, disentería, poliomeilitis, fiebre tifoidea, entre otras; también virus y protozoos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp.*

III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las aguas residuales son el único recurso hídrico de las comunidades pobres que subsisten por medio de la agricultura. Si bien el uso de aguas residuales en la agricultura puede aportar beneficios (incluidos los beneficios de salud como una mejor nutrición y provisión de alimentos para muchas viviendas), su uso no controlado generalmente está relacionado con impactos significativos sobre la salud humana.

Por lo que, el objetivo del estudio del agua no potable suele consistir en calcular la densidad de contaminación bacteriana, determinar la fuente de la misma, reforzar los estándares de calidad del agua o monitorear la supervivencia de los microorganismos.

Además, existe poca iniciativa de las autoridades por mejorar la calidad ambiental, y la necesidad principal del saneamiento básico de agua y desagüe, siendo escaso el acceso a los servicios de limpieza y recojo de residuos sólidos, produciéndose una gran informalidad y un total desconocimiento e incumplimiento de las normas ambientales, lo cual conduce a tener las riberas del río deterioradas (Reyes, 2012, p. 25). Asimismo, se evidencia la pérdida de la biodiversidad en el ecosistema acuático, llegando a afectar la actividad humana.

Los contaminantes no sólo ingresan al organismo a través de una ingesta directa de agua en mal estado, sino también pueden incorporarse a través del consumo de peces que habitan en aguas contaminadas produciendo así trastornos gastrointestinales a las personas y/o animales.

Por otra parte, es importante mencionar que los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para el agua que según las Normas Legales para el Artículo 3, Subcategoría D1 y Subcategoría D2 donde nos describen el uso del agua para el riego de vegetales y bebida de animales y los límites máximos permisibles de cada parámetro físicoquímicos, microbiológicos y parasitológicos para no afectar al consumidor final.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la calidad de agua de seis efluentes cercanos al margen del Río Chillón durante los meses de enero a junio de 2019.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar los parámetros fisicoquímicos de seis efluentes cercanos al margen del río Chillón durante los meses de enero a junio de 2019.
2. Enumerar mediante la técnica de los tubos múltiples de fermentación la presencia de coliformes totales, coliformes termotolerantes
3. Identificar la presencia de *Escherichia coli* en las muestras de agua de los seis efluentes cercanos al margen del río Chillón
4. Determinar la resistencia de *Escherichia coli* aislado de las muestras de agua de los efluentes cercanos al margen del río Chillón mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.
5. Identificar la presencia de *Clostridium spp.* en las muestras de agua de los seis efluentes según el método de detección de la norma UNE-EN-ISO 14189:2017 modificado.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. El agua superficial

El agua superficial se describe como cualquier tipo de agua que se encuentra discurriendo o estancada en la superficie tales como arroyos, ríos, estanques y embalses:

- **Escorrentías superficiales:** es el agua de la lluvia que ha caído sobre el terreno y fluye directamente sobre la superficie hacia la masa de agua ya sea río, mar o lago.
- **Precipitación directa:** es el agua de la lluvia que cae directamente en la masa de agua.
- **Manto intermedio:** es el exceso de humedad en el suelo que está continuamente drenando en la masa de agua.
- **Descarga en la capa freática:** es donde hay un acuífero debajo de una masa de agua y la capa freática es lo suficientemente alta para que el agua descargue directamente desde el acuífero a la masa de agua.

Las aguas superficiales están expuestas a varios factores que pueden alterar su calidad en diferentes niveles de intensidad y de maneras simples o complejas. La ocurrencia de eventos naturales y la influencia de actividades realizadas por el hombre (domésticos, industrial, minero, social) pueden afectar el ambiente acuático; en especial, los cuerpos de aguas superficiales (Cabrera 2006, p. 17).

5.2. Río Chillón

El río Chillón tiene su origen en la laguna de Chonta en alturas de la Cordillera de La Viuda, a 4 850 m.s.n.m. con un recorrido de 126 km, ubicándose en el centro del departamento de Lima.

Limita por el norte con la cuenca del río Chancay, por el sur con la del río Rímac, por el este con la del río Mantaro y por el oeste con el océano Pacífico, en otros términos, recorre la provincia de Canta y de los distritos de Carabaylo, Puente Piedra, Ventanilla, parte de Comas, Los Olivos y San Martín de Porras.

El río presenta descargas irregulares en extremo y torrencioso. Éstas son parcialmente reguladas por un grupo de lagunas de las partes altas, que sirven para complementar las necesidades de riego de los agricultores en el período de estiaje siendo en los meses de mayo a diciembre (Municipalidad Metropolitana de Lima, 2013, p. 2).

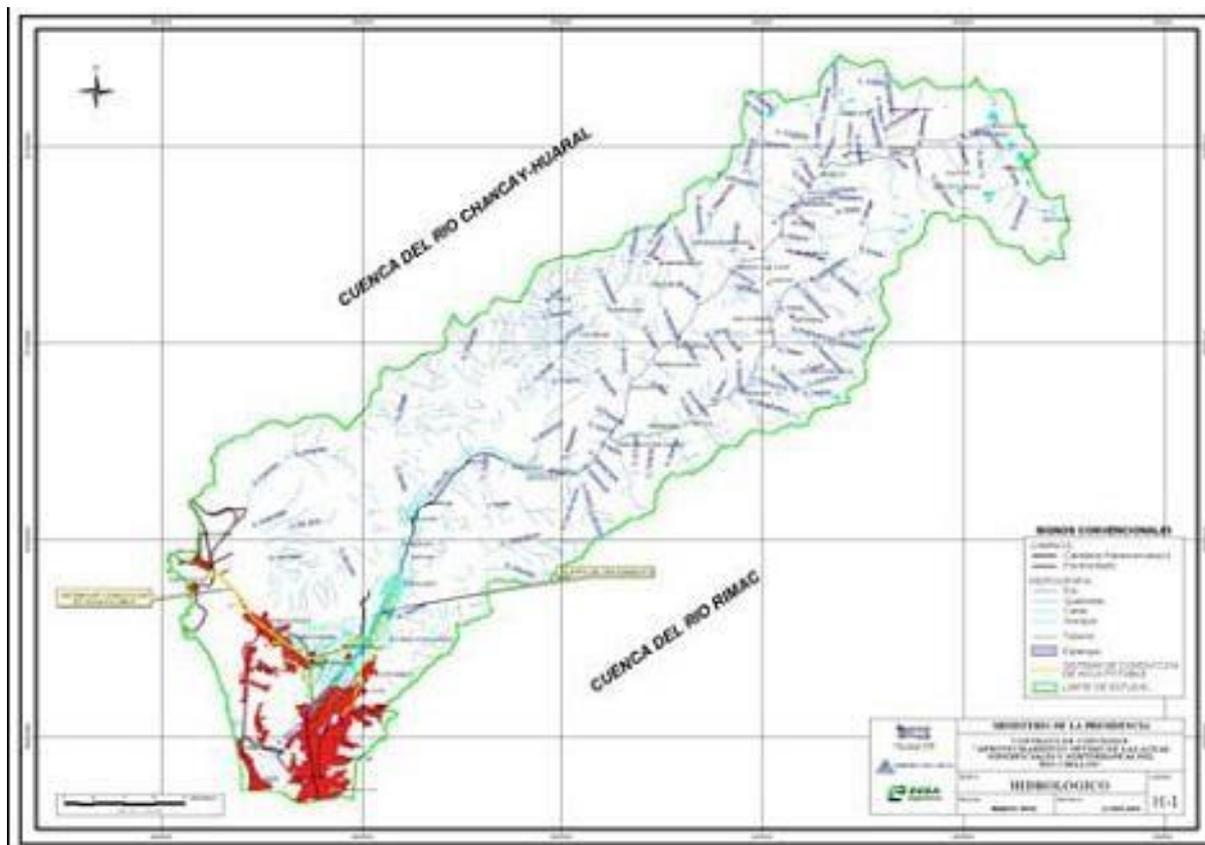


Figura 1. Mapa de la cuenca del Río Chillón
 Fuente: Municipalidad Metropolitana de Lima.

5.3. Calidad de agua

La calidad biológica del agua es un modo de definir la riqueza biológica y el valor ambiental de las comunidades de seres vivos asociados al ecosistema.

Todos los seres vivos necesitan agua de buena calidad para la supervivencia. Entre los contaminantes naturales se encuentran virus, bacterias y otras formas de vida; minerales disueltos y sólidos orgánicos e inorgánicos suspendidos. La concentración de estos contaminantes naturales puede incrementarse a consecuencia de la tecnología industrial o agrícola (Larrea *et al.*, 2013, p. 25).

5.4. Aguas residuales

Las aguas residuales pueden definirse como las aguas que provienen de las diversas actividades humanas y que poseen residuos que no son propios de un agua en condiciones normales, denominados contaminantes, que provocan el deterioro de los cuerpos de agua y la recontaminación de aquellos que puedan llegar a ser vertidas sin un tratamiento previo (Benítez, 2013, p. 2).

Por lo que el crecimiento poblacional, plantea una necesidad de buscar mecanismos para eliminar los contaminantes del agua de origen doméstico, agrícola e industrial.

Y es que la expansión sumada al desarrollo urbano conlleva al aumento del consumo hídrico, lo que provoca un incremento de aguas residuales. Así, entre el 70% al 80% de aguas domiciliarias se convierten en residuales, las cuales se vierten en los sistemas de alcantarillado, o en sitios de drenaje. De igual manera, el agua que emplean las industrias en los diferentes procesos, también son vertidas en dichos canales de desfogue, que finalmente desembocan en ríos, lagos y/o mares (Rivera, 2018, p. 18).

5.4.1. Clasificación de aguas residuales:

- a) **Agua residual doméstica:** son el producto de la utilización del líquido en las diferentes actividades de un hogar, zonas residenciales, establecimientos comerciales o institucionales, se subdividen en:
 - **Aguas negras:** transportan heces, orina y desechos orgánicos provenientes del inodoro.
 - **Aguas grises:** aguas jabonosas que pueden contener grasas, provenientes de la ducha, tina, lavamanos, lavaplatos, lavadero y lavadora. Esta puede ser usada en el riego de plantas y reciclada en el uso de inodoros, donde se transforma en agua negra (Rivera, 2018, p. 18)

- b) **Agua residual municipal o urbana:** son aquellas que salen de las urbes, que fueron empleadas en usos domésticos (inodoros, fregaderos, lavadoras, lavabos, baños). Además,

pueden contener residuos provenientes de los arrastres que las aguas de lluvias y actividades industriales urbanas (Rivera, 2018, p. 19).

- c) **Agua residual industrial:** provenientes de procesos productivos industriales, pueden contener diversos contaminantes tóxicos dependiendo de la industria (Rivera, 2018, p. 19).

La composición de las aguas residuales es muy variada y va a depender del uso que se dé en la población y de las influencias de origen industrial. Por lo tanto, su composición depende de los elementos químicos, biológicos y físico que contenga; por lo general la mayor parte de residuos son materia orgánica e inorgánica, nutrientes, microorganismo, metales, plaguicidas, etc (Rivera, 2018, p.19).

5.5. Evaluación de calidad de las aguas

Los programas de monitoreo de calidad de agua verifican si la calidad de este recurso cumple con los parámetros requeridos para su uso. Las variables a monitorear varían de acuerdo al uso del agua (Romeu, 2012, p. 12).

- **Parámetros organolépticos:** Color, turbidez, sabor.
- **Parámetros físicos:** Sólidos totales, sólidos suspendidos sedimentables y no sedimentables, sólidos filtrables coloidales o disueltos, temperatura, conductividad y radioactividad.
- **Parámetros químicos:** Salinidad, dureza, pH, alcalinidad, acidez, oxígeno disuelto, materia orgánica, demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno, carbono orgánico total, bionutrientes (N, P) y otros compuestos como metales pesados, aniones, cationes, sustancias indeseables y sustancias tóxicas.
- **Parámetros microbiológicos:** Bacterias coliformes totales y termotolerantes, enterococos fecales, bacterias heterótrofas mesófilas y ensayos específicos para detectar a *Salmonella*, *Legionella*, *Vibrío*, hongos dermatofitos y microalgas epibióticas tóxicas.

5.5.1. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas

5.5.1.1. Microorganismos indicadores de contaminación fecal

Son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración en las aguas y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Cuando se evidencia la presencia de estos grupos indicadores, se puede inferir qué microorganismos patógenos se encuentran y cuál es su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes y tiempo de retención hídrica (Larrea *et al.*, 2013, p. 25).

a. Coliformes totales

Los coliformes totales son las Enterobacteriaceae lactosa positivas con formación de gas cuando son incubadas durante 48 horas a 30 – 37°C, incluyendo las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas, de morfología bacilar, son oxidasa negativa y tienen actividad enzimática β -galactosidasa.

La prueba más relevante utilizada para la determinación de coliformes, es hidrólisis de la lactosa que es catalizado por la enzima β -D-galactosidasa. Entre ellas se encuentran *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Larrea, 2013, p. 26)

b. Coliformes Termotolerantes (fecales)

Estas bacterias se definen como el grupo de organismos Coliformes que pueden fermentar la lactosa entre 44 y 45 °C, con capacidad de crecer en presencia de sales biliares, comprende especies del género *Escherichia* y en menor grado, especies de los géneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Los Coliformes fecales son microorganismos con una estructura parecida a la de una bacteria común como *Escherichia coli* y se transmiten por medio de los excrementos.

Algunos investigadores han sugerido el uso exclusivo de *E. coli* como un indicador de contaminación fecal, ya que puede ser fácilmente distinguido de otros miembros del grupo de coliformes fecales por indicadores enzimáticos como la ausencia de ureasa o la presencia de β -glucoronidasa (Benítez, 2013, p. 6).

5.6.Método para la identificación y enumeración de los microorganismos indicadores

5.6.1. Técnica de la Fermentación en Tubos Múltiples

La técnica de fermentación se puede utilizar para detectar coliformes en agua potable o cuantificar coliformes en agua potable y no potable. Cuando se usan múltiples tubos, la densidad de coliformes se estima a través de una tabla de número más probable (NMP) (tabla 1). Las tablas NMP se basan en el supuesto de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Este número es generado usando fórmulas de probabilidades específicas en una estimación de densidad media de coliformes en la muestra. Los

resultados proporcionan la mejor evaluación de la efectividad del tratamiento del agua y la calidad sanitaria de la fuente de agua.

La precisión de la prueba de fermentación para estimar la densidad de coliformes depende del número de tubos utilizados. La información más satisfactoria se obtendrá cuando el inóculo de muestra más grande examinado muestre ácido y/o gas en algunos o todos los tubos y el inóculo de muestra más pequeño no muestre ácido o gas en ninguno o la mayoría de los tubos.

En general, el objetivo de analizar el agua no potable es estimar la densidad bacteriana, determinar una fuente de contaminación, hacer cumplir los estándares de calidad del agua o rastrear la supervivencia de los microorganismos (Standard Method, 2014, p. 69).

Tabla 1. NMP index and 95% confidence limits for various combinations of positive results when five tubes are used per dilution (10 ml, 1.0 ml, 0.1 ml)

Combination of positives			NMP Index/100 ml	Confidence Limits		Combination of positives			NMP Index/100 ml	Confidence Limits	
				Low	High					Low	High
0	0	0	<1.8	---	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	1.0	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	11	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	>1600	700	---
4	0	2	21	6.8	40						

Fuente: Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 23rd Edition

5.7. *Escherichia coli*

Esta bacteria se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, enzimas β -galactosidasa y β -glucoronidasa. Fermenta la lactosa y el manitol liberando ácido y gas, produce indol a partir del triptófano, no utilizan el citrato como fuente de carbono y no producen de acetoina. *Escherichia coli* no produce oxidasa ni hidroliza la urea.

Esta bacteria puede llegar a medir entre 1 a 3 micras y posee capacidad de movimiento a través de flagelos peritricos o no móviles.

De acuerdo con **Scheutz 2005**, desde el punto de vista taxonómico la clasificación de *Escherichia coli* es la siguiente:

Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>Escherichia coli</i>

Por otro lado, el pH y la actividad del agua pueden influir su proliferación teniendo sus condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7.2 y 0.99 respectivamente. El desarrollo de *Escherichia coli* se detiene en pH inferior a 3.8 y superiores a 9.5; y a valores de actividad de agua inferiores a 0.94 (Benvenuto, 2017, p. 18).

- ***Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal**

Escherichia coli se considera microorganismo indicador de contaminación fecal por excelencia (Romeu, 2012, p. 18), ya que dentro de su especie se han descrito grupos patógenos capaces de causar enfermedades intestinales y extra intestinales en el ser humano y los animales (Romeu, 2012, p. 18)

5.8. *Clostridium spp.*

Es un bacilo anaerobio Gram positivo no móvil, esporulado, puede fermentar azúcares hasta butirato y acetato, son capaces de fermentar proteínas o aminoácidos obteniéndose como producto de fermentación acetato, otros ácidos grasos, NH₃, CO₂ y a veces H₂; pueden producir exotoxinas (Cabrera, 2006, p. 24).

Los *Clostridium* sulfito reductores tienen una mayor resistencia a las condiciones ambientales y a la desinfección por lo que se utilizaba como indicadores de contaminación fecal. El número de *Clostridium spp.* en agua es mucho menor que el de Coliformes y *Streptococcus*, no obstante, en aguas carentes de coliformes y *Streptococcus* informan sobre la posibilidad de contaminaciones no recientes. *Clostridium spp.* es de origen fecal y no es patógeno en el intestino de los animales homeotérmicos. No es exclusivamente fecal encontrándose en suelos, aguas contaminadas y cárnicos en mal estado. Por ser una bacteria esporulada tolera elevadas temperaturas y desecación, pH extremos, falta de nutrientes, entre otras condiciones adversas (Arcos *et al.*, 2005, p. 74).

En la tinción Gram aparece como un bacilo grande, relativamente corto y grueso, con la forma de ladrillo o furgón de carga. Generalmente no se observan esporas y cuando se ven son redondas y subterminales. Es uno de los anaerobios más fáciles de recuperar en cultivo porque puede formar colonias en 18 – 24 horas en agar sangre produciendo la presencia de una zona de hemólisis (Miranda y Rojo, SEIMC).

