



Aislamiento, caracterización e identificación de enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo

Cusme Vera, Brandon Adolfo y Delgado Quiñonez, Gustavo Harrison

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

16 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	97
Words with Minor Changes	30
Paraphrased Words	352
Omitted Words	1089

Firma:



Firmado electrónicamente por:
SANDRA JUDITH
NARANJO GAYBOR

.....
Naranjo Gaybor, Sandra Judith. PhD.

C. C: 1709384422

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de las Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento, caracterización e identificación de enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo”** fue realizado por los señores **Cusme Vera Brandon Adolfo y Delgado Quiñonez Gustavo Harrison**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto de 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**SANDRA JUDITH
NARANJO GAYBOR**

Naranjo Gaybor, Sandra Judith. PhD.

C. C: 1709384422

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Nosotros, **Cusme Vera Brandon Adolfo y Delgado Quiñonez Gustavo Harrison**, con cédulas de ciudadanía N° 2300312622 y 0805369139, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Aislamiento, caracterización e identificación de enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo”** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto del 2022

Firma

Cusme Vera Brandon Adolfo

C.C.: 2300312622

Firma

Delgado Quiñonez Gustavo Harrison

C.C.: 0805369139



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Nosotros, **Cusme Vera Brandon Adolfo y Delgado Quiñonez Gustavo Harrison**, con cédulas de ciudadanía N° 2300312622 y 0805369139, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento, caracterización e identificación de enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto del 2022

Firma

Cusme Vera Brandon Adolfo

C.C.: 2300312622

Firma

Delgado Quiñonez Gustavo Harrison

C.C.: 0805369139

Dedicatoria

Brandon A. Cusme V.

Este trabajo se lo dedico a Dios y a mi familia por apoyarme a lo largo de mi formación académica y personal, sin su esfuerzo y compañía no hubiera sido posible llegar a la meta.

Siempre parece imposible hasta que se hace

- *Nelson Mandela*

Gustavo H. Delgado Q.

Este trabajo se lo dedico especialmente a mi madre Angelica María Quiñonez Alcívar, a mis hermanos Aland, Stefano, Paul, mi hermana Luhiyana y a mi padre Gustavo Delgado, por apoyarme a lo largo de mi vida y creer en mí, estoy seguro de que sin su apoyo incondicional y su infaltable compañía no hubiera podido alcanzar esta meta.

Agradecimientos

Agradecemos a Sandra Naranjo por aceptar ser nuestra tutora durante el trabajo final de integración curricular y a lo largo de nuestra formación académica ya que nos apoyó incondicionalmente.

Agradecemos a Armando Reyna, Saul Lema, Yulia Cajas, Anabell Urbina y Jaffer Gooty por la enseñanza de sus conocimientos y apoyo en este estudio.

Agradecemos a Pedro Puente, Paola Proaño, Natasha Baer, Pablo Álvarez, Vinicio Uday y Fernando Vinueza por su enseñanza a lo largo de nuestra formación académica.

Agradecemos a Katty Medina, Mariela Valdivieso y Vanessa Armijos por la ayuda en los trabajos de laboratorio.

Agradecemos a Lizabeth Ojeda por la enseñanza de sus conocimientos y donación de reactivos cruciales para el desarrollo de este estudio.

Agradecemos a Evelyn Cobos, Kevin Cando, Hugo Andrade, Mateo Botero, Jefferson Jumbo, Jorge Cueva, Jessica Lapo, Italo Torres y Genesis Dela por sus consejos y su importante ayuda en las prácticas de laboratorio de este estudio, sin ellos hubiera sido imposible cumplir la meta.

Finalmente, a todas las personas quienes fueron parte de nuestra formación académica y nos brindaron una mano, mil gracias.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Lista de figuras.....	12
Lista de tablas.....	13
Lista de abreviaturas	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Antecedentes	17
Planteamiento del problema.....	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19

<i>Objetivo general</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
Capítulo II: Marco teórico.....	20
Agua	20
Tipos de uso del agua.....	22
Tipos y fuentes de contaminación del agua	25
Aguas residuales.....	27
Características físico-químicas y microbiológicas de las aguas residuales	28
Microorganismos presentes en aguas residuales	31
Enterobacterias	32
Clasificación taxonómica y morfología	33
Identificación bioquímica de enterobacterias	34
<i>Prueba de KIA (Kliger Iron Agar)</i>	34
<i>Prueba de oxido-fermentación</i>	35
<i>Prueba de Indol</i>	35
<i>Prueba de catalasa</i>	35
Morfología de las enterobacterias	36
Fármacos antimicrobianos.....	36
<i>Medicamentos antimicrobianos sintéticos</i>	36
<i>Fármacos antimicrobianos naturales: Antibióticos</i>	36
<i>Antisépticos urinarios</i>	38

	10
Resistencia bacteriana.....	38
Mecanismos bioquímicos de resistencia	39
<i>Adquisición de genes de resistencia</i>	39
<i>Modificación del antibiótico</i>	40
<i>Modificación de la molécula diana</i>	40
<i>Acceso restringido a la diana</i>	41
<i>Bombas de flujo</i>	41
Epidemiología y evolución	41
Capítulo III: Materiales y métodos	43
Ubicación geográfica.....	43
Obtención de la muestra.....	43
Conteo de Unidades Formadoras de Colonias y NMP	44
Aislamiento microbiológico	46
Identificación bioquímica.....	48
<i>Prueba de KIA (Kliger Iron Agar)</i>	48
<i>Prueba de Catalasa</i>	48
<i>Prueba de Indol</i>	49
<i>Prueba de óxido/fermentación</i>	50
Caracterización molecular	51
<i>Extracción de ADN</i>	51
<i>Amplificación de subunidad 16s</i>	52

	11
<i>Secuenciación de subunidad 16s</i>	55
<i>Análisis filogenético</i>	55
Resistencia a antibióticos	55
<i>Preparación del inóculo</i>	56
<i>Diseño experimental</i>	56
Capítulo IV: Resultados y discusión	58
Determinación de UFC y NMP	58
Aislamiento microbiológico	59
Identificación bioquímica	62
<i>Tinción Gram</i>	62
<i>Prueba de Catalasa</i>	63
<i>Prueba de Indol</i>	64
<i>Prueba de óxido/fermentación</i>	65
<i>Prueba de KIA (Kliger Iron Agar)</i>	66
Caracterización molecular	67
Resistencia a antibióticos	71
Capítulo V: Conclusiones	82
Capítulo VI: Recomendaciones	83
Capítulo VII: Bibliografía	84

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo hidrológico del agua	21
Figura 2. Distribución de recursos hídricos a nivel mundial	22
Figura 3. Uso del agua doméstica.....	24
Figura 4. Uso del agua en función de las actividades humanas	24
Figura 5. Volumen promedio (m ³ /mes) de consumo de agua potable por hogar a nivel nacional	25
Figura 6. Zona de obtención de la muestra	43
Figura 7. Gráfico lineal en base a NMP/100mL	59
Figura 8. Aislados obtenidos de presuntamente enterobacterias.....	61
Figura 9. Aislados obtenidos teñidos en tinción Gram.....	62
Figura 10. Prueba de catalasa en aislados obtenidos	63
Figura 11. Resultados de prueba Indol	64
Figura 12. Resultados de prueba óxido/Fermentación	65
Figura 13. Resultados de prueba KIA en los aislados obtenidos	66
Figura 14. Amplificación de fragmentos de ADN genómico	67
Figura 15. Esquema de la estructura del gen 16s	69
Figura 16. Diagrama filogenético de los aislados obtenidos	70
Figura 17. Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de ciprofloxacina	74
Figura 18. Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de amoxicilina + ácido clavulánico	75
Figura 19. Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de Trimetoprima/sulfametoxazol	76
Figura 20. Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de Nitrofurantoína	77
Figura 21. Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	78
Figura 22. Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: <i>Shigella flexneri</i>	79
Figura 23. Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: <i>Escherichia coli</i>	80