5.8.1. Evaluación de la calidad física-química del agua

a. Turbiedad

Es la falta de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión. Cuantos más sólidos en suspensión haya en el líquido, más sucia parecerá ésta y más alta será la turbidez. La turbidez es considerada una buena medida de la calidad del agua, cuanto más turbia, menor será su calidad (Fajardo, 2018, p. 27).

b. Conductividad

La conductividad eléctrica es el recíproco de la resistencia en ohms, medida entre las caras opuestas de un cubo de 1.0 cm de una solución acuosa a una temperatura específica. Esta solución se comporta como un conductor eléctrico donde se pueden aplicar las leyes físicas de resistencia eléctrica (Fajardo, 2018, p. 24).

c. Potencial de Hidrogeno (pH)

Se define como el grado de acidez o alcalinidad que depende de la concentración de iones de hidrogeno presentes (Fajardo, 2018, p. 27). Una lectura de H progresivamente menor de 7.0 incrementa la acidez, o inversamente una progresiva elevación de 7 indica el aumento de alcalinidad (Reyes, 2012, p. 168).

d. Temperatura

La temperatura va a influenciar en la biodegradabilidad de la materia orgánica, ya que contribuye con los procesos cinéticos químicos y biológicos. Temperaturas muy altas contribuyen a la disminución de oxígeno disuelto en el agua, disminuyendo a su vez la tasa de crecimiento bacteriano y el crecimiento de otras especies como protozoarios, crustáceos, peces, etc. (Lazcano C., 2014).

e. Nitratos

Los nitratos son compuestos presentes en la naturaleza que forman parte del ciclo del nitrógeno, es la forma oxidada estable de ese ciclo. La concentración de nitrato en aguas subterráneas y superficiales suele ser baja, pero puede llegar a ser alta por filtración o escorrentía de tierras agrícolas o debido a la contaminación por residuos humanos o animales como consecuencia de la oxidación del amoníaco y fuentes similares.

f. Dureza total

Es una característica química del agua que está determinada por el contenido de carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos y ocasionalmente nitratos de calcio y magnesio (Mejía M., 2005, p. 65). Suele expresarse como cantidad equivalente de carbonato cálcico. En función del pH y de la alcalinidad, una dureza del agua por encima de 200 mg/L aproximadamente puede provocar la formación de incrustaciones, sobre todo en las calefacciones. Las aguas blandas con una dureza menor que 100 mg/L aproximadamente tienen una capacidad de amortiguación baja y pueden ser más corrosivas para las tuberías.

g. Cloruros

El cloruro, en forma de ión (Cl⁻), es uno de los aniones inorgánicos principales en el agua natural y residual. La concentración de cloruro es mayor en las aguas residuales que en las naturales, debido a que el cloruro de sodio es común en la dieta y pasa inalterado a través del aparato digestivo. También puede aumentar debido a los procesos industriales.

Un contenido elevado de cloruro puede dañar las conducciones y estructuras metálicas y perjudicar el crecimiento vegetal. Otra fuente de cloruros es la descarga de aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales a aguas superficiales (Reyes C, 2012, p. 166).

5.9. Resistencia microbiana

La resistencia a los antimicrobianos (farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones causadas por ellos dejen de ser eficaces (Organización Mundial de la Salud, 2017).

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano constituyendo un problema creciente de la salud pública en todo el mundo. La resistencia puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población (Calderón y Aguilar, 2016, p. 757).

Se debe diferenciar los conceptos de resistencia antimicrobiana y multiresistencia antimicrobiana, lo que el primer término se refiere a la capacidad que tiene una bacteria de sobrevivir ante la exposición de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de cualquier tipo de antibiótico, que inhibe o mata a otras de la misma especie, mientras el segundo término habla sobre la resistencia que presenta un microorganismo ante la exposición de dosis terapéuticas adecuadas de tres o más antibióticos los cuales pertenecen a diferentes grupos antibacterianos (Calderón y Aguilar, 2016, p. 758).

5.9.1. Tipos de resistencia

- a. **Natural o intrínseca.** Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos. En este caso, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Fernández *et al.*, 2003, p. 45).
- b. **Adquirida.** Las bacterias adquieren resistencia a los agentes antimicrobianos por eventos genéticos como mutación, conjugación, transformación, transducción y transposición (McCarter Y, 2005, p. 9).
 - **Mutación:** La resistencia cromosómica se desarrolla como resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un determinado agente antimicrobiano. La mutación espontánea ocurre con una frecuencia relativamente baja, pero cuando las bacterias son expuestas a los agentes antimicrobianos, solo las células mutantes sobreviven. Entonces estas se multiplican y resultan en la aparición de una población resistente (McCarter Y, 2005, p. 10).

- **Conjugación:** Las bacterias con frecuencia contienen elementos genéticos extra cromosómicos llamados plásmidos, muchos de los cuales llevan genes de resistencia antimicrobiana. Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, una estructura similar a un puente conocida como pilus se puede formar entre ellas. Esto permite que una copia del plásmido se replique y transfiera de una célula a la otra (McCarter Y, 2005, p. 10).

- **Transformación:** Las bacterias podrían encontrar fragmentos desnudos de ADN que transportan genes de resistencia antimicrobiana. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula huésped por recombinación y la célula resultante es resistente (McCarter Y, 2005, p. 10).

- **Transducción:** Cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) se están multiplicando en el citoplasma de una bacteria, fragmentos de ADN de plásmidos o cromosomas podrían por casualidad empacarse en una cápsula viral y entrar en otra célula huésped. Cuando los fragmentos contienen genes de resistencia a un agente antimicrobiano estos pueden traspasar la resistencia a la nueva célula huésped (McCarter Y, 2005, p. 10).

- **Transposición:** Los transposones son secuencias genéticas especializadas “móviles” que tienen la capacidad de moverse de un área del cromosoma bacteriano a otra o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos. Los transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmidos y de esa manera transportar genes de resistencia antimicrobiana (McCarter Y, 2005, p. 10)

5.9.2. Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos

La especie *Escherichia coli* presenta resistencia a los antibióticos betalactámicos. Con el tiempo, la utilización masiva de antibióticos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial. En los últimos años, se ha observado un aumento en su resistencia para los principales antibióticos de uso clínico para el tratamiento de infecciones causadas por sus cepas patógenas como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomycin, tanto en cepas de origen humano y animal como aisladas del ambiente (agua y suelo) (Benvenuto V., 2017).

5.9.3. Método de sensibilidad microbiana

5.9.3.1. Método del antibiograma disco-placa

Fundamento:

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda 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 inoculada 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 18 – 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibióticos en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o “recta de concordancia” que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS (Picazo *et al*, 2000) (ver anexo 4).

5.10. Estándares de Calidad Ambiental

Es la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni para el ambiente (DS N° 004-2017-MINAM).

Para la aplicación de los ECA´s para agua se debe considerar las siguientes precisiones sobre tus categorías:

Categoría 1: Poblacional y recreacional

a) Subcategoría A: Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable

Se entiende como aquellas aguas que, previo tratamiento, son destinadas para el abastecimiento de agua para consumo humano.

○ A1. Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección

Se entiende como aquellas aguas que, por sus características de calidad, reúnen las condiciones para ser destinadas al abastecimiento de agua para consumo humano con simple desinfección, de conformidad con la normativa vigente.

○ A2. Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional

Se entiende como aquellas aguas destinadas al abastecimiento de agua para consumo humano, sometidas a un tratamiento convencional, mediante dos o más de los siguientes procesos: Coagulación, floculación, decantación, sedimentación, y/o filtración o procesos equivalentes; incluyendo su desinfección, de conformidad con la normativa vigente.

○ A3. Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado

Se entiende como aquellas aguas destinadas al abastecimiento de agua para consumo humano, sometidas a un tratamiento convencional que incluye procesos físicos y químicos avanzados como precloración, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, carbón activado, osmosis inversa o procesos equivalentes establecidos por el sector competente.

b) Subcategoría B: Aguas superficiales destinadas para recreación

Se entiende como aquellas aguas destinadas al uso recreativo que se ubican en zonas marinos costeras o continentales. La amplitud de las zonas marino costeras es variable y comprende la franja del mar entre el límite de la tierra hasta los 500 m de la línea paralela de baja marea. La amplitud de las zonas continentales es definida por la autoridad competente:

○ B1. Contacto primario

Se entiende como aquellas aguas destinadas al uso recreativo de contacto primario por la Autoridad de Salud, para el desarrollo de actividades como la natación, el esquí acuático, el buceo libre, el surf, el canotaje, la navegación en tabla a vela, la moto acuática, la pesca submarina o similares.

- **B2. Contacto secundario**

Se entiende como aquellas aguas destinadas al uso recreativo de contacto secundario por la Autoridad de Salud, para el desarrollo de deportes acuáticos con botes, lanchas o similares.

Categoría 2: Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales

a) Subcategoría C1. Extracción y cultivo de moluscos, equinodermos y tunicados en aguas marino costeras

Se entiende como aquellas aguas cuyo uso está destinado a la extracción o cultivo de moluscos (Ej.: ostras, almejas, choros, navajas, machas, conchas de abanico, palabritas, mejillones, caracol, lapa, entre otros), equinodermos (Ej.: erizos y estrella de mar) y tunicados.

b) Subcategoría C2: Extracción y cultivo de otras especies hidrobiológicas en aguas marino costeras

Se entiende como aquellas aguas destinadas a la extracción o cultivo de otras especies hidrobiológicas para el consumo directo e indirecto. Esta subcategoría comprende a los peces y las algas comestibles.

c) Subcategoría C3: Actividades marino portuarias, industriales o de saneamiento en aguas marino costeras

Se entiende como aquellas aguas aledañas a las infraestructuras marinas portuarias, actividades industriales o servicios de saneamiento como los emisarios submarinos.

d) Subcategoría C4: Extracción y cultivo de especies hidrobiológicas en lagos o lagunas

Se entiende como aquellas aguas cuyos usos está destinado a la extracción o cultivo de especies hidrobiológicas para consumo humano.

Categoría 3: Riego de vegetales y bebida de animales

a) Subcategoría D1: Riego de vegetales

Se entiende como aquellas aguas utilizadas para el riego de los cultivos vegetales, las cuales, dependiendo de factores como el tipo de riego empleado en los cultivos, la clase de consumo utilizado (crudo o cocido) y los posibles procesos industriales o de transformación a los que puedan ser sometidos los productos agrícolas:

- **Agua para riego no restringido**

Se entiende como aquellas aguas cuya calidad permite su utilización en el riego de: cultivos alimenticios que se consumen crudos (Ej.: hortalizas, plantas frutales de tallo bajo o similares); cultivos de árboles o arbustos frutales con sistema de riego por aspersión, donde el fruto o partes comestibles entran en contacto directo con el agua de riego, aun cuando estos sean de tallo alto; parques públicos, campos deportivos, áreas verdes y plantas ornamentales; o cualquier otro tipo de cultivo.

- **Agua para riego restringido**

Se entiende como aquellas aguas cuya calidad permite su utilización en el riego de: cultivos alimenticios que se consumen cocidos (Ej.: habas); cultivos de tallo alto en los que el agua de riego no entra en contacto con el fruto (Ej.: árboles frutales); cultivos a ser procesados, envasados y/o industrializados (Ej.: trigo, arroz, avena y quinua); cultivos industriales no comestibles (Ej.: algodón), y; cultivos forestales, forrajes, pastos o similares (Ej.: maíz forrajero y alfalfa).

b) Subcategoría D2: Bebida de animales

Se entiende como aquellas aguas utilizadas para bebida de animales mayores como ganado vacuno, equino o camélido, y para animales menores como ganado porcino, ovino, cuyes, aves y conejo.

Tabla 2. Parámetros para la Categoría 3: Riego de vegetales y Bebida de animales

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido	Agua para riego restringido	Bebida de animales
FÍSICO-QUÍMICOS				
Aceites y grasas	mg/L	5		10
Bicarbonatos	mg/L	518		**
Cianuro Wad	mg/L	0,1		0,1
Cloruros	mg/L	500		**
Color	Color verdadero Escala Pt/Co	100		100
Conductividad	(μ S/cm)	2500		5000
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	mg/L	15		15
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	40		40
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,2		0,5
Fenoles	mg/L	0,002		0,01
Fluoruros	mg/L	1		**
Nitratos (NO ₃ ⁻ -N) + Nitritos (NO ₂ ⁻ -N)	mg/L	100		100
Nitritos (NO ₂ ⁻ -N)	mg/L	10		10
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 4		≥ 5
Potencial de Hidrogeno (pH)	Unidad de pH	6,5 - 8,5		6,5 - 8,4
Sulfatos	mg/L	1000		1000
Temperatura	°C	Δ 3		Δ 3
MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICO				
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 ml	1000	2000	1000
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	1000	**	**
Huevos de Helminos	Huevos/L	1	1	**

Fuente: DECRETO SUPREMO N° 004-2017-MINAM

Nota:

- El símbolo ** dentro de la tabla significa que el parámetro no aplica para esta Subcategoría.

VI. ANTECEDENTES

- **Gesche E., Vallejos A., Sáez M. 2003.** En su investigación “Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua”, realizaron un estudio comparativo de detección de Coliformes totales y coliformes fecales y de bacterias anaerobias sulfito-reductoras a fin de probar la eficiencia de la técnica de detección del NMP de esporas de anaerobios sulfito-reductores y de comparar la resistencia al cloro de ambos grupos de indicadores. Para el análisis, tomaron muestras de un río naturalmente contaminado con desechos urbanos e industriales durante el transcurso de seis meses, obtuvieron 14 muestras de 1 L, que fueron divididos en tres partes para los análisis correspondientes. Para la determinación de Coliformes totales y coliformes fecales se emplearon una dilución hasta 10^{-5} usando la técnica del Numero Más Probable y para los anaerobios sulfito-reductores se utilizó el caldo diferencial para Clostridios (DCRM) y sembrados en placa con el medio TSC que confirmó la presencia de bacterias esporuladas sulfito reductoras y se sometieron a concentración de cloro de 0.1 y 1mg/kg de cloro. Resultando que la técnica de los tubos múltiples (NMP) para la detección de los anaerobios sulfito-reductores en agua naturalmente contaminada con residuos fecales y compararon su resistencia con la de coliformes totales y coliformes fecales a 0.1 y 1 mg/Kg de cloro como desinfectante de agua.
- **Molleda P., Ansola G., De Luis E. 2005.** En su investigación “Análisis microbiológico de las aguas residuales tratadas por un humedal artificial de tipo M.J.E. A en León” realizaron análisis microbiológico durante el período de verano y otoño para presencia de *E. coli*, coliformes totales, *Clostridium spp.*, huevos de helmintos al agua tratada por el sistema de depuración basado en el tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales con el fin de determinar la eficiencia depuradora del sistema. Para la determinación de *E. coli* y coliformes usaron la técnica de filtración por membrana, para *Clostridium* usaron shock térmico sembrando en el medio SPS y para los huevos de helminto fueron observados en la cámara de Mac Master.
- **Cabrera A. & García E. 2006.** En su investigación “Identificación de microorganismos indicadores y determinación de puntos de contaminación en aguas superficiales provenientes del cementerío Jardines del Recuerdo ubicado en el norte de Bogotá”, aislaron e identificaron cepas sospechosas de *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Clostridium spp*,

coliformes totales y fecales presentes en el agua superficial mediante identificación bioquímica. Usaron la técnica colorimétrica del caldo LMX-Fluorocult para la identificación de coliformes totales y *E. coli*. y para *Clostridium spp.* Usaron el Agar SPS para su aislamiento selectivo y para sus reacciones bioquímicas usaron la prueba de la catalasa, prueba de nitrato, prueba de movilidad y la capacidad de fermentación de lactosa. Los resultados que obtuvieron fue que las aguas cercanas a las sepulturas presentan gran cantidad de microorganismos como *Salmonella choleraesuis*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium spp.*, Coliformes totales y fecales.

- **Hernández E., et al. 2012.** En su investigación “Calidad biológica de aguas residuales utilizadas para riego de cultivos forrajeros en Tulancingo, México” evaluaron coliformes fecales en agua residuales, suelo y plantas, y huevos de helmintos con el fin de detectar posibles riesgos para la salud. Usaron la técnica de Números Más Probables (NMP/100ml) para los coliformes fecales y para los huevos de helmintos por conteo en microscopio. Resultando que en todos los puntos de muestreo sobrepasaron los límites máximos permisibles (1000-2000 NMP/100ml) con unos valores de 2×10^{10} NMP/100ml para el agua residual, 10^9 NMP/100ml para el suelo, 10^9 NMP/100 ml para la raíz y 3×10^9 NMP/100ml para el tallo, por lo que se sugiere tratar las aguas residuales antes de su uso para evitar problemas de salud.
- **Venegas C., Mercado M., Campos M. 2014.** En su investigación “Evaluación de la calidad microbiológica del agua para consumo y del agua residual en una población de Bogotá”, evaluaron la calidad microbiológica del agua utilizada para consumo humano y el agua residual cercana a las viviendas de una población en desplazamiento y su relación con la salud de la población. Recolectaron 36 muestras de agua para consumo almacenados en diferentes tipos de recipientes y de grifos, y adicionalmente recolectaron 15 muestras de agua residual de forma aleatoria en un asentamiento ilegal. Para evaluar la calidad microbiológica del agua analizaron como indicadores biológicos *Clostridium perfringens*, *E. coli* y colífagos mediante la técnica de Filtración por Membrana y para los colífagos mediante la técnica de doble capa de agar. Resultando que 6 de las casas muestreadas presentaban *E. coli* (1-6 UFC/100ml), las esporas de *C. perfringens* se encontraron en 11 casas (1-24 UFC/ml) y colífagos en 4 muestras positivas (2-12 UFP/1L). El análisis de *E. coli*, *C. perfringens* y colifagos somáticos garantiza una mejor evaluación de la calidad del agua, así como del riesgo sanitario.

- **Chávez J., Leiva D., Corroto F. 2016.** En su investigación “Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas residuales en la ciudad de Chachapoyas, región Amazonas”, determinaron la influencia de los efluentes residuales de la ciudad de Chachapoyas en la calidad del agua de la quebrada Santa Lucia y el río Sonche, a través de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para contrastar los resultados con los ECA’s de la legislación peruana. Establecieron cinco estaciones de muestreo, dos en la quebrada Santa Lucia y tres en el río Sonche, teniendo en cuenta el vertimiento de los efluentes residuales. Los parámetros microbiológicos estudiados fueron coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* (EC) mediante la técnica de números más probables (NMP), y los parámetros fisicoquímicos fueron turbiedad, temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto medidos en campo. Dando como resultado los valores para la quebrada Santa Lucia de 9×10^{10} NMP de CT y CF/100ml y de 28×10^5 a 9×10^{10} NMP de EC/100ml, y para el Río Sonche los valores de 5×10^5 a 9×10^5 de NMP de CT/100ml, de 5×10^2 a 5×10^5 NMP de CF/100ml y de 5×10^2 a 24×10^4 NMP de EC/100ml; por lo que confirma que la afluencia de la quebrada Santa Lucia, la cual baja con una alta carga microbiana debido a la descarga continua de las aguas residuales de la ciudad de Chachapoyas influye de forma importante sobre el contenido microbiano en el río Sonche.
- **Campana A., Gualoto E., Chiluisa-Utreras V. 2017.** En su investigación “Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito” evaluaron la calidad y la condición del agua de los ríos Machángara y Monjas midiendo los parámetros fisicoquímicos como el caudal, pH, temperatura, oxígeno disuelto y potencial de oxidación-reducción mediante monitoreo *in situ*, y para los parámetros microbiológicos como Coliformes totales y Coliformes fecales usando la técnica de fermentación de tubos múltiples. Resultando que para los ríos Machángara y Monjas sobrepasaban los límites máximos permisibles (1000 NMP/100ml) con 337777 NMP/100ml y 407777 NMP/100ml respectivamente.
- **Yañez S. 2018.** En su investigación “Evaluación de la contaminación del agua mediante parámetros fisicoquímicos en las desembocaduras de los principales afluentes y efluentes del Lago San Pablo” identificó el índice de calidad del agua entrante y saliente del Lago San Pablo con datos fisicoquímicos y microbiológicos con respecto a las cargas contaminantes. Los parámetros medidos fueron: pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, sólidos totales, suspendidos y disueltos, nitratos, nitritos, fosfatos, demanda bioquímica de oxígeno, coliformes totales y metales pesados (Cd, Co, Ni y Pb), y los resultados los compararon con los límites máximos permisibles de la Normativa Técnica

Ambiental de Ecuador. Resultando que los coliformes totales están sobre los límites permisibles (2000 UFC/100ml) para el agua de uso recreativo y a los límites permisibles de descarga al cuerpo de agua (2000 UFC/100ml) con un promedio de 2600 UFC/100ml a 32 700 UFC/100ml.

VII. HIPÓTESIS

Si las aguas de los seis efluentes no se encuentran dentro de los valores permisibles para los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos estudiados según el ECA, entonces se podría dar una alerta sanitaria sobre el uso de estas aguas.

VIII. MATERIALES Y METODOS

8.1. Lugar de ejecución

- Laboratorio de Fisicoquímico y Microbiológico del Consorcio Agua Azul S.A., en la Carretera Lima a Canta Km 27 - Carabaylo.
- Laboratorio de Parasitología (LA79) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma en la Av. Benavides 5440, Santiago de Surco.

8.2. Tipo y diseño de la investigación

- Se realizó un estudio basado en el método explicativo basado en la evaluación estadística.
- El diseño de investigación será experimental.

8.3. Variables

- **Independiente:** Características del agua:
 - Parametros fisicoquímicos
 - Parametros microbiológicos
- **Dependiente:** Calidad de agua de los efluentes cercanos al río Chillón

8.4. Operacionalización de las variables

Tabla 3. Operacionalización de las variables

VARIABLE		INDICADOR	INDICE
Independiente	Características del agua (Parámetros físicos, químicos, microbiológicos)	Parámetros físicos:	
		Temperatura	°C
		Turbidez	NTU
		Conductividad	µS/cm
		Parámetros químicos:	
		pH	Unidad
		Dureza total	mg/L
		Cloruros	mg/L
		Nitratos	mg/L
		Parámetros microbiológicos	
		Coliformes totales	NMP/100ml
		Coliformes termotolerantes	NMP/100ml
		<i>Escherichia coli</i>	UFC/ml
<i>Clostridium spp</i>	UFC/ml		
Dependiente	Calidad del agua de los efluentes cercanos al Río Chillón	Parámetros fisicoquímicos	Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua DS 015 - 2015
		Parámetros microbiológicos	

Fuente: Elaboración propia

8.5. Muestreo

El monitoreo se realizó en seis afluentes escogidos al azar que descargan en el margen del río Chillón, tomándose 2 muestras por estación de muestreo cada 15 días, en cantidades de 1 litro para análisis fisicoquímicos y 200 ml para análisis microbiológicos, haciéndose un total de 12 muestras mensualmente desde el mes de enero a junio de 2019 (ver Anexo 1: Mapa de estaciones de muestreo).

Tabla 4. Ubicaciones de las estaciones de muestreo

Estaciones de muestreo	Siglas	Centros poblados cercanos	Coordenadas (UTM)	Distancia de la estación del centro poblado más cercano (m)
Estación 1	EM-1	Macas	2900028.47 E 8707827.3 N	215
Estación 2	EM-2	Asentamiento humano Zapan	2882696.79 E 8705925.37 N	578
Estación 3	EM-3	Centro Poblado Huanchipuquio	287580.48 E 8704823.25 N	697
Estación 4	EM-4	Centro Poblado La Rinconada	284339.17 E 8701865.6 N	1384
Estación 5	EM-5	Centro Poblado de Buenavista	284596.67 E 8700561.22 N	989
Estación 6	EM-6	Centro Poblado Chocas Bajo	283440.77 E 8697000.2 N	1634

Fuente: Elaboración propia

8.6. Procedimiento y análisis de datos

El análisis se llevará mediante tablas de Microsoft Excel 2016

8.6.1. Obtención de Muestras

Las muestras que se emplearon durante la investigación fueron obtenidas en seis efluentes cercanos al río Chillón, desde el poblado de Macas hasta el Centro poblado de Olfa.

Las muestras de agua de los efluentes fueron tomadas en contra la corriente sosteniendo la botella cerca de su base con una mano y sumergiéndola boca abajo luego se gira la botella hasta que el cuello apunte hacia arriba con la boca. En algunos casos, se utilizó un frasco muestreador con soguilla

por no tener un acceso rápido. Además, se empleó los implementos protectores como mandil, mascarilla naso bucal, guantes y botas.

Para los análisis de los parámetros fisicoquímicos se usaron frascos vírgenes de polietileno de 1 litro y botellas Pirex de tapa rosca de 250 ml para los análisis microbiológicos, se le colocaron la etiqueta con la información requerida del producto (Estación de muestreo, número de muestra, coordenadas del muestreo, fecha y hora del muestreo).

Luego, las muestras se colocaron en un contenedor o cooler seco, higienizado y desinfectado previamente con alcohol, conservando la muestra a una temperatura de 0 a 4 °C mediante pack en gel dispuestos en la base y encima de la muestra. La muestra – contenedor se transportó en un lapso de 2 horas hasta el Laboratorio del Consorcio Agua Azul S.A, donde se realizó los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

8.6.2. Procesamiento de las muestras.

Las técnicas empleadas siguieron como fuente a los protocolos del Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, 2017 para los parámetros fisicoquímicos se siguieron los siguientes métodos: turbiedad mediante el método nefelométrico, pH, temperatura y conductividad el método electrométrico, nitratos el método espectrofotométrico ultravioleta, dureza total el método complexométrico y cloruros el método de morh, técnica de fermentación por tubos múltiples, y el UNE-EN.ISO 14189:2017 modificado. Además, se siguió la normativa de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA's) actualizado por los Decretos Supremos N° 002-2008-MINAN y en el N° 015-2015-MINAN, donde se encuentran los límites máximos permisibles para el agua de categoría 3, subcategoría D1 para el riego de vegetales y subcategoría D2 para bebida de animales.

8.6.3. Parámetros fisicoquímicos del agua

a. Medición de Turbiedad

Para la medición de la muestra se tomó 15 ml de la muestra y se colocó en una celda especial cuya lectura fue realizada en el turbidímetro, asegurándose de que esté completamente limpio y seco. Si la muestra midió más de 1 000 NTU, se realizó diluciones con agua destilada y una nueva medición, luego se multiplicó el resultado obtenido por el factor de dilución correspondiente. La unidad de medición es NTU (Nephelometric Turbidity Unit).

b. Medición de pH

Se colocó 100 ml de muestra dentro de un vaso de 250 ml y se sumergió el electrodo del pHmetro previamente lavado con agua destilada dentro de ella. Se esperó la lectura estable para registrarlo.

c. Medición de Conductividad

Se colocó 100 ml de la muestra dentro de un vaso de 250 ml y se sumergió el sensor de conductividad del conductímetro agitando suavemente el sensor en el fondo del vaso para estar seguro que no haya burbujas de aire atrapadas cerca del electrodo. Se dejó pasar aproximadamente 10 segundos para que se estabilice la medida antes de tomar la lectura. Se leyó la conductividad en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se enjuagó el sensor con agua destilada tratando de que el agua pase por el orificio del sensor.

d. Medición de nitratos

Para la determinación de nitratos las muestras fueron analizadas antes de las 24 horas después de colectada la muestra.

Se prepararon estándares de calibración en el rango de 0 a 7 mg N/L desde la solución madre de nitratos 100 mg N – NO_3/L . Las soluciones de trabajo fueron 0.0; 1.0; 2.0; 5.0 y 10.0 mg N- NO_3/L para elaborar la curva de calibración. Luego se midió la absorbancia a 220 nm para la determinación rápida de nitrato y a 275 nm para determinar la interferencia debida a la materia orgánica y corregir el valor del nitrato.

Las muestras que contenían la turbiedad mayor a 1 NTU se filtraron, luego la muestra filtrada se tomó 3 ml de muestra en una cubeta de cuarzo de 10mm y se midieron en el espectrómetro UV-VIS y ese valor se llevó a la curva del nitrato para tener la concentración de nitrato en mg N – NO_3/L . El espectrofotómetro arrojó resultados en mg N – NO_3/L de acuerdo al factor de dilución digitado en el momento de la lectura, aplicando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A - I}{S}$$

Donde:

C = Concentración de nitratos mg/L N- NO_3

A = Absorbancia de 220 nm y Absorbancia de 275 nm

I = Intersección de la línea de regresión

S = Pendiente de la recta de regresión

e. Medición de Dureza Total

Se determinó la dureza total utilizando el método complexométrico utilizando TRITIPLEX Solución A.

Se prepararon los siguientes reactivos:

- La solución estándar de CaCO_3 , pesando 1 000 g de CaCO_3 , previamente secado en una estufa a 105°C durante dos horas, llevando a un matraz de 500ml y se añadió unas gotas de HCl (1:1) hasta disolver. Luego, se añadió 200 ml de agua destilada y se dejó hervir de 3 a 5 minutos para eliminar el CO_2 , se dejó enfriar y se añadió unas gotas de indicador rojo de metilo y se ajustó al color naranja intermedio por adición de NH_4OH 3N o HCl 1:1. Luego, se transfirió a una fiola de 1 L y se enrasó con agua destilada. La concentración de la solución resultante se expresó como 1 ml = 1 mg CaCO_3 .
- Se tomó 40 ml de la solución Standard preparado, lo que equivale a 40 mg de CaCO_3 y se enrasó a 100 ml con agua destilada.

Luego se calculó el factor volumétrico de la solución

Así:

$$f = \frac{\text{Volumen titulado de solución estándar de CaCO}_3}{\text{Gasto real de la solución de EDTA}}$$

- Se tomó 100 ml de la muestra de agua, se agregó una tableta de indicador buffer y se añadió 1 – 2 ml de la solución de amonio 25% hasta que se disuelva completamente.
- Se tituló usando la solución Tritiplex A hasta que el color cambie de rojo a verde y se anotó el gasto de la solución Tritiplex A.

Para expresar los resultados, se siguió la siguiente fórmula:

- El reagente Tritiplex Solución A tiene la siguiente equivalencia:

$$1 \text{ ml Tritiplex Solución A} \approx 56 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$$

- Siendo la dureza expresada en mgCaCO_3/L , se realizó la conversión:

$$1.79 \text{ mg CaCO}_3/\text{L} = 1 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$$

Por lo tanto, la expresión se redujo a:

$$\text{Dureza total} \frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}} = f * \text{Tritiplex A}(\text{ml}) * 56 \frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}} * 1.79 \frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}}$$

f. Medición de Cloruros

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Solución estándar de NaCl 0.0141 N para valorar la solución de AgNO_3 , se pesó 0.8240g de NaCl (secado previamente de 3 o 4 g de NaCl en la estufa durante dos horas a 140°C).

Se disolvió en 200 ml de agua destilada y se transfirió cuantitativamente en una fiola de 1L y se enrasó. La solución resultante es de 500 mg Cl⁻/L. También se puede expresar como: 1 ml = 0.5 mg Cl⁻.

- Solución tituladora de AgNO₃ 0.0141 N, se pesó 2.395g de AgNO₃ y se disolvió en 100 ml de agua destilada. Se transfirió cuantitativamente a una fiola de 1 L lavando con tres porciones de 100 ml de agua destilada. Se guardó en un frasco ámbar en una gaveta oscura.
- Solución indicadora de K₂CrO₄, se pesó 25g de K₂CrO₄ y se disolvió en 250 ml de agua destilada. Se agregó la solución de AgNO₃ 0.0141 N gota a gota hasta observar la formación de un precipitado de color rojo ladrillo. Se dejó reposar toda la noche a 25°C. Al día siguiente, se filtró la solución y el filtrado se llevó a 500ml con agua destilada.
- Se hizo la valoración de AgNO₃ 0.0141N, midiendo 15ml de solución estándar de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, se agregará 1ml de solución indicadora de K₂CrO₄ y se tituló con solución de AgNO₃ hasta la aparición de un color amarillo rosáceo, se anotó el gasto y se calculó el valor de “N” de la formula.
- Se tomó un volumen adecuado de muestra, se transfirió a un matraz de 250ml y se llevó a 100 ml con agua destilada.

100 ml	0 – 50 mg Cl ⁻ /L
50 ml	50 – 100 mg Cl ⁻ /L
25 ml	100 – 150 mg Cl ⁻ /L
10 ml	> 200 mg Cl ⁻ /L

- Se tomó 100 ml de agua destilada en otro matraz como blanco y testigo de comparación de color.
- Se añadió a cada uno de los matraces 1 ml de solución indicadora. El color de ambos matraces cambió a amarillo brillante.
- Se anotó la lectura de la bureta antes de empezar a titular luego se tituló con la solución de AgNO₃ 0.0141 N el blanco hasta la aparición de un color amarillo rosáceo. Se anotó la lectura de la bureta y se calculó por diferencia de gasto de solución para el blanco. Se registró el valor calculado como “B”. Normalmente se suelen necesitar de 4 a 10 gotas.
- Se registró la nueva lectura de bureta y se empezara a titular el matraz con la muestra hasta la aparición de un color amarillo rosáceo similar al del blanco. Se anotará la lectura de la bureta y se calculará por diferencia el gasto de solución para la muestra. Se registrará el valor como “A”.

Para calcular el gasto real de la solución tituladora de AgNO₃ como la diferencia entre el gasto de solución de AgNO₃ para la muestra y para el blanco (Es decir, se calculó el valor de A – B).

$$mg \frac{Cl -}{L} = \frac{(A - B) * N * 35450}{ml \text{ muestra}}$$

Donde:

(A – B) = Gasto real de la solución de AgNO₃

N = Normalidad de la solución de AgNO₃

8.6.4. Método para detección de coliformes totales y termotolerantes por la técnica de la fermentación en tubos múltiples

Se tomaron 100 ml de la muestra para la detección de coliformes totales y termotolerantes por la técnica de los Números Más Probables o técnica de fermentación por tubos múltiples. Se analizó el agua de río, inoculando una serie de tubos con diluciones múltiples de 10ml según la probable densidad de coliformes.

A. Fase presuntiva

Se organizó tres filas de cinco tubos de ensayo en una gradilla, donde el número de filas y los volúmenes de la muestra dependieron de la calidad del agua que se examinará. Para agua no potable, se usó cinco tubos por dilución de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml.

Se agitaron la muestra y se transfirió 10ml, 1 ml y 0.1 ml a tubos con 9 ml de Caldo Lauril Sulfato de Sodio con tubos de Durham y se replicó 5 veces en tubos y se agitó suavemente para la homogenización de la muestra. Luego, se incubó a 35 ± 0.5 °C y después de las 24 ± 2 horas se observó si hay producción de gas, y si no se observa se incubó 24 horas más. La producción de gas a las $48h \pm 3$ horas de incubación confirma la reacción presuntiva positiva y la ausencia de gas confirma la reacción presuntiva negativa.

Los tubos positivos a la reacción fueron usados para la fase confirmativa teniendo en cuenta la cantidad de positivos y negativos.

B. Fase confirmativa

Se tomaron todos los tubos presuntivos que muestren crecimiento, cualquier cantidad de gas dentro de las 24 horas de la incubación. Si los tubos presuntivos adicionales muestran una fermentación activa o una reacción ácida al final del período de incubación de 48 h, se adicionarían a la fase confirmativa para confirmar las presuntas colonias de coliformes que crecen en un medio sólido utilizando medios de fermentación.

Se agitó suavemente los tubos presuntivos que muestren gas para resuspender los organismos. Con un asa de siembra estéril de 3.0 a 3.5 mm de diámetro, se transfirió uno o más asadas de cultivo a un tubo de fermentación que contenga Caldo de Bilis de Lactosa Verde Brillante (BRILA) y se repitió para todos los otros tubos presuntivamente positivos tanto para los Coliformes

Totales usando el Caldo BRILA, como para los Coliformes Termotolerantes usando el caldo EC para *E. coli*.