Lista de tablas

Tabla 1. Usos del agua en función de la demanda.....	23
Tabla 2. Fuentes de contaminación del agua y su incidencia en los seres humanos	26
Tabla 3. Criterios de calidad de agua residual doméstica en el Ecuador	30
Tabla 4. Recursos usados para la obtención de la muestra.....	44
Tabla 5. Recursos usados para la cuantificación de unidades formadoras de colonias y NMP	44
Tabla 6. Recursos usados para el aislamiento microbiológico.....	46
Tabla 7. Recursos utilizados para tinción Gram	47
Tabla 8. Recursos usados para prueba de KIA	48
Tabla 9. Recursos usados para prueba de catalasa	49
Tabla 10. Recursos usados para prueba de Indol.....	49
Tabla 11. Recursos usados para prueba óxido/fermentación	50
Tabla 12. Protocolo de extracción de ADN genómico bacteriano	51
Tabla 13. Recursos utilizados para la amplificación de ADN bacteriano por PCR.....	53
Tabla 14. Componentes para PCR de ADN genómico bacteriano	54
Tabla 15. Condiciones de termociclador para PCR de ADN genómico bacteriano	54
Tabla 16. Equipos y materiales usados para análisis de sensibilidad antibiótica	55
Tabla 17. Factores de estudio del análisis experimental.....	56
Tabla 18. Cuadro de tratamientos en el diseño experimental	57
Tabla 19. Resultados obtenidos a partir de siembra en Petrifilm	58
Tabla 20. Aislados caracterizados mediante siembra en EMB y prueba de KIA	60
Tabla 21. Identificación bioquímica de enterobacterias aisladas	62
Tabla 22. Reporte del porcentaje de identidad de los aislados obtenidos	68
Tabla 23. Análisis de varianza para halo de inhibición (mm)	71
Tabla 24. Prueba de Tukey HSD para factor: Enterobacterias	72
Tabla 25. Prueba de Tukey HSD para factor: Antibióticos	72
Tabla 26. Prueba de Tukey HSD para la interacción AxB: Enterobacterias x Antibióticos	73

Lista de abreviaturas

UFC Unidades formadoras de colonias

NMP Número más probable

L Litros

mL Mililitros

pb Pares de base

μM Micromolar

g Gramos

Kcal/mol Kilocalorías/moles

UP Ultrapura

°C Grados centígrados

DBO Demanda bioquímica de oxígeno

KIA Media Kliger Iron Agar

ANG aguas negras y grises

EMB Eosina azul de metileno agar

MH Medio Mueller Hinton

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

ONU Organización de las Naciones Unidas

OMS Organización Mundial de la Salud

Resumen

La familia *Enterobacteriaceae* está ampliamente distribuida en el medio ambiente, siendo así que especies de los géneros de esta familia son patógenos que causan infecciones gastrointestinales y urinarias son consideradas como principal indicador de contaminación fecal tanto en agua potable, aguas residuales y alimentos, además de tener grupos de bacterias con alta resistencia a antibióticos. Es debido a su importancia que en el presente estudio se tuvo como objetivo principal el aislamiento, identificación y caracterización de enterobacterias de las zonas de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Para el muestreo del estudio se tomaron muestras líquidas en la zona de descarga de la institución, luego del aislamiento, se obtuvieron aislados identificados mediante pruebas bioquímicas, PCR y análisis filogenético. A los aislados obtenidos se les aplicó un análisis de sensibilidad a antibióticos mediante técnica de discos, donde un aislado presentó resistencia antibiótica significativa en comparación a los otros microorganismos aislados. En conclusión, las enterobacterias aisladas (coliformes fecales y *S. flexneri*) presentan resistencia al menos a uno o dos fármacos analizados y se encontraron en concentraciones >2000 NPM/100mL con lo cual no cumple la Norma de Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes Recursos: Agua.

Palabras clave: Enterobacterias, aguas negras y grises, norma ambiental, PCR, resistencia a antibióticos.

Abstract

The *Enterobacteriaceae* family is widely distributed in the environment, so species of the genera of this family are pathogens that cause gastrointestinal and urinary infections and are considered the main indicator of fecal contamination in drinking water, sewage, and food, besides having groups of bacteria with high resistance to antibiotics. Due to their importance, the main objective of the present study was the isolation, identification, and characterization of enterobacteria from the discharge areas of wastewater of the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Santo Domingo. For the sampling of the study, liquid samples were taken in the discharge area of the institution, after isolation, isolates identified by biochemical tests, PCR and phylogenetic analysis were obtained. The isolates obtained were subjected to antibiotic sensitivity analysis by disc technique, where one isolate showed significant antibiotic resistance compared to the other microorganisms isolated. In conclusion, the isolated enterobacteria (fecal coliforms and *S. flexneri*) show resistance to at least one or two drugs analyzed and are found in concentrations >2000 NPM/100mL, which does not comply with the Environmental Quality and Effluent Discharge Standard Resources: Water.

Key words: Enterobacteria, wastewater, environmental regulations, PCR, antibiotic resistance.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó que una de cada 10 personas padece anualmente por la ingesta de alimentos contaminados, de este porcentaje aproximadamente 420000 personas mueren anualmente a causa de estas enfermedades. Los menores de 5 años poseen la tasa de mortalidad más alta siendo 125000 niños que mueren cada año debido a enfermedades producidas por la transmisión de alimentos contaminados. De manera adicional se ha reportado que las regiones con mayor número de enfermedades de transmisión alimentaria son África y Asia Sudoriental (OMS, 2020).

En el Ecuador, según el Ministerio de Desarrollo Urbano y Vivienda (MIDUVI) hasta el año 2000 reportó 1000 muertes infantiles causadas por enfermedades relacionadas a la contaminación del agua y como principal síntoma la diarrea, que corresponde a un síntoma producido por infecciones bacterianas, también se reportaron casos positivos para tifoidea, cólera y hepatitis tipo A (MSP, 2021).

En análisis previos en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, (Naranjo Gaybor & Valdivieso Menéndez, 2022) reportaron que aguas residuales presentan *E. coli* (4000 NMP/mL) y coliformes totales (>20000 NMP/100mL)

Planteamiento del problema

Los coliformes totales son enterobacterias indicadoras de contaminación de agua (<20000 NMP/100mL) en altas concentraciones pueden provocar enfermedades gastrointestinales, los géneros representativos de este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, sin embargo, se han reportado presencia de enterobacterias no coliformes en aguas residuales como es *Salmonella* y *Shigella* (Pulido, 2016).

El agua no apta para consumo humano (contaminada con agentes microbiológicos) es el mecanismo de transferencia de enfermedades que causan alrededor de 485000 muertes por síndrome diarreico agudo anualmente (OMS, 2017). Para el 2020, el 26% de la población mundial es decir 5 800 millones de personas no utiliza un servicio de suministro de agua para consumo gestionado y no contaminado, pese a ello el 50% de los países en vías de desarrollo apenas cuentan con un servicio básico optimo, el 37% cuenta con un servicio de saneamiento y apenas el 30% cuenta con un servicio adecuado para la gestión de residuos (OMS, 2020).

Justificación

Como parte del control biológico se debe caracterizar los microorganismos presentes en todo tipo de aguas debido a que tanto virus, bacterias y ciertos protozoos están presentes como parte de su entorno biológico en el agua, lo que podría considerarse un potencial peligro biológico para la salud. Como parte del diagnóstico que se inició con el proyecto de investigación para determinar la carga contaminante en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, este estudio se justifica con la finalidad de caracterizar molecularmente patógenos a partir de aguas residuales que son descargadas directamente en cuerpos de agua y pueden constituirse en un foco de contaminación y perjuicio para la salud humana.

Hipótesis

- Hipótesis nula (H_{01}): Existe presencia de enterobacterias en un punto de descarga de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.
- Hipótesis nula (H_{02}): Ningún aislado bacteriano presentó resistencia antibiótica frente a los antibióticos estudiados.

- Hipótesis alternativa (Ha_1): No existe presencia de enterobacterias en la toma de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE
- Hipótesis alternativa (Ha_2): Al menos un aislado presentó resistencia antibiótica frente a los antibióticos estudiados.

Objetivos

Objetivo general

- Aislar, caracterizar e identificar enterobacterias provenientes de un punto de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar enterobacterias mediante técnicas microbiológicas.
- Caracterizar molecularmente los aislados obtenidos mediante técnica de secuenciación para determinar su filogenia.
- Analizar la resistencia antibiótica de los aislados obtenidos mediante técnica de antibiograma con discos de sensibilidad.

Capítulo II: Marco teórico

Agua

El agua por su composición química se define como la unión entre dos moléculas de hidrógeno y una de oxígeno, esta sustancia se encuentra en tres estados diferentes que son líquido, gaseoso y sólido. Dentro de las generalidades del agua esta es incolora, sinsabor e inodora. La estructura química del agua se da mediante enlaces covalentes y posee una entalpía de 110,2 Kcal/mol por cada enlace, esto hace que la molécula sea estable en los ciclos biológicos (Feitelson, 2012)

En lo que respecta a las propiedades del agua según (Feitelson, 2012) son las siguientes:

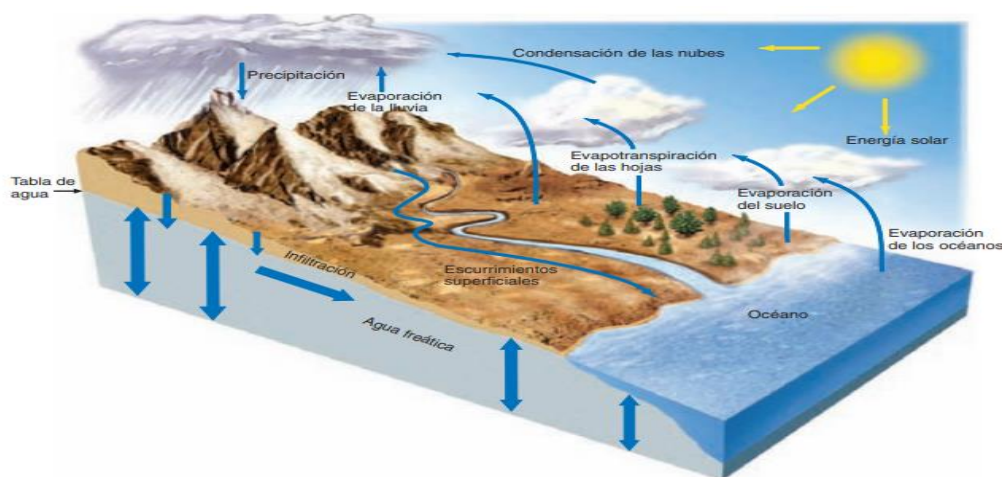
- Punto de ebullición es de 100°C.
- Punto de fusión es de 0°C, esto debido a los enlaces por puente de hidrógeno, el peso de molecular del agua es de 18g/mol.
- Densidad: 1g/mL a 20°C, el agua es un compuesto químico que se expande o contrae en función de la temperatura.
- Tensión superficial: está influenciada por los solutos que se agreguen, ejemplo, mezclar sales con agua aumenta la tensión y esto provoca la capilaridad.
- Propiedades térmicas: la capacidad calorífica del agua es de 1 cal/g°C a 15°C, mientras que el calor latente de fusión es de 80 cal/g y de vaporización es de 540 cal/g debido a estas características el agua se considera un regulador del clima.
- Propiedades eléctricas: el agua alcanza un poder ionizante alto mientras que su conductividad eléctrica es baja en comparación a otros compuestos.

- Propiedades ópticas: esta propiedad depende de la longitud de onda, los rayos UV atraviesan fácilmente la molécula mientras los IR no. Esta propiedad del agua nos permite determinar formas de contaminación.
- Propiedades químicas: el agua al ser molecularmente estable permite realizar múltiples disoluciones de diversos elementos o compuestos. Las reacciones que se dan son de ácido-base, redox, óxidos y haluros. El agua se considera un disolvente universal.

El agua natural como parte de su ciclo se ve expuesta a rayos solares, esto provoca que esta se encuentre en estado gaseoso en la atmósfera. En zonas en donde la altitud se forman diminutas gotas que dan origen a las nubes, éstas a su vez al aumentar de tamaño caen en forma de lluvia y al escurrirse sobre la superficie terrestre forman los ríos. Las aguas subterráneas se forman principalmente por proceso de infiltración y se encuentran en forma de manantiales (Enger *et al.*, 2006).

Figura 1

Ciclo hidrológico del agua

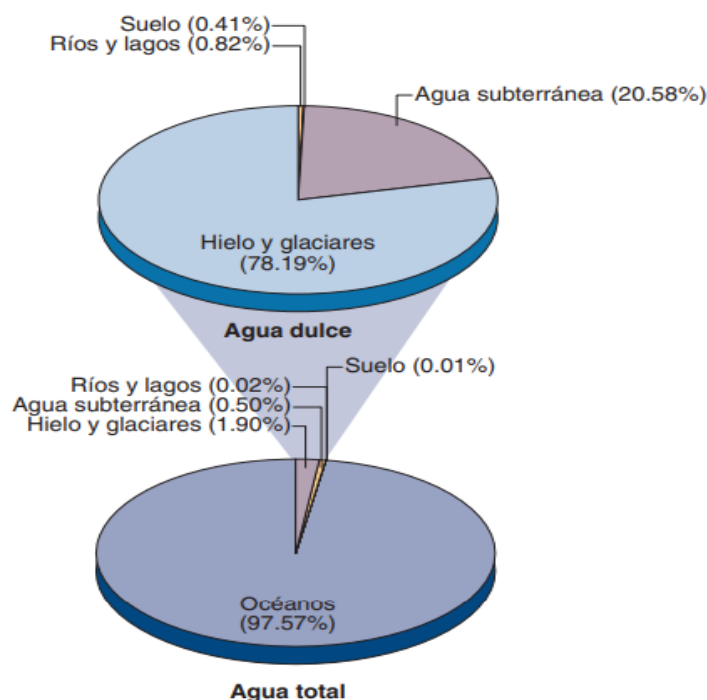


Nota. Patrón continuo del ciclo hidrológico desde su formación en zonas altas sobre el nivel del mar donde se da precipitación hasta su final en el océano donde por rayos solares esta se evapora y existe un reflujó en mencionado ciclo. Tomado de: (Enger *et al.*, 2006).

Según (Enger *et al.*, 2006) el agua ocupa aproximadamente el 70% de la superficie del planeta y esta se localiza en océanos, lagos, ríos, aire y en el suelo.

Figura 2

Distribución de recursos hídricos a nivel mundial



Nota. A pesar de que el 70% de la superficie de la tierra es agua, de esa misma cantidad solamente el 3% es agua dulce apta para consumo humano. Tomado de: (Enger *et al.*, 2006).

Tipos de uso del agua

El ser humano a lo largo de la historia ha influido en el ciclo hidrológico del agua para lograr su sobrevivencia en el planeta. El uso del agua para los seres vivos que habitan el planeta tierra es vital para su supervivencia. Según (Enger *et al.*, 2006) existen dos tipos de uso del agua en función de la demanda y que se detallan en la tabla 1:

Tabla 1

Usos del agua en función de la demanda.

Usos naturales	Usos antrópicos
Mantenimiento de los ríos	Aprovisionamiento doméstico
Plantas	Recreación y Paisajismo
Ecosistemas	Agricultura, ganadería y minería
Transporte de sedimentos	Energía hidroeléctrica e industrias

Nota. Tabla denota los principales usos del agua. Modificado a partir de (Enger *et al.*, 2006).

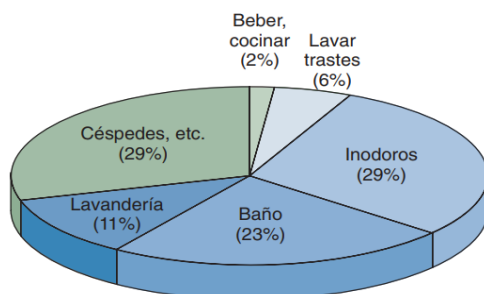
Como se mencionó en la tabla 1, el uso del agua varía dependiendo de la necesidad humana o no, este estudio se enfoca en el uso antrópico, específicamente en el uso doméstico.

Una actividad doméstica se define como cualquiera tarea que se desarrolle en un hogar, en cuanto al uso del agua en el área doméstica o se refiere al uso de inodoros, lavado de ropa, aseo personal y alimentación (Perlman, 2017).

Dentro de los países super desarrollados las actividades domésticas necesitan cantidades considerables de agua. Según (Enger *et al.*, 2006) manifiesta: “cada persona en Norteamérica usa alrededor 400 L al día mientras que el 69% de este se usa como solvente para la eliminación de desperdicios y el 29% para paisajismo”.