Luego se incubó los tubos de Caldo BRILA inoculados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48h evidenciando la producción de gas en los tubos de Durham, de igual manera se inoculó los tubos positivos en el caldo EC durante 48h a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ evidenciando la producción de gas en los tubos de Durham. Para estimar la densidad de coliformes, se calculó el valor de NMP a partir del número de tubos BRILA positivos.

Se utilizó esta alternativa solo para aguas contaminadas o aguas residuales que se sabe que producen resultados positivos de manera constante. Si todos los tubos presuntos son positivos en dos o más diluciones consecutivas dentro de las 24 horas, entonces solo envíe a la fase confirmada los tubos de dilución más alta (inóculo de muestra más pequeño) en los que todos los tubos sean positivos, junto con cualquier tubo positivo en diluciones aún mayores y enviar a la fase confirmativa todos los tubos en los que se produzca un crecimiento gaseoso en 24 a 48 h.

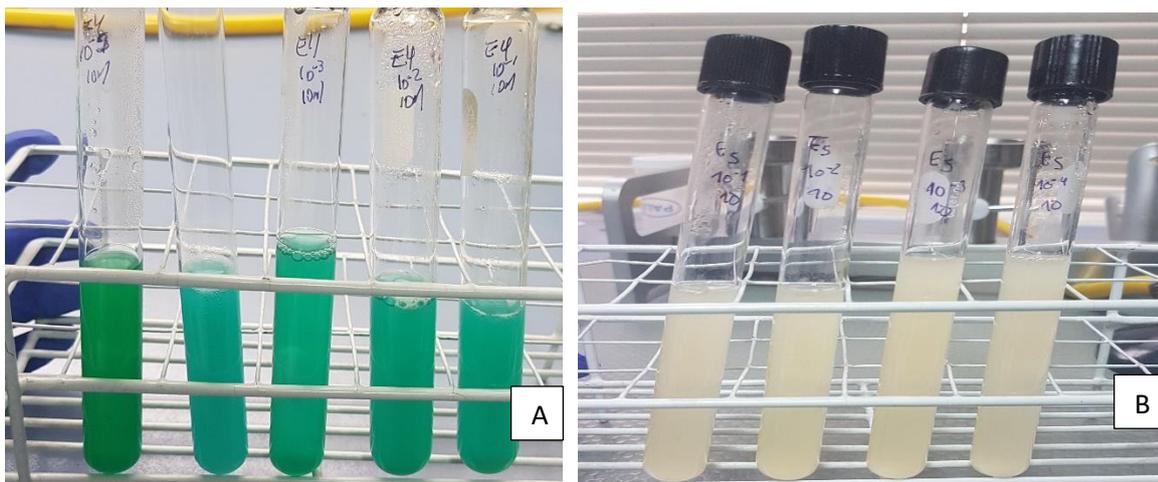


Figura 2. Prueba confirmativa.

- A. Tubos conteniendo caldo lactosado bilis verde brillante, B. Tubos con caldo EC, mostrando gas en la campana de Durham lo que se interpreta como resultado positivo.

C. Aislamiento e identificación preliminar de *Escherichia coli*

▪ Resiembra en Agar EMB

A partir de los tubos confirmados para coliformes termotolerantes se sembró por estrías con asa de siembra en agar EMB con el fin de obtener las bacterias en forma aislada. Se incubó las placas durante 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se identificó las bacterias de *Escherichia coli* por la coloración negro azulado y brillo verde metálico.



Figura 3. Identificación presuntiva de *Escherichia coli* en medio EMB
Coloración negra azulada y brillo verde metálico

8.6.5. Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*

A. Agar TSI

Se anotó las características del medio TSI antes de la inoculación (color del medio es fucsia), luego por duplicado se tomó suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril para inocular por picadura y estría en un tubo con agar triple azúcar-hierro (TSI) con pico de flauta. Después se incubará el medio TSI a 35 ± 0.5 °C durante 24 h. Finalmente se interpretó los resultados.

B. Agar SIM

Con un asa bacteriológica recta estéril, se tomó el crecimiento del tubo TSI y se inoculó por punción vertical en el tubo con medio de SIM. Luego se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 h. Para verificar la producción de indol, se adicionó al tubo con medio SIM que presente crecimiento de 0.2 a 0.3 ml de reactivo de Kovac's. Finalmente se interpretó los resultados.

C. Agar Citrato de Simmons

Con un asa bacteriológica recta estéril, se tomó el crecimiento del tubo de TSI y se inoculó por estría en el tubo con agar citrato de Simmons. Después se incubará a 35 ± 2 °C durante 96 ± 2 h. Finalmente se interpretará los resultados.

8.6.6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* por difusión en agar

A. Seleccionar las colonias

Las colonias seleccionadas no sobrepasaron las 18-24 horas de aislamiento y se seleccionaron de 3 - 5 colonias de *Escherichia coli* que fueron sembradas en caldo TSA e incubadas por 16 horas a 35 ± 0.5 °C, se sembró en el agar Muller-Hinton para tener mayor probabilidad de detectar la resistencia.

B. Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Las placas con agar Mueller-Hinton fueron inoculadas con la bacteria mediante hisopado en su superficie, la suspensión bacteriana se determinó de acuerdo a la dilución 0,5 de la escala de turbidez de McFarland. Los discos de antibióticos son Amicacina, Ampicilina, Amoxicilina-Ac. Clavulánico, Ceftazidima, Norfloxacin, Cefuroxima y Ciprofloxacino, y se colocó sobre la superficie del agar. Cada disco deberá ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, fueron distribuidos en forma constante y sin quedar a menos de 24 mm de distancia entre los centros. No más de 12 discos se deben colocar por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Las placas serán invertidas y colocadas en la estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ después de 15 minutos de aplicados los discos.

Tabla 5. Diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos y de la cepa referencial de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Antimicrobiano	Siglas	Carga del disco (μg)	Diámetro de halo de inhibición (mm)			<i>E.coli</i> ATCC 25922
			Resistente	Intermedia	Sensible	
Ampicilina	AM10	10	≤ 13	14 - 16	≥ 17	16 - 22
Amicacina	MK30	30	≤ 14	15 - 16	≥ 17	19 - 26
Amoxicilina - Ac. Clavulánico	AMC30	30	≤ 13	14 - 17	≥ 18	19 - 25
Ceftazidima	CAZ30	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18	25 - 32
Norfloxacin	NX10	10	≤ 12	13 - 15	≥ 17	28 - 35
Cefuroxima	CXM30	30	≤ 14	15 - 22	≥ 23	20 - 26
Ciprofloxacino	CIP5	5	≤ 15	16 - 20	≥ 21	30 - 40

Fuente: Elaboración propia con datos del NCCLS, 2000.

C. Medición de las zonas de inhibición

Se examinó detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano.

Para medir las zonas de inhibición se midió el diámetro del halo formado alrededor del antibiótico con una regla o un vernier.

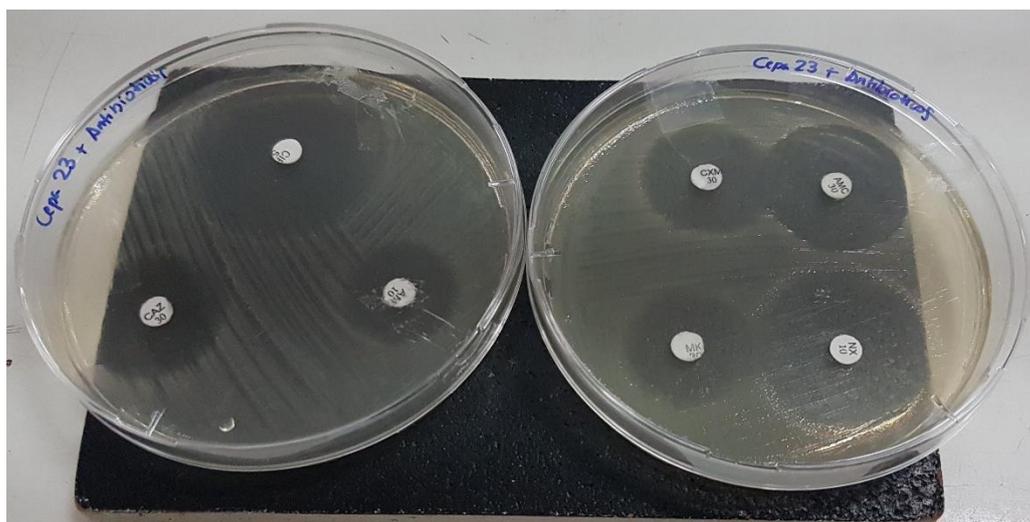


Figura 4. Formación de los halos de inhibición para cada antibiótico.

8.6.7. Método para detección de *Clostridium spp.* según el UNE-EN-ISO 14189:2017 modificado

Se usó 50 ml de la muestra para realizar la técnica descrita en las siguientes etapas: la primera etapa fue la etapa de pretratamiento, enriquecimiento selectivo y confirmación presuntiva.

A. Pre-tratamiento.

Se calentó la muestra para la selección de esporas a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 ± 1 minuto para la eliminación de bacterias que puedan interferir en el análisis.

B. Enriquecimiento selectivo.

Se agitó suavemente la muestra. Luego se transfirió 1.0 ml de la muestra y se sembró a profundidad en placas Petri que contendrá medio de cultivo triptosa-cicloseria-sulfito (TSC) y se volvió a realizar el sembrado con un 0.1 ml de la muestra para sellar el cultivo. Luego, se procedió a incubarlo anaeróbicamente simulando la anaerobiosis sellándolo con parafina durante 24 – 48 h a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.



Figura 5. Detección de colonias de *Clostridium* spp (negras) en el agar TSC

C. Confirmación presuntiva.

Se observaron colonias negras en el medio TSC dando como positivo para esporas, luego se aislaron las colonias negras en Agar Sangre mediante la técnica de punción y se incubó anaeróticamente a 35 ± 0.5 °C durante 24 h.

Luego, se resembró en medio tioglicolato las colonias crecidas anaeróticamente, se aseguró la anaerobiosis con aceite mineral con una capa y se realizó una tinción Gram para la observación de la posición de la espora en el microscopio.

8.7. Aspecto ético

El desarrollo de esta investigación no aplica el consentimiento de los agricultores de las chacras cerca de las acequias para el procesamiento de las muestras colectadas.

IX. RESULTADOS

Los muestreos se realizaron en los meses de enero a junio de 2019 en intervalos de 15 días, obteniéndose un total de 72 muestras, 36 para los análisis fisicoquímicos y 36 para los análisis microbiológicos.

9.1. Analizar los parámetros fisicoquímicos de seis efluentes cercanos al río Chillón durante los meses de enero a junio de 2019

a. Turbiedad:

La turbiedad en el mes de febrero presentó fue mayor con respecto a los demás meses por la cantidad de huaycos y lluvias en las zonas altas con un promedio de 669.7 NTU, en cambio a partir del mes de marzo en adelante se observa un descenso de turbiedad por lo mismo que empieza a disminuir las lluvias.

Con respecto a las estaciones durante los 6 meses, se observa que la estación que presentó mayor turbiedad fue la estación 4 con respecto a las demás teniendo un promedio de 647.6 NTU, mientras que la estación con menor turbiedad durante el estudio fue la estación 6 con un promedio de 110.4 NTU.

Tabla 6. Promedio de turbiedad en cada mes de las seis estaciones

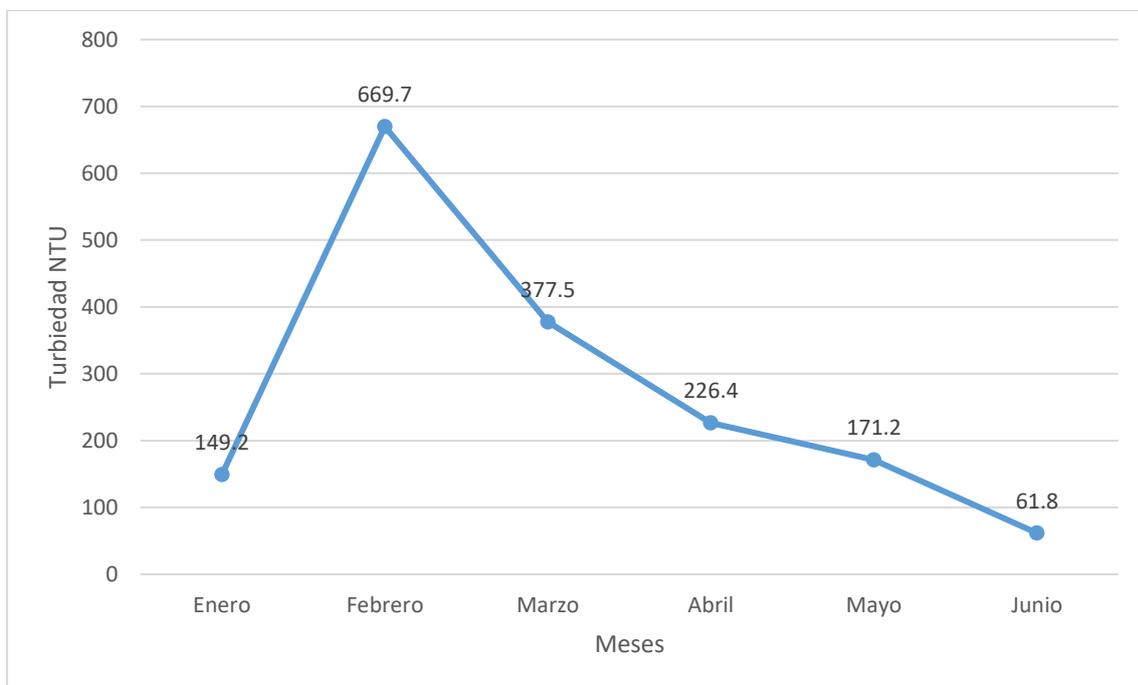
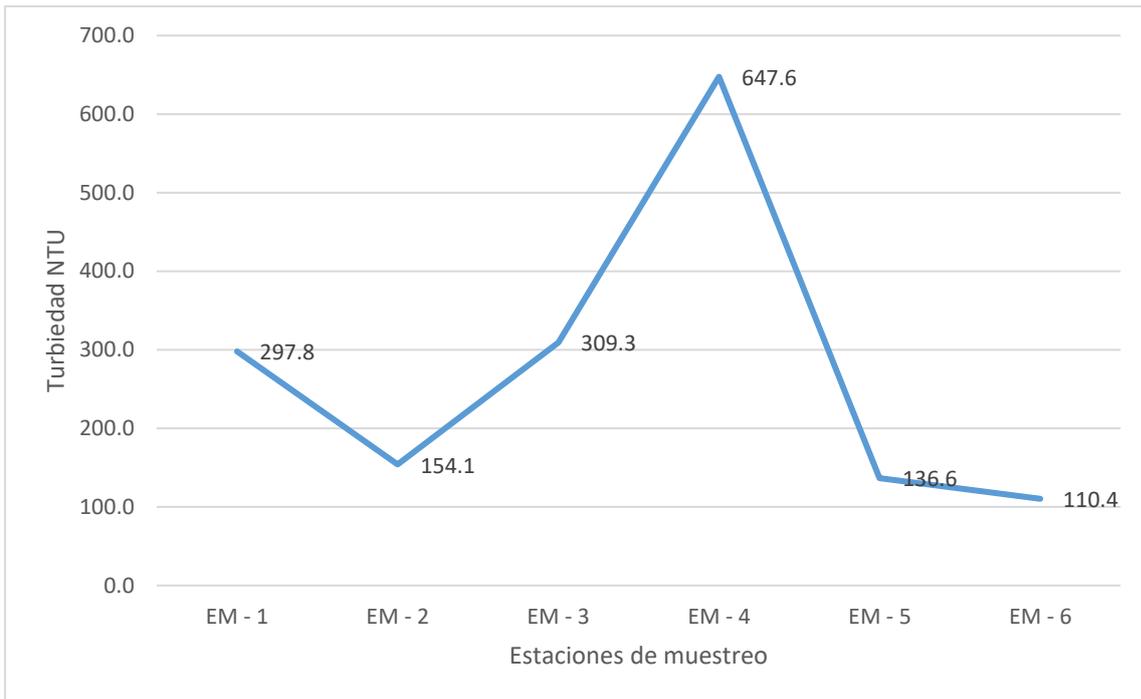


Tabla 7. Promedio de la turbiedad en cada estación durante los seis meses.



b. pH y temperatura

El pH durante los seis meses de estudio tuvo un promedio de 8.12, lo que significa que se mantuvo en el rango permisible de los ECA's de 6.5 a 8.5, siendo el mes que presento mayor pH en febrero 8.3 y la estación 4 tuvo un pH de 8.4, lo que nos indica que es relativamente alcalina sin limitar el crecimiento microbiano.