Figura 3

Uso del agua doméstica

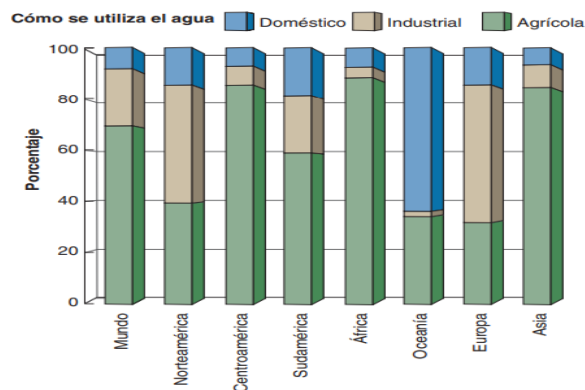


Nota. Uso del agua doméstica por una familia norteamericana. Tomado a partir de: (Enger *et al.*, 2006)

El agua potable al ser utilizada para las diversas actividades domésticas luego de lo cual se convierte en un agua residual con cierta carga contaminante que puede construir un riesgo sanitario las zonas urbanas y rurales por las que pasan estas, a pesar de que dicho uso en comparación a otras actividades humanas es menor.

Figura 4

Uso del agua en función de las actividades humanas

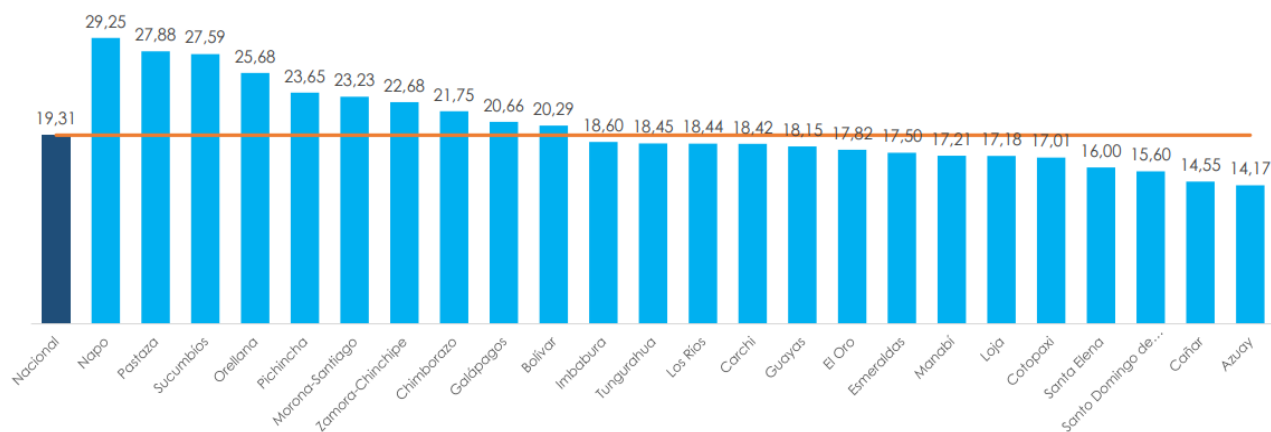


Nota. Uso doméstico del agua es menor a nivel mundial excepto en Oceanía debido a su ubicación geográfica, se observa un mayor uso del agua en el área agrícola. Tomado de: (Enger *et al.*, 2006).

En el año 2020 en el Ecuador se reportó que el promedio de consumo por hogar es de 19,31 m³/mes. En la figura 5 se observa el consumo de agua potable reportado para el año 2020 a nivel de provincias (Agencia de Regulación y Control del Agua del Ecuador, 2021).

Figura 5

Volumen promedio (m³/mes) de consumo de agua potable por hogar a nivel nacional



Nota. El promedio de consumo de agua (m³/mes). Siendo la provincia del Napo la que presenta el mayor consumo (29,25m³/mes). Tomado de: (Agencia de Regulación y Control del Agua del Ecuador, 2021).

Tipos y fuentes de contaminación del agua

Se define como agua residual a todo líquido que ha sido usado por el humano sin tomar en cuenta el tipo de uso antrópico, estas aguas son descargadas en cuerpos de aguas como son ríos, mares y océanos. Estas aguas residuales se forman a partir de desechos domésticos, industriales, residuos fluviales e infiltraciones (Orozco *et al.*, 2002).

La contaminación del agua se puede describir como cualquier agente químico o biológico que ingrese en ésta y altere el ecosistema dejando sin posibilidad de uso humano dicho líquido (Pulido, 2016). Los contaminantes del agua se dividen por categorías, como se describe en la siguiente tabla 2.

Tabla 2*Fuentes de contaminación del agua y su incidencia en los seres humanos*

Contaminante	Fuente	Impacto en los humanos
Ácidos	Deposición atmosférica	Disponibilidad reducida de peces
Cloruros	Escurrimiento de caminos, extracción de petróleo, irrigación	Disponibilidad reducida de agua potable
Organismos causantes de enfermedades	Desechos de aguas residuales tratadas o sin tratar, desperdicios de animales	Costos elevados del tratamiento del agua. Enfermedad y muerte
Temperaturas elevadas	Calor atrapado en las ciudades	Disponibilidad reducida de pescados
Metales pesados	Deposición atmosférica, descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales	Costos elevados de tratamiento del agua. Enfermedad y muerte
Enriquecimiento de nutrientes	Escurrimiento de campos agrícolas, pasturas y tiraderos de aguas industriales	Disponibilidad reducida de mariscos y deterioro de zonas recreativas
Moléculas orgánicas	Paisaje de áreas urbanas y descargas de fábricas químicas	Costos elevados de tratamiento del agua y olores
Sedimentos	Laderas taladas, banco corriente de degradados y construcción de caminos	Abarrotamiento de lagos, corrientes y en depósitos artificiales
Químicos tóxicos	Escurrimiento urbano, descargas industriales y municipales	Costos elevados de tratamiento del agua. Riesgo de cáncer

Nota. Esta tabla enfoca como una principal fuente de contaminación del agua a los organismos causantes de enfermedades, en su mayoría microorganismos (protozoarios, bacterias y virus).

Modificado a partir de (Enger *et al.*, 2006).

Según (Pulido, 2016) menciona que la materia orgánica es un problema significativo en cuanto a la contaminación del agua debido a que esta se descompone y este proceso provoca que dicho líquido no sea apto para consumo humano.

Las fuentes de contaminación se clasifican en dos grupos como lo menciona (Pulido, 2016):

- *Fuente puntual*: Cuando la fuente de contaminación se encuentra en un lugar definido cuando ingresa al agua. Como por ejemplo las tuberías municipales e industriales de descarga (Pulido, 2016).
- *Fuente no puntual*: cuando la fuente es más difícil de identificar y controlar, normalmente provienen del uso agrícola, superficies urbanas, lluvia ácida y escurrimientos (Pulido, 2016).

Aguas residuales

Se definen como todo tipo de agua que posee gran cantidad de contaminantes químicos y biológicos que no son aptas para el consumo humano y que previamente han sido utilizadas o manipuladas por el mismo (Pulido, 2016).

Según (Pulido, 2016) destaca que los tipos de agua residuales se diferencian por su origen como los que se detallan a continuación:

- *Agua residual doméstica*: aquellas aguas que provienen de viviendas, zonas urbanas, comerciales e institucionales. Estas se subdividen en aguas negras (aquellas que son proveniente de inodoros) y aguas grises (aquellas que son jabonosas provenientes de duchas y zonas de aseo personal).

- *Agua residual municipal o urbana:* aquellas aguas provenientes de un conjunto urbano teniendo en cuenta el uso doméstico e industrial. Son transportadas por sistema de alcantarillado.
- *Agua residual industrial:* aquellas aguas que provienen de procesos industriales de uso agrícola, pecuario entre otros.
- *Aguas residuales agrícolas:* aquellas aguas que llegan a partir de zonas rurales agrícolas se caracterizan por contener pesticidas, sales y sólidos en suspensión.
- *Agua de lluvias:* aquellas aguas que son formadas a partir del escurrimiento superficial y que pasan por zonas urbanas y rurales, estas aguas poseen carga contaminante alta debido al arrastre de desechos sólidos y material acumulado en superficie.

Características físico-químicas y microbiológicas de las aguas residuales

El crecimiento microbiológico en el agua está regulado por parámetros físico-químicos. En el tratamiento del agua residual se toma en consideración los siguientes parámetros como punto de partida como lo reporta Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes: Recurso Agua, Registro oficial 387, anexo 9 (MAATE, 2015):

- Coliforme fecales: grupo de coliformes de origen estrictamente intestinal.
- Coliformes totales: grupo de total de coliformes de condición anaeróbica capaces de fermentar carbohidratos. Son usados como indicador de contaminación en agua.
- Materia orgánica: se definen como fracciones de desechos presentes en el agua residual. Está compuesta por carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, restos de origen animal y vegetal; carbohidratos; aceites y grasas y detergentes.
- Oxígeno disuelto: el oxígeno es un indicador de contaminación en el agua ya que este permite la sobrevivencia de organismos superiores.

- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO): es la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos para descomponer una cantidad de materia orgánica determinada.
- Demanda química de oxígeno (DQO): es la cantidad de materia orgánica contenida en un determinado volumen de muestra.
- Sólidos: son desechos contemplados como materia orgánica que pueden estar suspendidos (SS) o disueltos (SD), dentro de este último grupo están los sólidos volátiles (SV) y fijo (SD). Una fracción de los SS se considera como fracción sedimentable (Ssed).
- Potencial de hidrógeno (pH): regula los procesos biológicos en el agua principalmente el crecimiento de organismos vivos tanto indicadores como patógenos presentes en el agua residual.
- Nitrógeno: este elemento forma parte de las estructuras proteicas y sirve como nutriente de algas y ciertas bacterias, este se presenta en forma orgánica, amoniacal o como nitritos y nitratos.
- Fósforo: se considera un bioelemento primario para el crecimiento de los microorganismos sin embargo en grandes cantidades produce eutrofización del agua.
- Metales pesados: su presencia en aguas residuales (concentraciones altas) son un potencial peligro para el ser humano en el ámbito de salud, normalmente proviene de aguas residuales industriales.

En el Ecuador, la Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes al Recurso Agua, Registro 387, anexo 9, establece los límites de descarga de efluentes (recurso: agua) como se detalla en la tabla 3. La norma establece como objetivo “proteger la calidad del recurso del agua para salvaguardar y preservar los usos asignados, integridad de las personas, de los ecosistemas y sus interrelaciones y del ambiente en general” (MAATE, 2015).

Tabla 3*Criterios de calidad de agua residual doméstica en el Ecuador*

Parámetro	Expresado como	Unidad	Criterio de calidad
Aceites y grasas	Película visible	-	Ausencia
Aluminio	Al	mg/L	0,2
Amoniaco	N	mg/L	0,5
Arsénico	As	mg/L	0,1
Bario	Ba	mg/L	1,0
Cadmio	Cd	mg/L	0,01
Cianuro	CN	mg/L	0,2
Cinc	Zn	mg/L	5,0
Cobre	Cu	mg/L	1,0
Color	Color real	Unidades de Co y Pt	75
Compuestos fenólicos	Fenol	mg/L	0,001
DBO a los 5 días	DBO ₅	mg/L	< 2
Materia flotante	Visible	-	Ausencia
Nitratos	N	mg/L	10,0
Nitritos	N	mg/L	1,0
Oxígeno disuelto	OD	mg/L	>60% del OD saturado
Plomo	Pb	mg/L	0,05
pH	pH	-	6-9
Plata	Ag	mg/L	0,05
Selenio	Se	mg/L	0,01
Turbiedad	-	UTN	100,0
Tensoactivos	Reactivos al azul de metileno	mg/L	0,5
Coliformes fecales	NMP	NMP/100mL	2 000
Coliformes totales	NMP	NMP/100mL	20 000

Nota. El siguiente cuadro denota los parámetros físico-químicos y microbiológicos que contempla la norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes al Recurso Agua, Registro 387, anexo 9 en base a los estándares de calidad del agua residual de uso doméstico humano. Modificado a partir de (MAATE, 2015).

Microorganismos presentes en aguas residuales

En las aguas residuales se pueden detectar diversos microorganismos y virus patógenos, estos cumplen una función biológica en el agua. Los hongos en su mayoría se encuentran en aguas residuales de tipo industrial ya que resisten pH bajo y escasez de nutrientes (Orozco *et al.*, 2002).

(Pulido, 2016) afirma que las bacterias permiten la degradación de la materia orgánica y su presencia en cuerpos de agua son un indicador de contaminación, su crecimiento se da en un rango de pH de 6,5 a 7,5. Según (Ryan & Ray, 2010) las bacterias anaeróbicas degradan el oxígeno provocando malos olores en el agua residual ya que estos microorganismos alteran la materia orgánica y minimizan las cantidades de oxígeno disuelto.

Los desechos orgánicos tanto de hogares como de zonas comerciales contienen altas cantidades de población bacteriana como *E.coli* y *S. fecalis*, este tipo de bacterias crecen en el intestino largo de los seres humanos y son evacuados a través de las heces fecales, a estas bacterias se denominan bacterias coliformes fecales pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* (Ryan & Ray, 2010).

Enterobacterias

Las Enterobacterias (del griego “*enterikos*”, perteneciente al intestino) son un grupo amplio y heterogéneo de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el tracto intestinal de los seres humanos y los animales. Las enterobacterias son aerobias o anaerobias facultativas, las cuales fermentan una amplia variedad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja, producen una gran variedad de toxinas y otros factores de virulencia (Riedel et al., 2015).

En esta familia se incluyen muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros). Algunos organismos entéricos, como *Escherichia coli*, forman parte de la microbiota común y causan enfermedades de forma incidental, además, *Escherichia coli* es la bacteria más estudiada y el organismo experimental preferido por muchos microbiólogos.

También existen miembros pertenecientes a las enterobacterias de diferentes géneros que contienen patógenos humanos muy importantes, responsables de diversas enfermedades: *Salmonella*, fiebre tifoidea y gastroenteritis entre estas; *Shigella*, disentería bacilar; *Klebsiella*, neumonía; y *Yersinia*, peste y casos como los miembros del género *Erwinia* que son principales patógenos en plantas de cultivo, causando tizones, marchitamientos y otras enfermedades de las plantas (Willey et al., 2010).

Clasificación taxonómica y morfología

La familia *Enterobacteriaceae* son el grupo más común de bacilos Gramnegativos cultivados en los laboratorios clínicos y, junto con los estafilococos y los estreptococos, se encuentran entre las bacterias más comunes que causan enfermedades. Muchos de los géneros de *Enterobacteriaceae* están compuestos de grupos heterogéneos de especies bacterianas, la mayoría de las cuales se describieron originalmente sobre la base de información morfológica y fenotípica hace varias décadas, por ello, la taxonomía de las Enterobacterias es compleja y ha cambiado mucho, en gran medida por la introducción de técnicas que miden la distancia evolutiva, como como la hibridación de ácidos nucleicos y la secuenciación de ácidos nucleicos (Willey *et al.*, 2010).

Se han definido 63 géneros; de los cuales son clínicamente significativas entre 20-25 especies, mientras que otras especies se encuentran con poca frecuencia. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae tienen las siguientes características: Son bacilos Gram negativos, móviles con flagelos periféricos o no móviles; crecen en medios de peptona o extracto de carne sin añadir cloruro de sodio u otros suplementos; crecen bien en agar MacConkey; crecen de forma aeróbica y anaeróbica (son anaerobios facultativos); fermentan más que oxidan la glucosa (Willey *et al.*, 2010).

La familia puede dividirse en dos grupos en función de sus productos de fermentación, la mayoría (Géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*) llevan a cabo una fermentación ácida mixta y producen principalmente lactato, acetato, succinato, etanol, formato, H₂ y CO₂, a diferencia de los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* y *Klebsiella spp.* Los cuales son fermentadores del butanediol los cuales a su vez lo producen junto a etanol y CO₂. Por ello los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* pueden diferenciarse a nivel de especie mediante una amplia gama de pruebas bioquímicas (Willey *et al.*, 2010).

- *Tinción Gram*: El procedimiento de tinción de Gram comienza con la aplicación de colorantes como: violeta de cristal, solución de yodo y Safranina (u otra contra tinción), además de la aplicación de alcohol como decolorante. Las células Gram-positivas retienen el complejo violeta-cristal y yodo, permaneciendo azules; las células Gram-negativas son completamente decoloradas por el alcohol. Como último paso, se aplica la contratinción (por ejemplo, el colorante rojo safranina) para que las células Gram negativas decoloradas adquieran un color de contraste (Riedel *et al.*, 2015).

Identificación bioquímica de enterobacterias

Prueba de KIA (Kligler Iron Agar)

El Kligler Iron Agar (KIA) se utiliza para la detección de la fermentación de carbohidratos. Las reacciones de la prueba de KIA ayudan a incluir/excluir determinados aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae. Si un organismo no puede fermentar la glucosa, se observa una reacción de alcalinidad (sin cambio) que indica la falta de producción de ácido y el fracaso del organismo en la prueba para fermentar cualquiera de los azúcares presentes. Esta reacción por sí sola es suficiente para excluir un organismo de la familia *Enterobacteriaceae* (Koneman, 2016).

Si el tubo KIA se inocula con un organismo fermentador de la glucosa que no puede utilizar la lactosa, se obtendrá una inclinación con una reacción alcalina (color rojo) y fondo ácido (color amarillo). Si el tubo KIA se inocula con un organismo fermentador de la lactosa, aunque la glucosa se agote por completo después de las primeras 8 a 12 horas, la fermentación continuará ya que el organismo es capaz de utilizar la lactosa por ello se obtendrá que tanto la inclinación como el fondo dará lugar a una reacción ácida (color amarillo) (Koneman, 2016).

Prueba de oxido-fermentación

Para la prueba de oxido- fermentación se utiliza el medio de oxidación-fermentación, Hugh-Leifson. Este medio se utiliza para diferenciar bacterias Gram negativas, como *Vibrio spp.*, basándose en la determinación del metabolismo oxidativo y fermentativo de los carbohidratos. El medio contiene peptona, un sustrato de hidratos de carbono, y azul de bromotimol. Las bacterias que fermentan los hidratos de carbono vuelven el medio amarillo (Jorgensen *et al.*, 2018).

Prueba de Indol

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptófano son capaces de escindir el triptófano, produciendo así indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol puede detectarse en el medio de prueba del triptófano observando el desarrollo de un color rojo tras añadir una solución que contenga *p*-dimetilaminobenzaldehído (por ejemplo, el reactivo de Ehrlich o de Kovacs) (Koneman, 2016).

Prueba de catalasa

La prueba de catalasa es un ensayo común utilizados para caracterizar las bacterias, estas pruebas pueden utilizarse para discriminar las bacterias entéricas de muchas otras Gammaproteobacterias. La prueba de la catalasa analiza la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno y se encuentra habitualmente en las bacterias capaces de crecer en presencia de oxígeno. Generalmente las enterobacterias son oxidasa-negativas y catalasa-positivas (Koneman, 2016).

Morfología de las enterobacterias

Las *Enterobacteriaceae* son varillas o cocobacilos que van desde 0,3 a 1,0 μm de ancho hasta 0,6 a 6,0 μm de largo, Gram negativos. La morfología típica se observa en el crecimiento en medios sólidos *in vitro*. En especies de *Klebsiella* las cápsulas son grandes y regulares (Cappuccino & Welsh, 2018).

Fármacos antimicrobianos

Los medicamentos antimicrobianos son compuestos que matan o controlan el crecimiento de los microorganismos en el huésped (*in vivo*). Los fármacos antimicrobianos eficaces presentan una toxicidad selectiva; inhiben o matan a los patógenos sin afectar negativamente al huésped. Los medicamentos antimicrobianos se clasifican en función de su estructura molecular, su mecanismo de acción y su espectro de actividad antimicrobiana. Los agentes antimicrobianos se dividen en dos grandes categorías: los antimicrobianos sintéticos y los antibióticos (Madigan *et al.*, 2009).

Medicamentos antimicrobianos sintéticos

Los medicamentos antimicrobianos sintéticos incluyen análogos del factor de crecimiento que interfieren en el metabolismo microbiano y las quinolonas que interfieren con el empaquetamiento del ADN en las bacterias (Brown & Smith, 2017).

Fármacos antimicrobianos naturales: Antibióticos

Los antibióticos son agentes antimicrobianos producidos por microorganismos. Los antibióticos son producidos por una variedad de bacterias y hongos (Eukarya), funcionan inhibiendo o matando a otros microorganismos. Se conocen miles de antibióticos, pero menos del 1% son clínicamente útiles, a menudo por problemas de toxicidad en el huésped o por falta de captación por parte de las células del huésped (Madigan *et al.*, 2009).

Sin embargo, los antibióticos clínicamente útiles han tenido un impacto espectacular en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos naturales a menudo pueden ser modificados artificialmente para mejorar su eficacia siendo estos conocidos como antibióticos semisintéticos (Madigan *et al.*, 2009).

Existe una susceptibilidad individual de ciertos microorganismos la cual varía significativamente en base a agentes antimicrobianos específicos. Las bacterias grampositivas y las gramnegativas difieren en su susceptibilidad a un antibiótico individual como la penicilina; las bacterias grampositivas suelen verse afectadas, mientras que la mayoría de las bacterias gramnegativas son naturalmente resistentes (Madigan *et al.*, 2009).

- *Quinolonas*: Las quinolonas son análogos sintéticos del ácido nalidíxico. El modo de acción de todas las quinolonas implica la inhibición de la síntesis del ADN bacteriano mediante el bloqueo de la ADN girasa y la topoisomerasa IV (Riedel *et al.*, 2015).
- *Antibióticos β -Lactámicos*: Los antibióticos β -lactámicos son inhibidores de la síntesis de la pared celular que incluyen las penicilinas y cefalosporinas de importancia médica. Estos antibióticos comparten un componente estructural característico, el anillo β -lactámico. En conjunto, los antibióticos β -lactámicos representan más de la mitad de todos los antibióticos producidos y utilizados en todo el mundo (Madigan *et al.*, 2009).
- *Sulfonamidas y trimetoprima*: El mecanismo básico de acción de todos estos compuestos es la inhibición competitiva de la utilización del ácido *p*-aminobenzoico. El uso simultáneo de las sulfonamidas con la trimetoprima da lugar a la inhibición de pasos metabólicos secuenciales y a un posible sinergismo antibacteriano (Riedel *et al.*, 2015).

Antisépticos urinarios

Son fármacos con efectos antibacterianos limitados a la orina. No producen niveles significativos en los tejidos y, por tanto, no tienen ningún efecto sobre las infecciones sistémicas. Sin embargo, reducen eficazmente el recuento de bacterias en la orina y, por tanto, disminuyen en gran medida los síntomas de la infección del tracto urinario inferior (Brown & Smith, 2017).

Los siguientes son antisépticos urinarios de uso común: nitrofurantoína, fosfomicina, ácido nalidíxico, metenamina mandelato y el hipurato de metenamina. La nitrofurantoína es activa contra muchas bacterias, pero puede provocar trastornos gastrointestinales (Riedel *et al.*, 2015).

Resistencia bacteriana

La resistencia adquirida a los medicamentos antimicrobianos es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un agente antimicrobiano al que normalmente es susceptible, dicha resistencia antimicrobiana es normalmente adquirida gracias al resultado de procesos bioquímicos codificados por genes bacterianos. No existe agente antimicrobiano que tenga la capacidad de inhibir a todos los microorganismos, además, alguna forma de resistencia a los medicamentos antimicrobianos es una propiedad inherente de prácticamente todos los microorganismos (Madigan *et al.*, 2009).

La resistencia generalizada a los medicamentos antimicrobianos se transmite habitualmente por transferencia horizontal de genes entre los microorganismos, siendo así que la mayoría de las bacterias resistentes a los fármacos contienen genes de resistencia a los fármacos localizados en plásmidos R de transmisión horizontal en lugar de en el cromosoma (Brown & Smith, 2017).

Mecanismos bioquímicos de resistencia

Adquisición de genes de resistencia

La mayoría de los agentes antimicrobianos son productos naturales o derivados de productos naturales. Por lo tanto, los genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos deben existir en el mundo microbiano, ya sea en las especies que producen el antibiótico o dentro de las especies que viven en el mismo nicho ecológico que el productor del antibiótico (Jorgensen *et al.*, 2018).

Las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos que promueven el intercambio de genes, siendo la más sencilla de estas técnicas la transformación natural, la cual es la capacidad de algunas especies bacterianas de absorber moléculas de ADN desnudas del medio ambiente en las circunstancias adecuadas. Una vez tomadas dichas moléculas de ADN por la bacteria susceptible, estos trozos de ADN extraños entran en el cromosoma bacteriano recombinándose a través de regiones con suficiente homología (Jorgensen *et al.*, 2018).

En algunos casos, los genes funcionales resultan de esta recombinación, si el gen adquirido codifica una proteína que es menos susceptible a la inhibición que la proteína nativa, puede producirse una reducción de la susceptibilidad (Jorgensen *et al.*, 2018).