Tabla 8. Promedios de pH en cada mes de los seis estaciones

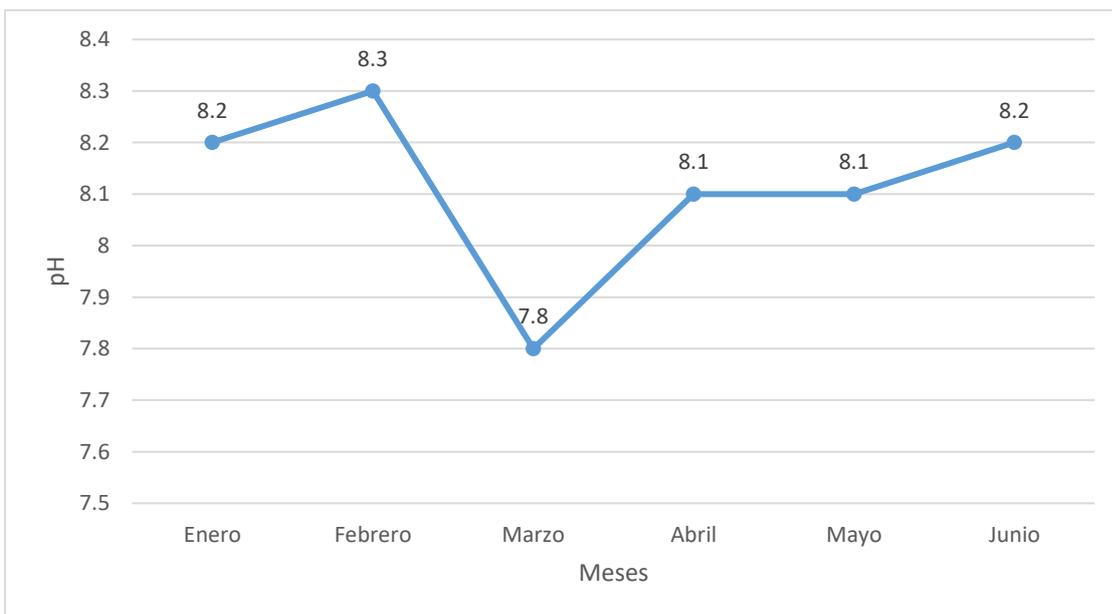
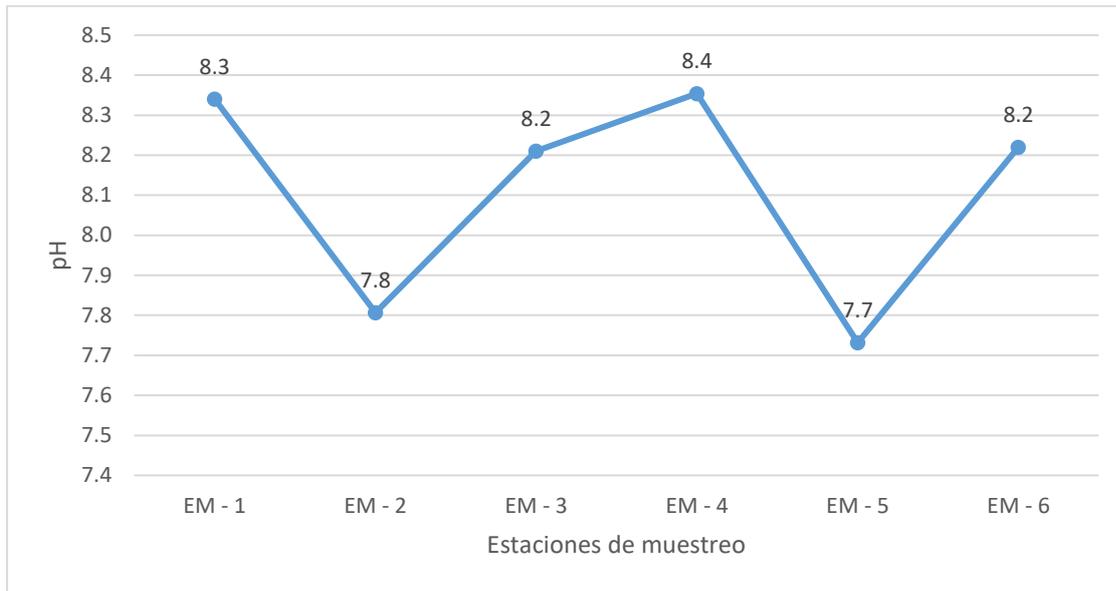
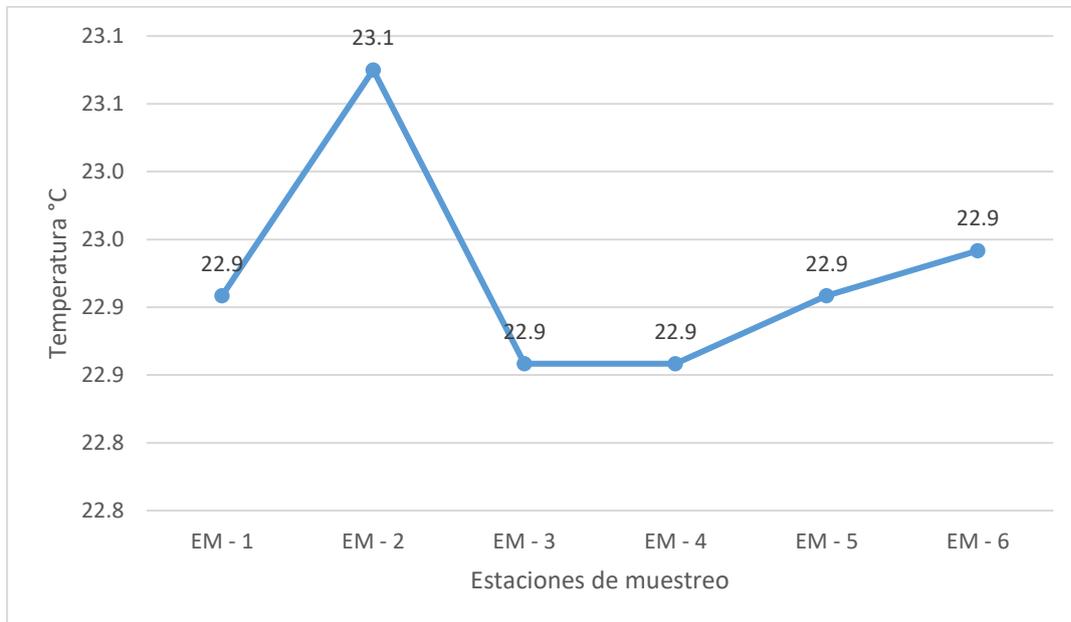


Tabla 9. Promedio de ph en cada estación durante los seis meses



Con respecto a la temperatura, tuvo un valor promedio de 22.9°C en las seis estaciones durante los seis meses.

Tabla 10. Promedio de temperaturas de las seis estaciones durante las seis meses



c. Conductividad

La conductividad durante los seis meses de muestreo se mostró dentro de los valores permitidos del ECA, siendo el mes de febrero que mostró el valor más alto de 1037 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y con respecto a las estaciones, la estación 5 mostro un valor promedio de 1040 $\mu\text{S}/\text{cm}$ durante los seis meses de muestreo. En general todas las estaciones presentaron valores dentro de lo permitido por la norma.

Tabla 11. Promedio de conductividad en cada mes de las seis estaciones

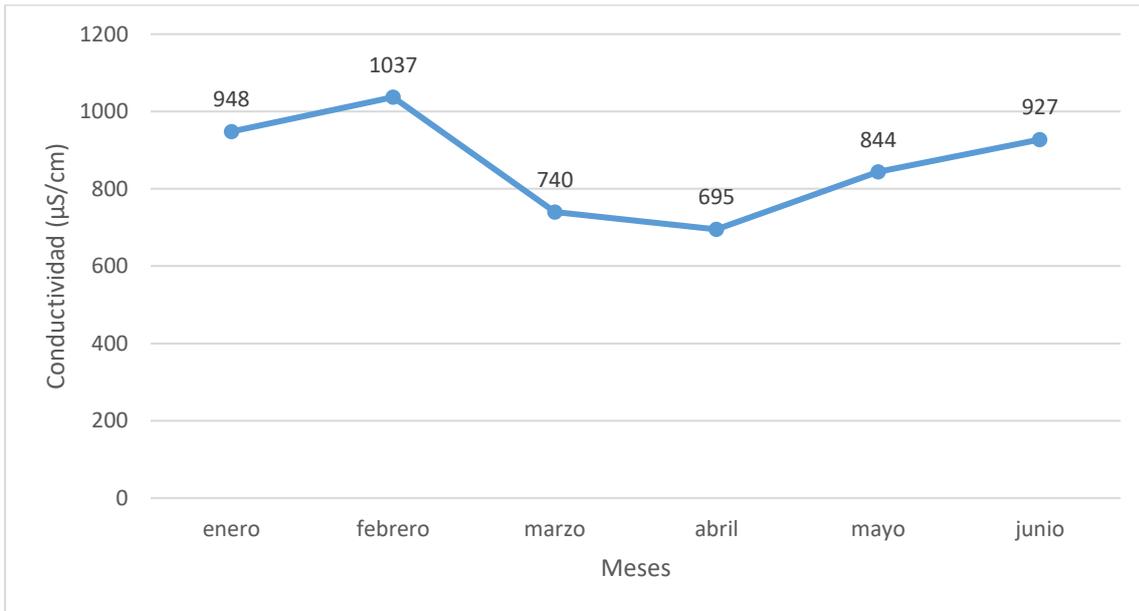
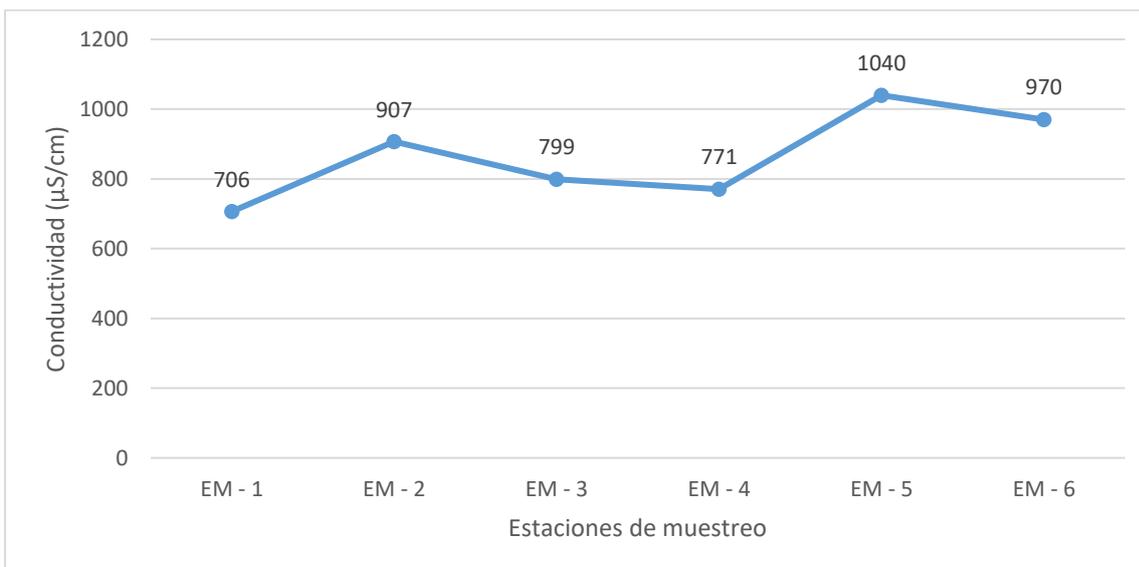


Tabla 12. Promedio de la conductividad de cada estación durante los seis meses.



d. Nitratos

La concentración de nitratos fue mayor en el mes de marzo con un promedio de 43.25 mg/L mientras que el resto de los meses se mantuvo entre los valores de 11.8 mg/L a 33.4 mg/L. Con respecto a las estaciones durante los seis meses, las seis estaciones mostraron los valores promedios desde 14.0 mg/L a 37.8 mg/L, lo que se puede suponer que el uso de fertilizantes o de desechos de humanos eran arrastrados por la corriente superficial, pero sin generar un efecto negativo en las plantas o animales que beban el agua estando dentro de los valores permisibles.

Tabla 13. Promedio de la concentración de nitratos de las seis estaciones en cada mes

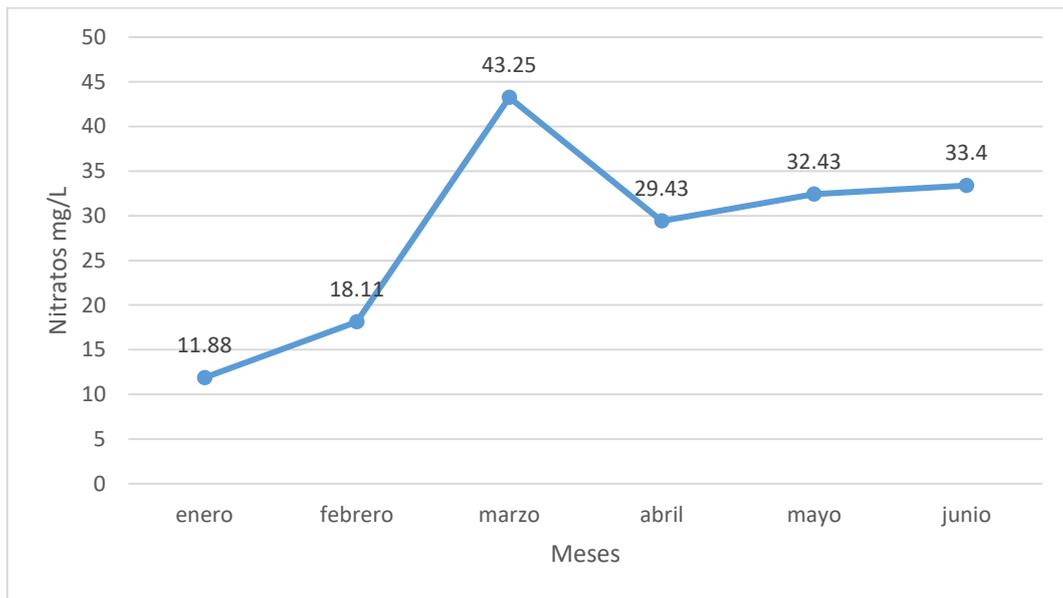
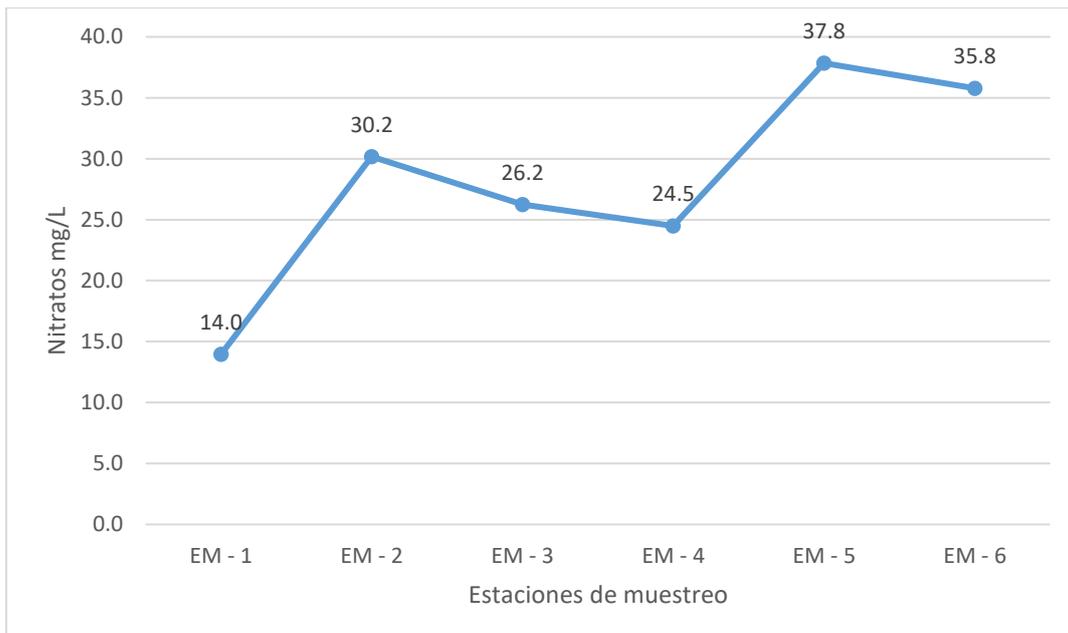


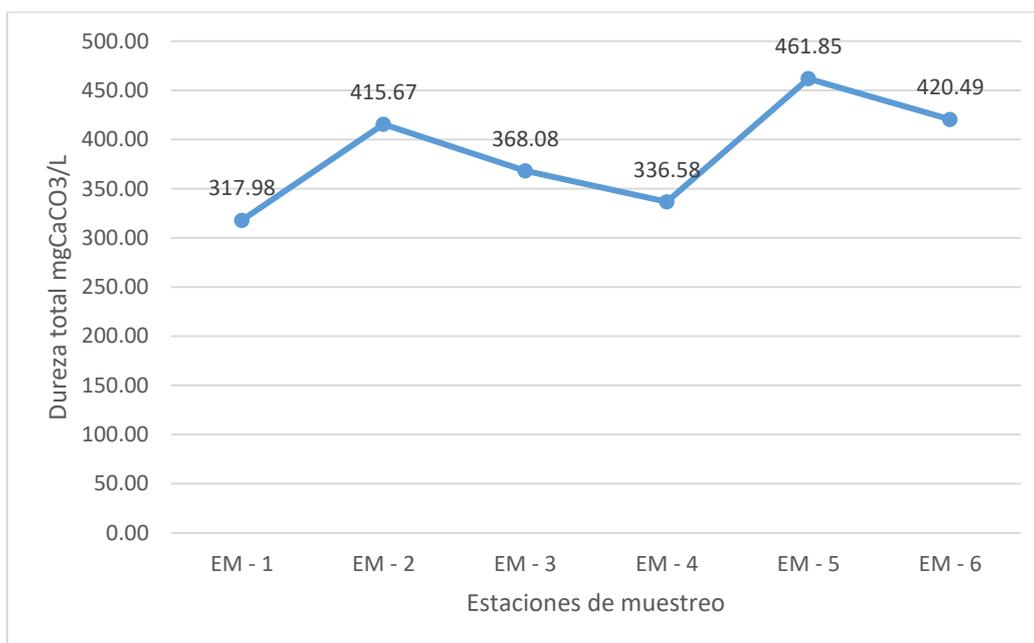
Tabla 14. Promedio de la concentración de nitratos en las seis estaciones durante los seis meses



e. Dureza total

La dureza total de las seis estaciones durante los seis meses tuvo un valor promedio de 386.77 mg CaCO₃/L, en el mes de febrero tuvo una concentración promedio de 428.22 mg CaCO₃/L y en la estación 5 tuvo una concentración promedio de 461.85 mg CaCO₃/L, lo que indica que la cantidad de sales y carbonatos no afectan la vida de las plantas o animales que viven alrededor.