Sin embargo, la mayoría de las bacterias son incapaces de transformarse de forma natural, por lo que han desarrollado otros mecanismos para adquirir determinantes genéticos útiles. Un mecanismo comúnmente empleado para el intercambio genético es la transferencia de plásmidos conjugativos. Estas formas de ADN replicativo extra cromosómico pueden llevar una variedad de genes importantes, Algunos plásmidos son relativamente limitados en su gama de huéspedes, mientras que otros se transfieren y replican dentro de varias especies diferentes (Jorgensen *et al.*, 2018).

Las bacterias también aprovechan los virus bacterianos (bacteriófagos) para el intercambio genético. Estos paquetes discretos entregan a las células no infectadas una cantidad de ADN que se aproxima al tamaño de su genoma, los cuales están diseñados para incorporar su propio genoma en la cabeza del fago fabricado, a veces incorporan trozos de ADN cromosómico adyacente al sitio de integración del fago (transducción especializada) y otras veces incorporan un plásmido de tamaño adecuado o un segmento de ADN cromosómico no relacionado con el genoma del fago integrado (transducción generalizada) (Jorgensen *et al.*, 2018).

Modificación del antibiótico

Se han descrito muchas enzimas modificadoras de antibióticos, como las β -lactamasas, las AME y las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT). Estas enzimas en muchos casos son adquiridas, aunque hay casos en los que son intrínsecas de ciertos géneros (Jorgensen *et al.*, 2018).

Las enzimas modificadoras en general confieren altos niveles de resistencia contra los antibióticos, sin embargo, existen algunos antibióticos parecen ser inmunes a las enzimas inactivadoras (Jorgensen *et al.*, 2018).

Modificación de la molécula diana

La interacción de los antibióticos con las moléculas diana por lo general son bastante específicas, pequeñas alteraciones de la molécula diana pueden tener efectos importantes en la unión del antibiótico. Existen numerosos ejemplos de modificación de la diana de los antibióticos como mecanismo de resistencia, como las numerosas metilasas ribosomales de eritromicina que confieren resistencia a la clase de antibióticos macrólidos-lincosamida-estreptogramina B (MLSB) (Jorgensen *et al.*, 2018).

Acceso restringido a la diana

Es un axioma que un antibiótico debe llegar a su objetivo para ser eficaz. Por lo tanto, en el caso de las dianas para las que el antibiótico debe atravesar barreras, el refuerzo de estas barreras puede ser un mecanismo de resistencia muy eficaz. Todas las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que debe ser atravesada antes de poder alcanzar la membrana citoplasmática (Jorgensen *et al.*, 2018).

Bombas de flujo

Se han descrito varias clases de bombas para las bacterias Gram positivas y/o Gram negativas. Pueden ser bastante selectivas o tener una amplia especificidad de sustrato. La mayoría de estas bombas se localizan en la membrana citoplasmática y utilizan la fuerza motriz de protones para impulsar el flujo de fármacos (Jorgensen *et al.*, 2018).

Según (Jorgensen *et al.*, 2018) Las principales familias de transportadores de flujo son:

- La superfamilia de facilitadores principales (MFS), que incluye QacA y NorA/Bmr de las bacterias Gram-positivas y EmrB de *E. coli*.
- La familia de resistencia a múltiples fármacos, que incluye Smr de *S. aureus* y EmrE de *E. coli*.
- La familia de resistencia a la división celular (RND), que incluye AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa*.

Epidemiología y evolución

Las *Enterobacteriaceae* están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, y muchas especies del género son patógenos comúnmente reconocidos, situándose sistemáticamente entre los 10 principales organismos observados en las infecciones asociadas a la atención sanitaria (Jorgensen *et al.*, 2018).

Según (Jorgensen *et al.*, 2018) “En Estados Unidos, entre 2009 y 2010, se registraron 69 475 infecciones asociadas a la atención sanitaria y 81 139 patógenos en 2 039 hospitales el 80% de los aislamientos pertenecían a uno de los ocho grupos de patógenos”

Casi el 20% de estos ocho grupos de patógenos eran fenotipos multirresistentes:

- *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (8,5%)
- *Enterococcus* resistente a la vancomicina (3%)
- *K. pneumoniae-K. oxytoca* resistente a las cefalosporinas de espectro extendido (2%)
- *Enterobacter spp.* (2%)
- *P. aeruginosa* resistente a los carbapenemes (2%)
- *Enterobacter spp.* (<1%)

Capítulo III: Materiales y métodos

Ubicación geográfica

El presente estudio se desarrolló en la Universidad de las Fuerzas Armadas Sede Santo ubicada en Av. Quevedo kilómetro 24 (sentido Santo Domingo-Quevedo) a 1km de la parroquia Luz de américa, Santo Domingo, Ecuador.

Figura 6

Zona de obtención de la muestra



Nota. Fotografía tomada mediante vía aérea (dron) en de zona de descarga de desechos líquidos de aguas negras y grises de la fase 1A de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Fotografía tomada de (Naranjo Gaybor & Valdivieso Menéndez, 2022).

Obtención de la muestra

Se realizó la obtención de muestras líquidas provenientes del punto de descarga de aguas negras y grises provenientes del edificio administrativo de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Sede Santo Domingo el 10 de marzo del 2022 (localización de la toma de muestra, véase figura 6). Se tomó 1000mL de muestra líquida en un recipiente de propileno estéril.

Tabla 4*Recursos usados para la obtención de la muestra*

Materiales/Insumos	Muestra
Recipiente de propileno estéril	
Guantes de nitrilo	Muestra líquida de aguas residuales
Traje de protección	

Nota. Protocolo de obtención de muestra obtenido de (Fadare *et al.*, 2020).

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias y NMP

Se realizó diluciones seriadas en agua de peptona (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) de la muestra líquida, posteriormente en cámara de flujo se inocularon con 1 mL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} respectivamente a placas de petrifilm 3M™ para recuento de coliformes, posterior se inoculó y se incubaron las muestras a 37 °C durante 24 horas, los recursos utilizados se detallan en la tabla 5.

Tabla 5*Recursos usados para la cuantificación de unidades formadoras de colonias y NMP*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	Peptona
Autoclave	Puntas estériles	Petrifilm coliformes
Incubadora	Micropipeta	
	Lámpara de alcohol	

Nota. Protocolo utilizado por (Cappuccino & Welsh, 2018).

Para el conteo de unidades formadoras de colonias se utilizó la siguiente ecuación propuesta por (Dib *et al.*, 2018):

$$UFC/mL = \frac{A}{B} \times F$$

Donde:

- UFC = Unidades formadoras de colonias
- A = Número de colonias observadas
- B = Volumen de inoculación (mL)
- F = Factor de dilución

Para la cuantificación del número más probable (NMP) se aplicó la fórmula propuesta en la norma ISO 4831 para conteo de colonias petrifilm 3M (coliformes totales).

$$\log NMP = \frac{\log UFC - F1}{F2}$$

Donde:

- NMP = número más probable de microorganismos presentes en un volumen de muestra dado.
- UFC = unidades formadoras de colonias presentes en un volumen de muestra dado.
- F1 = factor de conversión (0,37)
- F2 = factor de conversión (0,90)

Aislamiento microbiológico

Se realizó diluciones seriadas en agua de peptona (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) de la muestra líquida. Posteriormente en cámara de flujo se inoculó por triplicado con 1 mL de cada dilución en placas con medio selectivo y diferencial MacConkey agar TM Media, esto se incubó a 37°C por 24 horas.

A partir de las placas que mostraron crecimiento, se tomaron colonias con crecimientos diferentes entre sí para luego subcultivarlas en placas de Agar con eosina y azul de metileno (EMB), las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas, después del tiempo de incubación, se seleccionaron colonias de brillo metálico verde y colonias de color rosa a púrpura oscuro, luego las bacterias seleccionadas fueron purificadas utilizando agar nutritivo como menciona (Fadare *et al.*, 2020).

Tabla 6

Recursos usados para el aislamiento microbiológico

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Cámara de flujo laminar	Frascos tapa rosca	Peptona
Autoclave	Asa de inoculación	Agar EMB
Plancha de calentamiento	Tubos de ensayo	Agar MacConkey
Balanza analítica	Puntas estériles	Agar Nutriente
Incubadora	Micropipeta	
	Parafilm	

Nota. Protocolo de aislamiento microbiológico obtenido de (Fadare *et al.*, 2020).