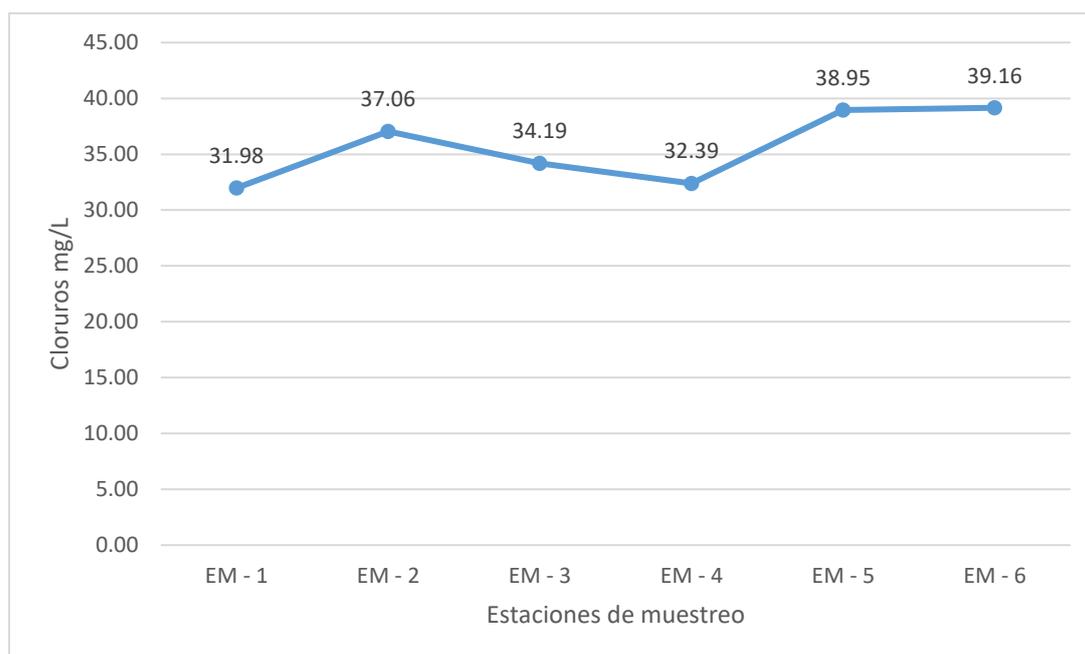
Tabla 15. Promedio de dureza total de las seis estaciones durante los seis meses



f. Cloruros

Con respecto a los cloruros, en las seis estaciones de muestreo durante los seis meses tuvo valores promedios desde 31.98 mg/L a 39.16 mg/L siendo las estaciones 5 y 6 los que presentaron mayor concentración de cloruros con unos valores de 38.95 mg/L y 39.16 mg/L respectivamente. Mientras que en el mes de marzo tuvo una concentración de 41.22 mg/L lo que indica que hay una ligera contaminación de aguas residuales domesticas en el agua, pero los valores se encuentran dentro de los límites permisibles de los ECA's.

Tabla 16. Promedio de la concentración de cloruros en las seis estaciones durante los seis meses



9.2. Enumerar mediante la técnica de los tubos múltiples de fermentación la presencia de coliformes totales, coliformes termotolerantes

En la tabla N°16, se puede observar el análisis microbiológico mediante la técnica de los tubos múltiples de fermentación realizado en los seis efluentes, reportando que, durante los seis meses analizados para los seis puntos evaluados, las concentraciones de coliformes totales fueron desde 6.8 NMP/100ml hasta 920 NMP/100ml. Además, se observó que las concentraciones de los coliformes termotolerantes fueron desde 4.5 NMP/100ml hasta 920 NMP/100ml, lo que se encontraban dentro de los ECA's (2017) para aguas de riego de vegetales y bebida de animales.

Con respecto a los meses se observa que en enero y febrero hubo mayor concentración de coliformes totales en las estaciones de muestreo 4, 5 y 6, y en los meses mayo y junio hubo en la estación 4. Mientras el mes de junio tanto las concentraciones de coliformes totales como fecales estuvieron muy similares en las mismas estaciones. Para los coliformes fecales, los seis meses mantuvieron una concentración baja.

Tabla 17. Promedio de NMP de los coliformes totales de los seis efluentes.

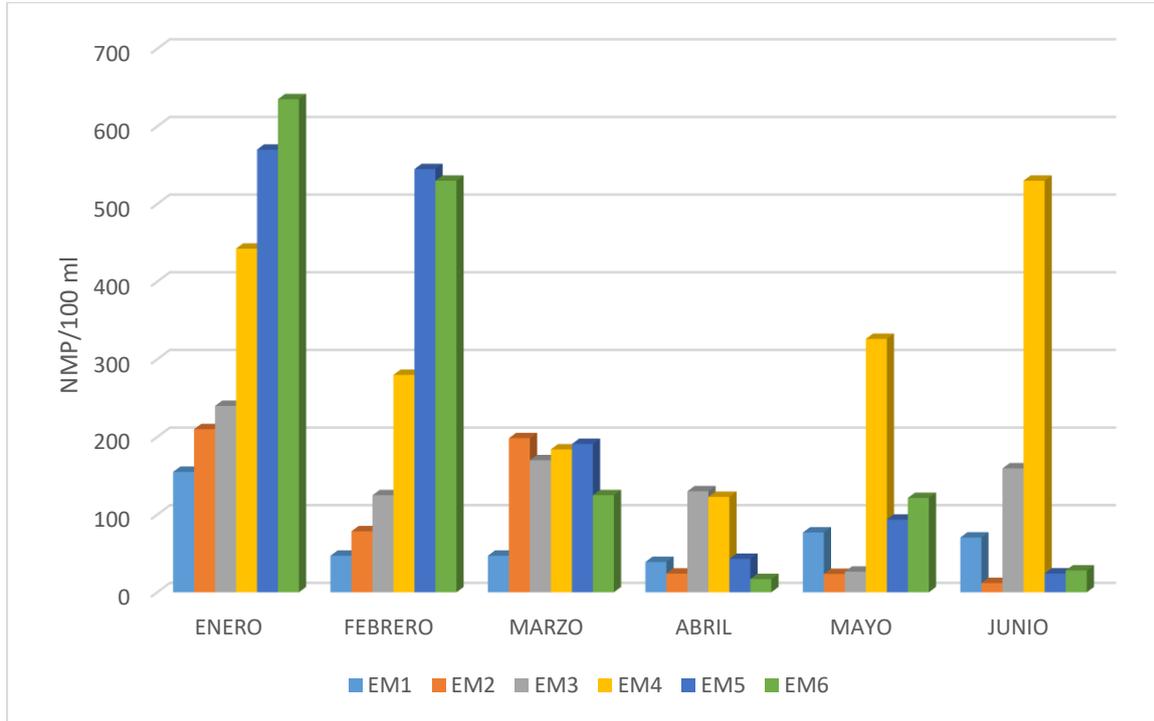
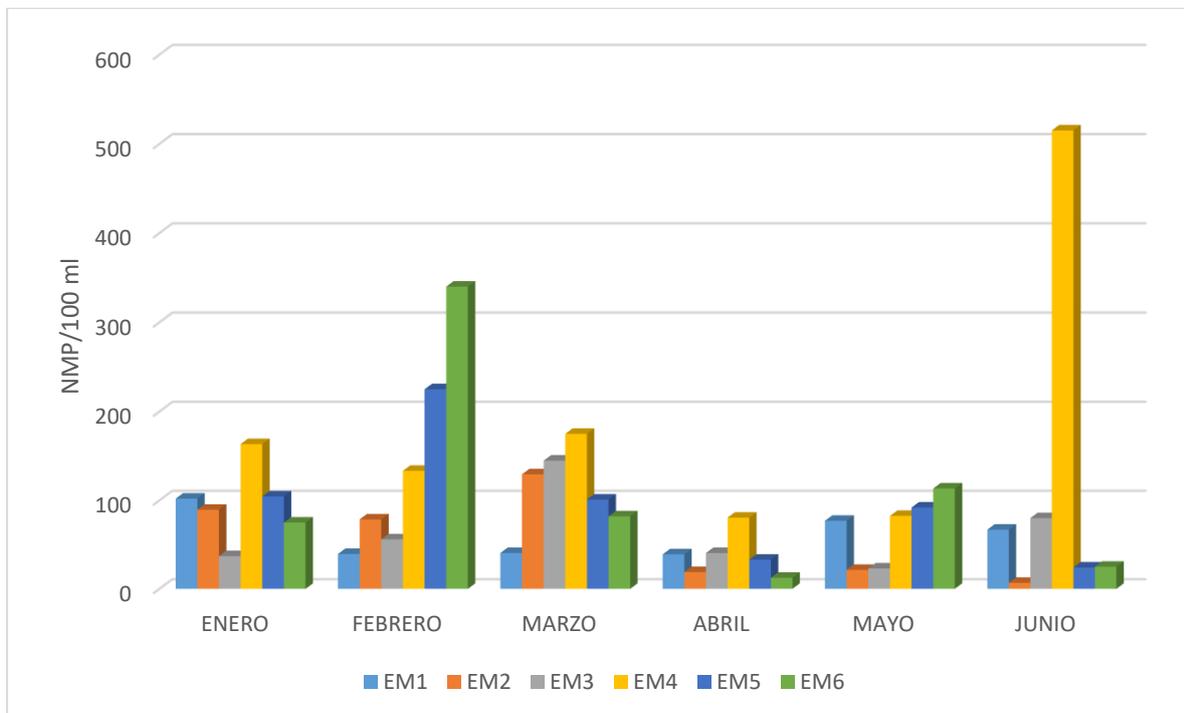


Tabla 18. Promedio de NMP de los coliformes termotolerantes de los seis efluentes.



9.3. Identificar la presencia de *Escherichia coli* en las muestras de agua de los seis efluentes cercano al río Chillón

Después de enumerar los coliformes termotolerantes, se resembró en agar EMB para la identificación de *Escherichia coli*, por lo que se dio mayor atención a las colonias azul a moradas con brillo verde metálico que una característica importante para su reconocimiento.

De las seis estaciones muestreadas se aislaron 55 colonias positivas, por lo que para tener un mejor reconocimiento se le realizaron las pruebas bioquímicas de TSI, CITRATO Y SIM donde solo 28 colonias (51%) eran *Escherichia coli*.



Figura 6. Pruebas bioquímicas positivas para *Escherichia coli*

9.4. Determinar la resistencia de *Escherichia coli* aislado de las muestras de agua de los efluentes cercanos al río Chillón mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.

Se comparó los resultados obtenidos a la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de las muestras de agua de los seis efluentes, utilizando la cepa control ATCC 25922 para relacionar la resistencia o sensibilidad con respecto a cada antibiótico utilizado.

El análisis de susceptibilidad antimicrobiana en las cepas de *Escherichia coli* aisladas demostraron que el 5% del total de las cepas era resistente al menos a uno de los 7 antibióticos. El mayor porcentaje de cepas resistentes (34%) se presentó frente al antibiótico quinolona ciprofloxacino, seguido por 25% y 17% de ceftadizima y ampicilina respectivamente. Además, se identificaron valores de

resistencia intermedia mínima frente a los antibióticos cefuroxima (43%), ampicilina (22%), norfloxacin (21%) y ciprofloxacino y ceftadizima con 7%. Todas las cepas fueron sensibles a la ampicilina.

Ninguna cepa resulto susceptible a menos de 2 antimicrobianos, y el 46% de las cepas fueron susceptibles frente a todos los antibióticos utilizados.

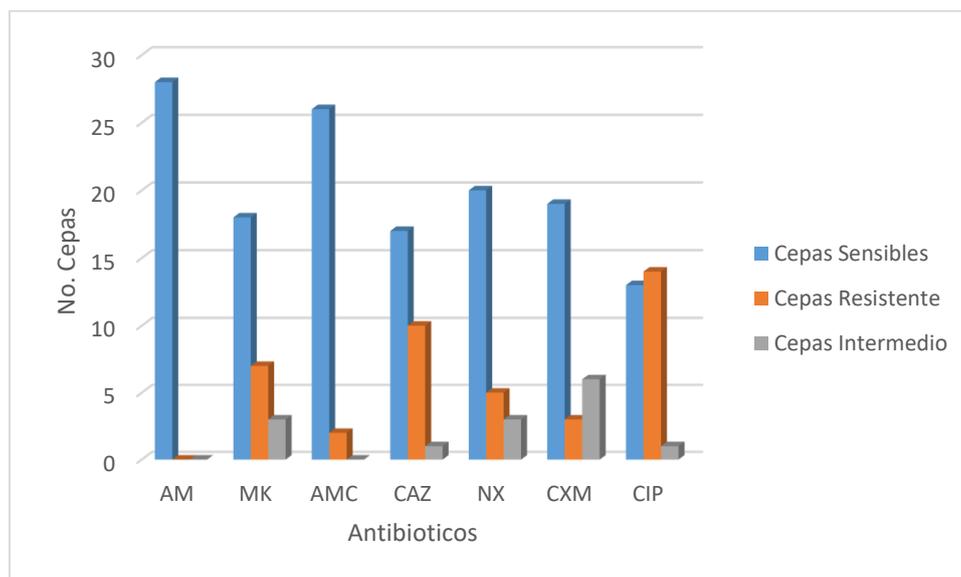
De las 16 cepas resistentes, cinco (32%) mostraron resistencia frente a tres antibióticos o más, por lo que se consideraron multirresistentes (Chandran *et al.*, 2008).

Se obtuvieron 11 patrones de resistencia antimicrobiana, entre ellos 10 cepas expresaron multirresistencia (combinaciones de 3,4 y 5). Los patrones de resistencia más frecuentes fueron CIP con 4 cepas (25%), MK/CIP/CAZ con 3 cepas (19%), el resto de los patrones estuvo integrado por una sola cepa (Tabla 18).

Tabla 19. Patrones de resistencia de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los seis efluentes

<i>Número de antimicrobianos</i>	Patrones de Resistencia	No. de Cepas	Total
1	CIP	4	5
	CAZ	1	
2	CIP+CAZ	1	1
3	CIP+CAZ+MK	3	5
	CIP+CAZ+NX	1	
	CIP+CAZ+CXM	1	
4	CIP+CAZ+CXM+MK	1	4
	CIP+CAZ+NX+AMC	1	
	CAZ+MK+NX+AMC	1	
	CIP+CAZ+MK+NX	1	
5	CIP+CAZ+CXM+MK+NX	1	1

Tabla 20. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de las 28 cepas de *Escherichia coli* aisladas de los seis efluentes.



Con respecto a la inhibición de crecimiento efectuado por 7 antibióticos se tiene de evidencia que el antibiótico Ampicilina (AM) y Cefuroxina(CXM) presentaron los mayores diámetros de halos de inhibición obteniendo la media de 3.38 cm y la mediana de 2.8 cm para AM y para CXM la media 2.85 cm y la mediana 3.1 cm. Por otro lado, la Amicacina presento el menor diámetro del halo de inhibición con una media de 1.96 cm y la mediana fue 2 cm.

Tabla 21. Estadístico asociado a los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* efectuados por su susceptibilidad a 7 antibióticos.

Antibiótico	Diámetro de crecimiento (cm)		
	Media	Mediana	Desviación estándar
MK	1.96	2	0.89
NX	2.45	2.85	1.19
AM	3.38	2.8	1.13
CIP	2.17	1.5	1.57
CAZ	2.23	2.9	1.33
AMC	2.96	3.1	0.72
CXM	2.85	3.1	1.27

9.5. Identificar la presencia de *Clostridium spp.* en las muestras de agua de los seis efluentes según el método de detección de la norma UNE-EN-ISO 14189:2017 modificado

Se sembró las muestras en agar TSC en anaerobiosis, dando colonias de color negra que se debió a que el microorganismo redujo el sulfito del medio a sulfuro, después de 48 horas a 35 °C. Luego, se reactivó las colonias negras en caldo BHI manteniendo la anaerobiosis sellándolo con aceite mineral durante 18h – 24 h. Se observó en el medio las esporas en suspensión de manera diagonal de color blanco.

Después, se resembró las colonias en agar sangre al 4% por duplicado incubándose a 35°C durante 18h – 24 h para observar la hemólisis producida en el medio y realizarse coloraciones Gram para identificar los bacilos Gram positivos esporulados.

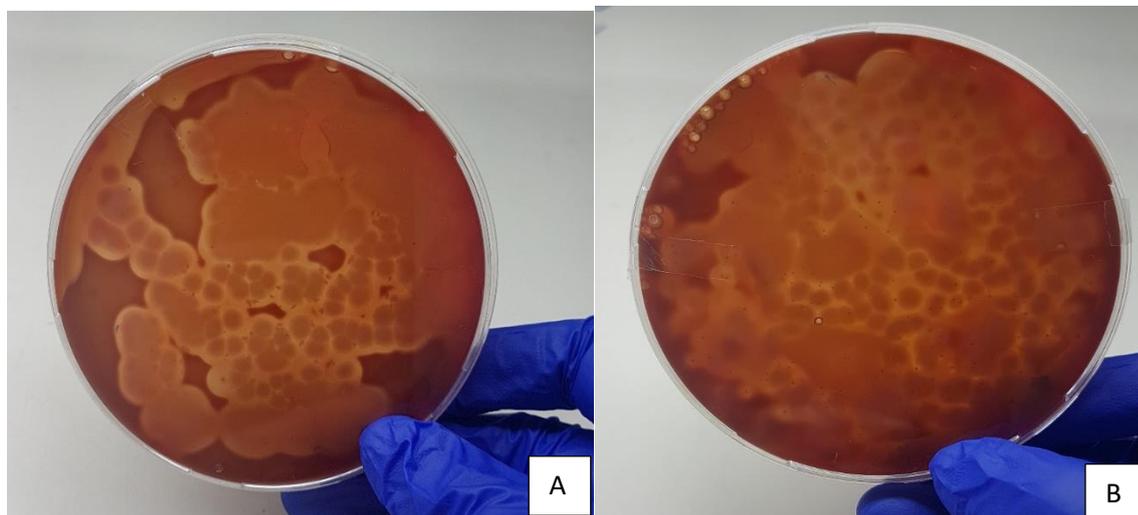


Figura 7. Identificación presuntiva de *Clostridium spp.* mostrando la hemólisis presente en el medio Agar sangre.

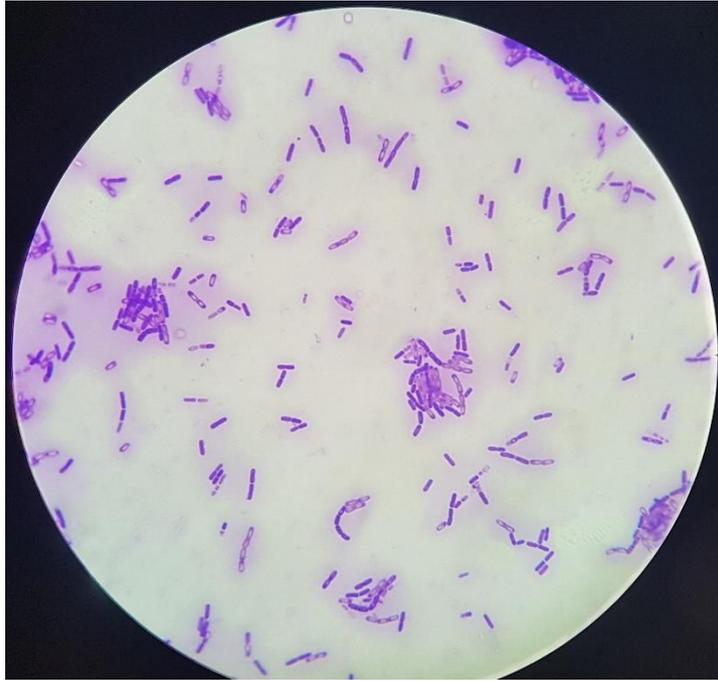


Figura 8. Tinción Gram a partir del medio de agar sangre, donde se observa los bacilos Gram negativos de *Clostridium spp.* y algunas esporas presentes.

X. DISCUSIONES

Se determinó que de las 72 muestras recolectadas de los seis efluentes cercanos al margen del río Chillón durante los meses de enero a junio tenían presencia de enterobacterias. De estas muestras positivas se aislaron 28 cepas lactosa positivas y se determinó mediante pruebas bioquímicas a *Escherichia coli* y a *Clostridium spp.* de manera presuntiva en agar sangre.

Los valores de los parámetros fisicoquímicos se encontraron dentro de los valores permisibles por los ECA's para la categoría III "Riego de vegetales y bebida de animales". Los parámetros de turbiedad, pH, temperatura y conductividad no tuvieron un efecto negativo en el agua debido que la elevación de turbidez fue los días lluviosos y los vertimientos de residuos domésticos en las estaciones de muestreos. Los valores de pH se mantuvieron en el rango de 6.5 a 8.5 sin afectar el crecimiento bacteriano a pesar de tener valor de 8.3 y 8.4 en el mes de febrero y en la estación 4 respectivamente, en cambio Yañes S. (2018) obtuvo valores promedios de pH de 6.98 y 7.32 en los ríos Itambi y Desaguadero respectivamente, correspondiendo a valores ligeramente neutros, estando estos dentro de los valores permisibles por el TULSMA. Los valores promedios de conductividad fueron de 1040 $\mu\text{S}/\text{cm}$ estaban dentro de lo normal a comparación de Massol (2010) que establece que los valores menores a 860 $\mu\text{S}/\text{cm}$ significa que el agua no se encuentra muy contaminada por altas concentraciones de iones disueltos. Las concentraciones de nitratos variaban en lo que respecta a los meses y a los puntos desde los valores de 14 mg/L a 37.8 mg/L, mientras que Yañes S. (2018) tuvo valores relativamente bajos de 4.8 mg/L (Vertiente), 2.53 mg/L (río Itambi) y 2.38 mg/L (Desaguadero) que estuvieron por debajo de los límites respecto a la calidad de agua para la prevención de la vida acuática en agua dulce y estuarios (13 mg/L) debido a los residuos de los fertilizantes y materia orgánica arrojaron en tales puntos. Con respecto a la concentración de cloruros y dureza total los valores promedios estuvieron dentro de la norma sin tener un efecto negativo en las plantas que se cosechan cerca o a la población que vive alrededor.

Los valores de los parámetros microbiológicos encontrados fueron diferentes e incluso inferiores a los determinados por Chávez *et al.* (2016) en la ciudad de Chachapoyas indicando contaminación de la descarga continua de aguas residuales que influye en el contenido microbiano de los ríos Sonche y la quebrada de Santa Lucia. Los valores más altos de los NMP de coliformes totales, coliformes termotolerantes obtenidos en los seis efluentes cercanos al margen del río Chillón tuvieron valores desde 920 NMP/100 ml disminuyendo a 6.8 NMP/100 ml que de mostro en el mes de junio en una estación 2 para coliformes totales, mientras que Chávez *et al.* (2016) tuvo valores desde 33×10^5 NMP/100 ml disminuyendo a 500 NMP/100 ml siendo el mes de agosto que presentó mayor concentración de estos. Asimismo, Romeu B. (2012) tuvo concentraciones de coliformes

termotolerantes en los ríos Almendares, Quibu y Luyanó superiores a 2×10^2 NMP/100ml que son valores máximos permisibles establecidos en la Norma Cubana 22 (1999).

La identificación de *Escherichia coli* se realizó mediante el método convencional por TSI, SIM y citrato donde resultó que se identificó 28 cepas (51%), mientras que Romeu B. (2012) utilizó el sistema VITEK y se identificó 113 cepas (94%) y Benvenuto V. (2017) utilizó el método API identificó 90 cepas (90%), donde el porcentaje de aislamiento de *Escherichia coli* en esta investigación, es un indicativo que los efluentes están siendo sometidos a la contaminación fecal.

Además, se evaluó la resistencia de *Escherichia coli* mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar se compararon los resultados con la cepa control de ATCC 25922, resultando que las cepas aisladas eran resistentes al antibiótico ciprofloxacino, seguido de ceftadizima y ampicilina, estos resultados se apreciaron en el estudio de Romeu B. (2012) donde las cepas de *Escherichia coli* fueron resistentes a la ampicilina, seguido de sulfametoxazol-trimetropina y ciprofloxacino. También, se obtuvo 11 patrones de multiresistencia donde se expresaba mayormente la combinación de ciprofloxacino + ceftadizima, en cambio Yábar *et al.* (2017) con su estudio en urocultivos de pacientes pediátricos y adultos para describir los patrones de resistencia antibiótica de *Escherichia coli* obtuvo que las combinaciones de trimetoprim-sulfametoxazol + ampicilina + ciprofloxacino y norfloxacino se presentaban de manera simultánea, lo que indica que el uso inadecuado de los tipos de antibióticos estaría generando un problema en la salud pública.

Con respecto a la inhibición del crecimiento se evidenció que la ampicilina y la cefuroxina tuvieron mayor diámetro y la amicacina presentó menor diámetro, mientras que en el estudio de Benvenuto V. (2017) fue menor en ampicilina y mayor en ceftadizima y amicacina. Con estos resultados, se evidencia que la *Escherichia coli* aislada debe ser productora de la enzima β -lactamasa de espectro extendido, pues mostró resistencia a la penicilina y cefalosporinas (Castro *et al.*, 2014).

Se identificó esporas de *Clostridium spp* en los seis efluentes muestreados demostrando que los efluentes están contaminados de restos fecales, así como encontró Venegas *et al.* (2014) en su estudio para evaluar la calidad microbiológica del agua para consumo humano y agua residual resultando que tanto en agua de consumo humano y residual encontraron esporas de *Clostridium spp*. por la técnica de filtración por membrana, esto implicó que el consumo de agua fuera un riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que estos microorganismos pueden sobrevivir durante períodos largos y es resistente al cloro. De igual manera Stelma G. (2018) en su revisión sobre el uso de esporas en el monitoreo y calidad en el tratamiento de agua menciona que se evaluó las esporas de *Clostridium perfringens* como indicador de contaminación fecal ya que puede sobrevivir por largo tiempo en esa forma en el ambiente. Además, está relacionado con otros patógenos como virus y protozoo.

XI. CONCLUSIONES

Las concentraciones de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se obtuvieron en los seis efluentes cercanos al margen del Río Chillón, debido a un aporte directo e indirecto de las aguas residuales domésticas e industriales de los centros poblados cercanos que realizan actividades de riego agrícola. Por lo que, los seis efluentes muestreados se encuentran dentro de los valores permisibles por los Estándares de Calidad Ambiental para los parámetros analizados, por otra parte, los efluentes se encuentran contaminados por *Escherichia coli* y *Clostridium spp.* pudiendo causar efectos negativos en la salud de los pobladores y/o animales que viven cerca.

Los parámetros fisicoquímicos analizados en su mayoría no mostraron efectos negativos a lo largo de los seis meses.

Se determinó la presencia de coliformes totales y termotolerantes en todos los puntos de muestreo, donde todos los valores se encontraban dentro de los valores máximos permisibles para la categoría 3 de los ECA's, mientras que *Escherichia coli* solo se encontró en el 51 % de las muestras de las seis estaciones de muestreo.

Se determinó la resistencia de las cepas de *Escherichia coli* el 5% era resistente al menos de los 7 antibióticos, presentando mayor susceptibilidad antimicrobiana a los antibióticos ciprofloxacino, ceftadizima y ampicilina. Además, con respecto a la inhibición de crecimiento los antibióticos que presentaron mayor halo de inhibición fueron AM y CXM, mientras que MK fue el antibiótico con menor diámetro de crecimiento.

Se identificó la presencia de *Clostridium spp* en todas las estaciones de muestreo mediante doble hemólisis en el medio de agar sangre y se observó las esporas por tinción Gram.

XII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar las investigaciones en los efluentes cercanos al río Chillón para la evaluación de la calidad de agua tanto microbiológica como fisicoquímica para orientar a la población cercana sobre su uso tanto doméstico como de riego evitando algún tipo de enfermedades.
- También se recomienda hacer un estudio de la calidad de agua mediante estaciones (verano, invierno, primavera y otoño) y por períodos de lluvia ya que pueden cambiar la calidad del agua.
- Se recomienda utilizar otros métodos de análisis para la determinación de coliformes, *Escherichia coli* y *Clostridium spp.*
- Se recomienda mayor estudio para la presencia de *Clostridium spp.*, que es una bacteria patógena para el humano.

XIII. REFERENCIAS

APHA, AWWA, WEF. 2017. *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. ISSN 55-1979.

Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua y establecen disposiciones complementarias. Decreto Supremo N°004. (7 de junio de 2017). Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú.

Arcos M., Ávila S., Estupiñan S., Gómez A. (2005). *Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua*. Nova. INSSN: 1794-2470, 3 (4), 69 – 79.

Araujo R. & Benito H. (2017). *Nivel de contaminación microbiológica en agua de consumo humano en el Sector de Sequia Alta, Santa Bárbara, Huancavelica*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.

Benítez G. (2013). *Análisis y modelización de la inactivación de Escherichia coli en aguas residuales* (tesis de post grado). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Cabrera A. & García E. (2006). *Identificación de microorganismos indicadores y determinación de puntos de contaminación en aguas superficiales provenientes del Cementerio Jardines del Recuerdo ubicado en el norte de Bogotá*. (tesis pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Calderón G. & Aguilar L. 2016. *Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad*. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII, 621, 757 – 763.

Campaña A., Gualoto E., Chiluisa-Utreras V. (2017). *Evaluación fisicoquímica y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito*. *Bianatura* 2 (2), 305 - 310.

Castro Alarcón N, Salgado González JF, Ocampo Sarabia RL, Silva Sánchez J, Ruíz Rosas M. (2014) *Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por Escherichia coli de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México*. *Rev Tlamati* 5(1):14-23.

Chávez J., Leiva D., Corroto F. (2016). *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas residuales en la ciudad de Chachapoyas, Región Amazonas*. *Cienc amaz (Iquitos)* 6 (1), 16 – 27.

Consortio Agua Azul. (2011). *Procedimiento para efectuar las pruebas de dureza total (LB-P-031)*. Procedimientos del sistema de gestión del Consorcio Agua Azul Versión 03.

Fernández F., Lopez J., Ponce L., Machado C. (2003). *Resistencia bacteriana* (trabajo de revisión). *Revista Cubana Medica Militar*; 32 (1): 44 – 48.

Gesche E., Vallejos A., Sáez M. (2003). *Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Números más probables (NMP)*. *Archivo Médico Veterinario XXXV*, 1, 99 – 107.

González M. (2008). *Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina*. (tesis pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Hernández E., Quiñones E., Cristóbal D., Rubiños J. (2012). *Calidad biológica de aguas residuales utilizadas para riego de cultivos forrajeros en Tulancingo, Hidalgo, México*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, p. 89-95.

Horna G., Silva M., Vicente W., Tamariz J. (2005). *Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacino en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas*. *Revista Médica Herediana*, 16 (1): 39 – 45.

Larrea J., Rojas M., Romeu B., Rojas N., Heydrich M. (2013). *Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura*. *Revista CENIC*, 44 (3), 24 – 34.

Lazcano C. (2014). *Biotecnología Ambiental de Aguas y Aguas Residuales*. Lima - Perú: Fondo Editorial UNMSM.

McCarter Y. (2005). *Modos de Accion de los Antimicrobianos Manual de pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. American Society for Microbiology, p. 3 – 12,

Massol A., (2010) “*Parámetros Físico-químicos*” en *Curso ecología microbiana*. Mayagüez. Recuperadp en: <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/>

Mejía R. (2005). *Análisis de la calidad del agua para consumo humano y percepción local de las tecnologías apropiadas para su desinfección a escala domiciliaria, en la microcuenca El Limón, San Jerónimo, Honduras* (tesis de postgrado). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Tropical Agricultural Research and Higher Education Center. Turrialba, Costa Rica.

Miranda C. y Rojo MD. (Sin fecha). *Clostridium perfringens: Infecciones de piel y tejidos blandos*. *Control de Calidad SEIMC*, p. 1- 10. Recuperado en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Clostper.pdf>

Molleda P., Ansola G., De Luis E. (2005). *Análisis microbiológicos de las aguas residuales tratadas por un humedal artificial de tipo M.J.E.A en León*. Encuentro Internacional en Fito depuración, Lorca, Murcia, España.

Olarte B. (2007). *La Cuenca del río Chillón: Problemática y potencial productivo*. Ingeniería Industrial n°25, 53 – 68.

Organización Mundial de la Salud. (2017) *¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?* [Internet]. Recuperado en: [OMS | ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? \(who.int\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos)

Organización Mundial de la Salud. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Recuperado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2002). *Eliminación de microorganismos por diversos procesos de tratamiento*. CEPIS.

Picazo J, García J., Cantón R., García E., Gomez-Lus M., Martínez L., Rodríguez C., Vila J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad antimicrobianos*. Procedimiento en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.

Reyes C. (2012). *Estudio de la contaminación de las aguas del Río Chillón*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

Romeu B. (2012). *Caracterización de cepas de Escherichia coli de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana* (tesis de doctorado). La Habana, Cuba.

Stelma G. (2018). *Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment*. J Water Health; 16 (4):491 – 500.

Suaréz C. y Gudíol F. (2009). *Antibióticos betalactámicos*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 27 (2), 116 – 119.

Venegas C., Mercado M., Campos M. (2014). *Evaluación de la calidad microbiológica del agua para consumo y del agua residual en una población de Bogotá (Colombia)*. Revista Biosalud, 13 (2), 24 – 35.

Yábar MN, Curi-Pesantes B, Torres CA, Calderón-Anyosa R, Riveros M, Ochoa TJ. (2017). *Multiresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de Escherichia coli provenientes de urocultivos*. Rev Peru Med Exp Salud Publica; 34(4):660-5.

Yáñez S. (2018). *Evaluación de la contaminación del agua mediante parámetros físico químicos en las desembocaduras de los principales afluentes y efluentes del Lago San Pablo, Provincia de Imbabura* (tesis pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

XIV. ANEXOS

Anexo 1. Lista de abreviaturas

Agar EMB - Agar con eosina y azul de metileno

Agar TSC – Agar Triptosa Sulfito Cicloserina

Agar TSI – Agar triple sugar iron

AgNO₃ – Nitrato de plata

AM – Ampicilina

AMC – Amoxicilina/ Acido Clavulánico

Caldo BRILA – Caldo de Bilis de Lactosa Verde Brillante

Caldo BHI – Caldo infusión de cerebro y corazón

CaCO₃ - Carbonato de calcio

Caldo EC – Caldo *Escherichia coli*

Caldo TSA – Caldo Tripteina soya

CAZ - Ceftidizina

CF – Coliformes fecales

CIP - Ciprofloxacino

CMI – Concentración Mínima Inhibitoria

CT – Coliformes totales

CXM - Cefuroxima

ECA – Estándar de Calidad Ambiental

E. coli – *Escherichia coli*

EM – 1 - Estación de muestreo 1

EM – 2 - Estación de muestreo 2

EM – 3 – Estación de muestreo 3

EM – 4 – Estación de muestreo 4

EM – 5 – Estación de muestreo 5

EM – 6 – Estación de muestreo 6

HCl – Ácido clorhídrico

K₂CrO₄ - Dicromato de potasio

mg/L - Miligramos por litro

MK - Amicacina

NaCl - Cloruro de sodio

NCCLS - **National** Committee for Clinical Laboratory Standards

NH₄OH - Hidróxido de amonio

NMP - Números más probables

NTU - Unidades nefelométricas de turbidez

NX - Norfloxacino

pH - Potencial de hidrogeno

UFC - Unidades formadoras de colonias

μS/cm - MicroSiemens/centímetro

Anexo 2. Glosario de términos

Agente infeccioso: un organismo (virus, bacteria, hongo, protozoario o helminto) que sea capaz de producir una infección o una enfermedad infecciosa.

Agua: es un recurso natural imprescindible para la sociedad y se utiliza en casi todas las actividades que el hombre realiza.

Agua ácida: es el agua que tiene un pH menor a 7.

Agua superficial: cualquier tipo de agua que se encuentra discurriendo o estancada en la superficie tales como arroyos, ríos, estanques y embalses (Gray, 1996 mencionado en Cabrera 2006, p. 17).

Agua residual: las aguas que provienen de las diversas actividades humanas y que poseen materiales que no son propios de un agua en condiciones normales, denominados contaminantes, que provocan el deterioro de los cuerpos de agua y la recontaminación de aquellos que puedan llegar a ser vertidas sin un tratamiento previo (Benítez, 2013, p. 2).

Amicacina: es un aminoglucósido semisintético, derivado de la kanamicina, aunque de más amplio espectro antimicrobiano y que se caracteriza por su resistencia a las enzimas inactivadoras de aminoglucósidos. Es activo contra casi todos los bacilos aerobios gramnegativos,

Amoxicilina – Acido Clavulánico: es una asociación de penicilina semisintético (bactericida de amplio espectro) y de molécula inhibidora de β – lactamasas (betalactamasas), transforma en sensibles a amoxicilina a gérmenes productores de β – lactamasas.

Ampicilina: es un antibiótico betalactámicos que es capaz de penetrar la pared de bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y aerobias, interfiriendo con la síntesis de la pared durante la replicación celular.

Anaerobio: son aquellos microorganismos que solo pueden desarrollarse en ausencia de cantidades significativas de oxígeno y bajo condiciones de potenciales redox muy reducidos, por lo tanto, son estrictos en cuantos a sus exigencias de medio ambiente.

Antibiograma: es una prueba microbiológica que realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos.

Antibióticos: son medicamentos utilizadas para la prevención y el tratamiento de las infecciones bacterianas (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Antibióticos betalactámicos: se trata de antibióticos de acciones bactericidas lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad (Suaréz C. y Gudiol F., 2009, p. 116).

Antimicrobiano: cualquier sustancia natural, semi sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo.

Betalactamasas: enzimas producidas por microorganismo que destruyen la actividad de los agentes beta-lactámicos a través de la hidrólisis de la porción del anillo betalactámicos.

Ceftadizima: es una cefalosporina de tercera generación que tiene un alto grado de resistencia a la acción de las betalactamasas y por lo tanto es muy activa contra la gran variedad de microorganismos Gram negativos, incluyendo cepas productoras de penicilinasas.

Cefuroxima: es una cefalosporina de segunda generación que es más activa frente a los microorganismos gram negativos. Inhibe la síntesis de la pared bacteriana al unirse a una proteína específica de la pared.

Ciprofloxacino: pertenece al grupo de la fluoroquinolonas, su acción bactericida se debe a la inhibición de las topoisomerasas necesarias para la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano.

Concentración mínima inhibitoria: es la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C (Horna *et al.*, 2005, p. 41).

Conductividad: La conductividad eléctrica es el recíproco de la resistencia en ohms, medida entre las caras opuestas de un cubo de 1.0 cm de una solución acuosa a una temperatura específica (Rice *et al.*, 2012 mencionado en Fajardo, 2018, p. 24).

Coliformes termotolerantes o fecales: son microorganismos que pueden fermentar la lactosa entre 44 y 45 °C y con capacidad de crecer en presencia de sales biliares (Organización Mundial de la Salud, 1996 mencionado en Cruz, 2006, p. 18).

Coliformes totales: son las Enterobacteriaceae lactosa positivas, incluyendo las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas, de morfología bacilar, fermentan la lactosa con producción de gas cuando son incubadas durante 48 h a 30 – 37 °C, son oxidasa negativa, no forman esporas y tienen actividad enzimática β-galactosidasa (Carrillo, 2008 mencionado en Larrea, 2013, p. 26).

Cloruros: es uno de los aniones inorgánicos principales en el agua natural y residual. La concentración de cloruro es mayor en las aguas residuales que en las naturales, debido a que el cloruro de sodio es común en la dieta y pasa inalterado a través del aparato digestivo (Reyes C., 2012, p. 166).

Clostridium spp.: es un bacilo anaerobio Gram positivo no móvil, esporulado, pueden fermentar azúcares hasta butirato y acetato, son capaces de fermentar proteínas o aminoácidos obteniéndose como producto de fermentación acetato, otros ácidos grasos, NH₃, CO₂ y a veces H₂; pueden producir exotoxinas (Brock, 1998 mencionado en Cabrera, 2006, p. 24).

Dureza total: Es una característica química del agua que está determinada por el contenido de carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos y ocasionalmente nitratos de calcio y magnesio (Mejía M., 2005, p. 65).

Ecosistema: es un sistema que está formado por un conjunto de organismos, el medio ambiente físico en el que viven y las relaciones tanto bióticas como abióticas que se establecen entre ellas.

Efluentes: son las aguas servidas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos que son emitidos por viviendas y/o industrias, generalmente a los cursos de agua o que se incorporan a estas por el escurrimiento de terrenos causado por las lluvias.

Escala de McFarland: el estándar 0.5 de McFarland corresponde a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml. Es usado cuando se ajustan suspensiones del inóculo para pruebas de susceptibilidad.

Escherichia coli: Esta bacteria se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, enzimas β -galactosidasa y β -glucoronidasa. Fermenta la lactosa y el manitol liberando ácido y gas y produce indol a partir del triptófano, no utilizan el citrato como fuente de carbono y no producen acetoina (Rodríguez, 2002 mencionado en Benvenuto, 2017, p. 18).

Espectrofotometría ultravioleta: es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración, utilizándose longitudes de onda de luz.

Estación de muestreo: ubicación geográfica en una zona específica de un cuerpo de agua donde se realiza la toma de muestras de parámetros para determinación de la calidad de agua.

Estándar de Calidad Ambiental (ECA): Tiene como objetivo 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. (Decreto Supremo N°004_2017_MINAM).

Farmacorresistencia: es la disminución de la eficacia de un medicamento específico diseñado para curar una enfermedad o para mitigar los síntomas del paciente.

Fisicoquímica: es la relación entre las propiedades físicas y la composición del sistema para establecer interacciones entre los componentes químicos.

Hemolisis: es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos. Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes.

Hemolisis alfa: se refiere a la lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias en el medio agar sangre (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina).

Hemolisis beta: se refiere a un halo de hemolisis completamente claro en el medio agar sangre.

Homeotermos: son los seres vivos (animales) que mantienen su temperatura corporal dentro de unos límites, independientemente de la temperatura ambiental.

Intermedia: cuando el éxito terapéutico es imprevisible de un antibiótico. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

Inóculo: es la suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.

Límites máximos permisibles: son los valores máximos admisibles de los parámetros representativos de la calidad del agua.

Método Nefelométrico: cuantifica la intensidad de la luz dispersada por la muestra bajo análisis. A medida que aumenta la turbidez aumenta la cantidad de luz dispersa, ocurriendo una dispersión múltiple que disminuye la intensidad de la luz difusa que llega al detector situado a los 90°.

Método electrométrico: se basa en la medida de magnitudes eléctricas básicas (potencial, intensidad de corriente, resistencia o carga) e incluyen una gran variedad de técnicas analíticas que proporcionan valiosa información analítica para resolver muchos tipos de problemas.

Método complexométrico: es una forma de análisis volumétrico basado en la formación de compuestos poco asociados.

Método argentométrico o método de Mohr: es un método usado para valoraciones químicas de cloruros y bromuros con plata, utilizando como indicador el cromato de potasio.

Microbiología: parte de la biología que estudia los microorganismos u organismos microscópicos.

Monitoreo: seguimiento y verificación de parámetros físicos, químicos, microbiológicos u otros.

Multirresistencia: es cuando una cepa bacteriana es resistente a varios antimicrobianos o tipos de antimicrobiano distintos.

Norfloxacin: es un antibiótico sintético del grupo de las quinolonas (fluoroquinolonas) de amplio espectro, siendo el menos activo de las nuevas fluoroquinolonas en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Números más probables: es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible.

Patógeno: es un microorganismo capaz de producir enfermedad o daño a la biología de un huésped sea animal o vegetal.

Parámetros microbiológicos: son los microorganismos indicadores de contaminación y/o microorganismos patógenos para el ser humano.

Parámetros organolépticos: son los parámetros físicos, químicos y/o microbiológicos cuya presencia en el agua pueden ser percibidas a través de percepción sensorial.

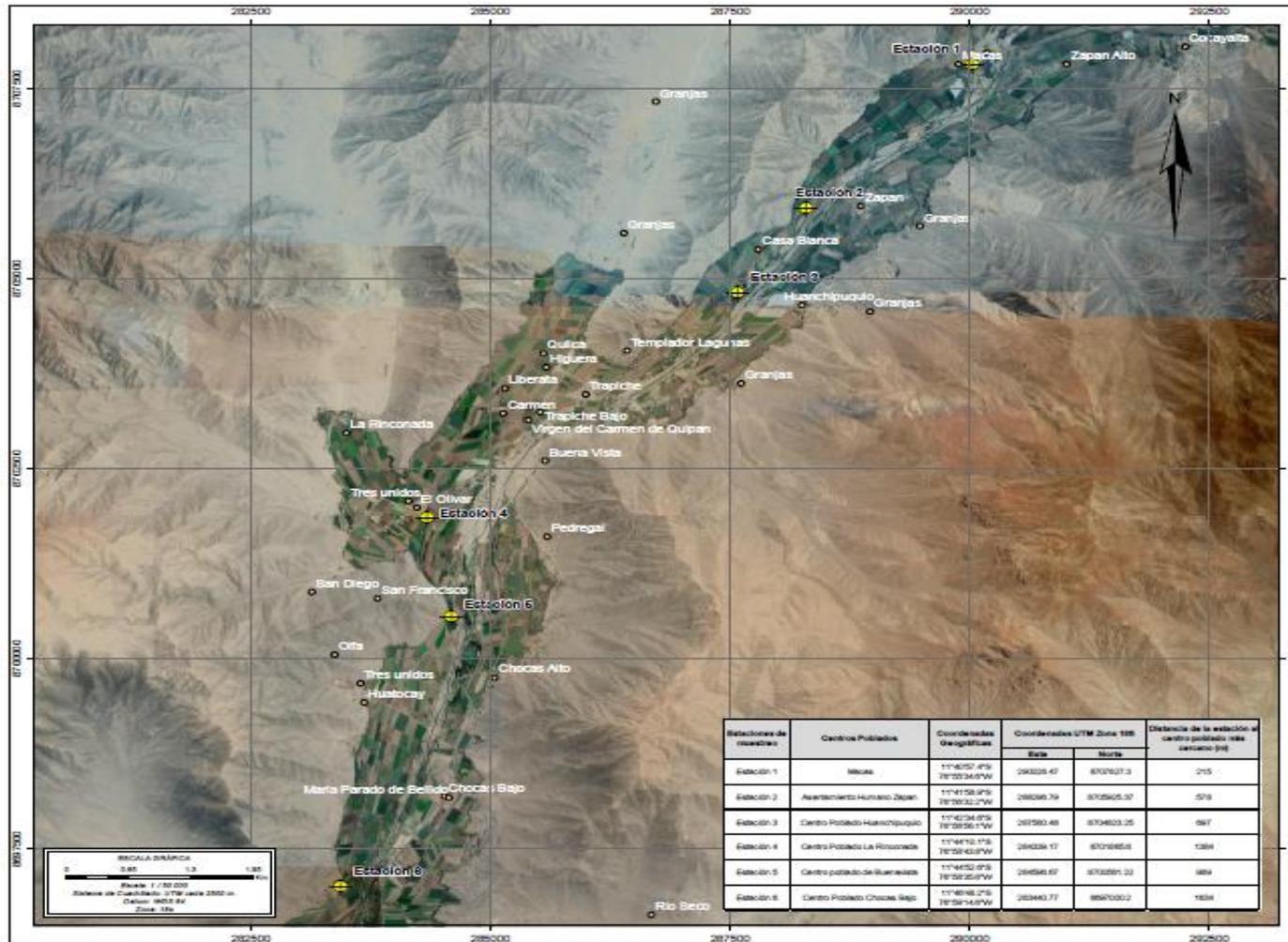
Reactivo de Kovacs: es un reactivo utilizado para la detección de indol por bacterias que poseen una triptofanasa (bacterias Gram negativas), especialmente *Enterobacteriaceae*.

Resistente: Es un término terapéutico, resistencia significa que un microorganismo no es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano que puede alcanzar en un fluido del cuerpo luego de una dosis estándar terapéutica.

Sensible: En términos terapéuticos sensible significa que un microorganismo es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano que puede alcanzar en un fluido corporal luego de una dosis terapéutica

Tubos múltiples de fermentación: Método de análisis que se emplea para la determinación de los Coliformes fecales, basado en pruebas probabilidad, cuyos resultados se expresan en Número más probable – NMP/100 ml. de muestra

Anexo 3. Mapa de la ubicación de las estaciones de muestreo cercanos al Río Chillón



Anexo 4. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias y diámetros del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC 25922 empleados como control de calidad.

Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias ^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC25922 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina ^{a,c}	10	<13	14-16	>17	>32	<8	16-22
	Cefalotina ^{c,d}	30	<14	15-17	>18	>32	<8	15-21
	Cefazolina ^{c,d}	30	<14	15-17	>18	>32	<8	23-29
	Gentamicina ^c	10	<12	13-14	≥ 15	≥8	≤4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	<13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	<11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	<17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	<14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	25-29
	Mezlocilina	75	<17	18-20	≥21	≥128	≤64	23-29
	Ticarcilina	75	<14	15-19	≥20	≥128	≤16	24-30
	Piperacilina	100	<17	18-20	≥21	≥128	≤16	24-30
	Cefamandol	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	26-32
	Cefonicid	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	<14	15-22	≥23	≥32	≤4	20-26
	Cefpodoxima	10	<17	18-20	≥21	≥8	≤2	23-28
	Cefixima	5	<15	16-18	≥19	≥4	≤1	23-27
	Cefoxitina	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Cefotetan	30	<12	13-15	≥16	≥64	≤16	28-34
	Cefmetazol	30	<12	13-15	≥16	≥64	≤16	26-32
	Cefoperazona ^a	75	<15	16-20	≥21	≥64	≤16	28-34
	Cefotaxima ^{a,d}	30	<14	15-22	≥23	≥64	≤8	29-35
	Ceftizoxima ^a	30	<14	15-19	≥20	≥32	≤8	30-36
	Ceftriaxona ^{a,d}	30	<13	14-20	≥21	≥64	≤8	29-35
	Cefepima	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	29-35
	Imipenem	10	<13	14-15	≥16	≥16	≤4	26-32
	Meropenem	10	<13	14-15	≥16	≥16	≤4	28-34
	Amikacina	30	<14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26
	Ciprofloxacino ^{a,c}	5	<15	16-20	≥21	≥4	≤1	30-40
	Levofloxacino	5	<13	14-16	≥17	≥8	≤2	29-37
	Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a,c}	1,25/23,75	<10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32

Tabla 1. (continuación). Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias ^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC25922 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Ceftazidima ^e	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-32
	Aztreonam ^e	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	28-36
	Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18	≥25	≤6	17-25
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	22-30
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	18-26
	Tetraciclina ^c	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	18-25
	Cloranfenicol ^d	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	21-27
D	Carbenicilina	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	23-29
	Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19	≥64	≤16	26-32
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	-
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	28-35
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	29-33
	Loracarbef ^f	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	20-25
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	15-23
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	21-28
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64	22-30

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Para aislamientos de *Salmonella* y *Shigella* spp. debemos ensayar e informar rutinariamente solo ampicilina, una quinolona, y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, el cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación deben ser estudiadas e informadas para *Salmonella* aisladas como causa de infecciones extraintestinales.

b) Además de *E. coli* ATCC25922, estudiar *E. coli* ATCC 35218 cuando se ensayan combinaciones con inhibidores de β-lactamasa. Los intervalos aceptables para *E. coli* ATCC 35218 son los siguientes: amoxicilina/ácido clavulánico de 18 a 22 mm; ampicilina/sulbactam, de 13 a 19 mm; ticarcilina/ácido clavulánico de 21 a 25 mm y piperacilina/tazobactam, de 24 a 30 mm.

c) Puede además ser apropiado para obtener información sobre cepas aisladas del tracto urinario, junto con antimicrobianos del grupo D.

d) Cefalotina representa a cefapirina, cefradine, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozil y loracarbef deben ser ensayados individualmente ya que pueden ser activos aunque la cefalotina no lo sea.

e) Cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* pueden ser resistentes a cefalosporinas y aztreonam mediante producción de β-lactamasas de espectro extendido: a pesar de la aparente sensibilidad "in vitro", algunas cepas pueden ser reconocidas por resultados intermedios o resistentes a ceftazidima y aztreonam (o cefotaxima, cefpodoxima, ceftriaxona y ceftizoxima) y frecuentemente son resistentes a otros antimicrobianos como aminoglicósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas con β-lactamasas de espectro-extendido deben ser informadas como resistentes a las cefalosporinas y al aztreonam.

f) Ciertas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. pueden presentar resultados falsamente sensibles con discos de loracarbef, por lo que los aislamientos de estos géneros no deben ser ensayados frente a este antimicrobiano.

Fuente: Procedimientos en microbiología clínica, 2000

Anexo 5. NMP de los coliformes totales obtenidos de las seis estaciones de muestreo durante los meses de enero y junio de 2019

Coliformes Totales NMP/100ml	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
EM-1	140	47	47	39	140	47
	170	47	47	39	14	94
EM-2	210	110	47	27	21	6.8
	210	47	350	21	26	17
EM-3	350	140	170	220	20	39
	130	110	170	40	33	280
EM-4	220	350	350	26	220	140
	920	280	140	220	25	920
EM-5	220	920	350	47	17	39
	920	170	32	39	170	9.3
EM-6	920	140	140	17	33	24
	350	920	110	17	210	32

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. NMP de coliformes termotolerantes obtenidos de las seis estaciones de muestreo durante los meses de enero a junio de 2019.

Coliformes termotolerantes NMP/100ml	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
EM-1	94	40	47	39	140	40
	110	39	34	39	14	94
EM-2	39	110	39	17	17	4.5
	140	47	220	21	26	9.1
EM-3	40	33	170	47	20	20
	34	79	120	34	26	140
EM-4	47	220	280	21	140	110
	280	47	70	140	25	920
EM-5	39	280	170	40	14	39
	170	170	32	26	170	9.3
EM-6	110	140	94	14	17	24
	40	540	70	11	210	26

Fuente: Elaboración propia