De los aislados obtenidos, se realizó tinción Gram para determinar la morfología de estos, los recursos utilizados se detallan en la tabla 7.

Tabla 7

Recursos utilizados para tinción Gram

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Microscopio óptico	Lámpara de alcohol	Lugol
Soporte	Asa de inoculación	Alcohol cetona
	Porta objeto	Safranina
	Gotero	Cristal violeta

Nota. Metodología aplicada por (Bou *et al.*, 2011).

Se colocó la muestra en portaobjeto. Luego se colocó 2 gotas de cristal violeta y se esperó un minuto y se realizó un lavado con agua destilada, luego se colocó 2 gotas de solución de yodo, se esperó un minuto y se realizó un lavado con agua destilada, luego se colocó alcohol cetona, se realizó un lavado con agua destilada después de 30 segundos. Por último, se colocó 2 gotas de safranina durante un minuto y se lavó con agua destilada (Bou *et al.*, 2011).

Identificación bioquímica

Prueba de KIA (Kliger Iron Agar)

Los aislados se inocularon en tubos de ensayo que contenían medio Kliger Iron Agar TM Media, esto se incubó a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se registró resultados.

Tabla 8

Recursos usados para prueba de KIA

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Cámara de flujo laminar	Frascos tapa rosca	Kliger Iron Agar
Autoclave	Asa de inoculación	
Plancha de calentamiento	Tubos de ensayo	
Balanza analítica	Lampara de alcohol	
Incubadora		

Nota. Metodología aplicada por (Bou *et al.*, 2011)

Prueba de Catalasa

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en portaobjetos, posteriormente con un asa microbiológica se inoculó una colonia bacteriana en la sustancia y se esperó 10 segundos para observar el desprendimiento de burbujas como detalla (Bou *et al.*, 2011).

Tabla 9*Recursos usados para prueba de catalasa*

Materiales/Insumos	Reactivos
Portaobjetos	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Lámpara de alcohol	

Nota. Metodología aplicada por (Bou *et al.*, 2011)

Prueba de Indol

Se inoculó los aislados en agua de peptona, los tubos se incubaron por 24 horas a 37 °C. Luego se colocó 10 gotas de reactivo de Kovacs a cada tubo inoculado, posteriormente se registró resultados.

Tabla 10*Recursos usados para prueba de Indol*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Cámara de flujo laminar	Frascos tapa rosca	Reactivo de Kovacs
Autoclave	Asa de inoculación	Peptona
Plancha de calentamiento	Tubos de ensayo	
Balanza analítica	Gotero	
Incubadora	Lámpara de alcohol	

Nota. Metodología aplicada por (Bou *et al.*, 2011)

Prueba de óxido/fermentación

Se inoculó 2 tubos de ensayo por cada aislado en medio Hugh-Leifson agar TM Media, los dos tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, uno en condiciones aerobias y otro en anaerobias.

La prueba de óxido/fermentación permite identificar bacterias que puedan oxidar o fermentar azúcares como lactosa, glucosa, sacarosa entre otros como lo menciona (Bou et al., 2011).

Tabla 11

Recursos usados para prueba óxido/fermentación

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos
Cámara de flujo laminar	Frascos tapa rosca	Medio Hugh-Leifson
Autoclave	Asa de inoculación	
Plancha de calentamiento	Tubos de ensayo	
Balanza analítica	Lámpara de alcohol	
Incubadora	Parafilm	

Nota. Metodología aplicada por (Bou *et al.*, 2011).

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Tabla 12

Protocolo de extracción de ADN genómico bacteriano

Equipos	Insumos	Reactivos
Microcentrífuga	Micropipetas	Fenol saturado en Tris-HCl
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica	Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1)
	Gradilla	Acetato de sodio 3M
		SDS 20%
		Isopropanol
		Buffer TE a pH 8
		Etanol absoluto
		Etanol al 70%
		Buffer TE a pH 8

Nota. Protocolo de extracción de ADN estandarizado por (Howland, 1996).

Se transfirió cinco colonias de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf que contenía 100µL de agua UP, luego se homogenizó la muestra por un minuto. La muestra se centrifugó a 12000 RPM por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 600 µL de buffer TE y se añadió 50 µL de SDS al 20% (p/v), la muestra se mezcló en vortex durante 5 segundos y se colocó en baño maría durante 30 minutos a 65 °C.

Se añadió 700 µL de fenol saturado en Tris-HCl en la muestra y se mezcló durante 15 segundos, luego se centrifugó a 12000 RPM por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Después se colocó 700 µL de Cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcló durante 15 segundos, luego se centrifugó a 12000 RPM por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf (este paso se lo realizó dos veces).

A la muestra se le colocó 800 µL de isopropanol frío y 80 µL de acetato de sodio, la muestra se colocó en baño frío durante una hora y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 RPM. Se eliminó los residuos de isopropanol.

El *pellet* obtenido se lavó con 1000 µL de etanol absoluto y se centrifugó a 12000RPM por 5 minutos, luego el pellet fue lavado con 1000 µL de etanol al 70% y se repitió el paso de centrifugación. Finalmente, el *pellet* se secó en incubadora a temperatura de 37 °C durante una hora y se resuspendió en 50 µL de buffer de TE + ARNasa. Las muestras se conservaron a -20 °C.

Amplificación de subunidad 16s

Para la amplificación de fragmentos de ADN genómico bacteriano se empleó cebadores universales 16s. Cebador forward 16S_rRNAF (5'– AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') y cebador reverse 16S_rRNAR (5'– ACGGATACCTTGTACGACTT– 3'), estos cebadores fueron utilizados por (Hou *et al.*, 2018). Las concentraciones finales de los reactivos utilizados en la amplificación de ADN se detallan en la tabla 13.

Tabla 13

Recursos utilizados para la amplificación de ADN bacteriano por PCR

Equipos	Insumos	Reactivos
Termociclador	Micropipetas	Agua UP
Cámara de electroforesis	Puntas estériles	Marcador Opti-DNA 100 bp
Vortex	Tubos eppendorf	BlasTaq 2X PCR MasterMix
Cámara de flujo laminar	Gradilla	Cebadores (forward y reverse)
Transluminador		Bromuro de etidio
Matraz de Erlenmeyer		Agarosa
		Buffer TAE 1X

Nota. El protocolo para PCR fue estandarizado por (Hou *et al.*, 2018).

En la tabla 14 se detalla los componentes para amplificación de subunidad 16s bacteriano tomando en consideración 6 aislados obtenidos más control negativo y positivo. En la tabla 15 se denota el protocolo las condiciones de desnaturalización, hibridación y extensión de los fragmentos ADN amplificados basándose en el protocolo estandarizado por (Hou *et al.*, 2018).

Tabla 14*Componentes para PCR de ADN genómico bacteriano*

Reactivo	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de reacción (μL) (1rxn)	Volumen de reacción (μL) (8rxn)
Agua UP	-	-	-	10,5	84
BlasTaq 2X PCR MasterMix	x	2x	2x	12,5	100
Cebador forward	μM	100	10	1	8
Cebador reverse	μM	100	10	1	8
ADN	-	-	-	1	8
	Total			25	200

Nota. Se utilizó como control positivo fragmento de ADN genómico bacteriano de *E. coli* (longitud: 1500 pb).

Tabla 15*Condiciones de termociclador para PCR de ADN genómico bacteriano*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 minutos
Desnaturalización	95	30 segundos
Hibridación	55	25 segundos
Extensión	72	1,30 segundos
Extensión final	72	7 minutos

Nota. Las muestras se amplificaron por 35 ciclos, los resultados se observaron en un gel de agarosa al 2% (p/v).

Secuenciación de subunidad 16s

Para el análisis de secuenciación, se aplicó el método de secuenciación propuesto por Sanger y estandarizado por (Zhang *et al.*, 2000) se secuenció la subunidad ribosomal 16s. Las muestras fueron analizadas en Seúl, Corea por la empresa MacroGen ®.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas, se utilizó los softwares BioEdit versión 7.2.5, Sequencher versión 5.4.6 y MEGA versión 11.

Análisis filogenético

Dentro del análisis filogenético se utilizó el algoritmo de máxima verosimilitud donde se aplicó el método planteado por Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante MEGA versión 11.

Resistencia a antibióticos

Tabla 16

Equipos y materiales usados para análisis de sensibilidad antibiótica

Equipos	Insumos	Reactivos
Incubadora	Pipeta graduada de 10mL	Cloruro de sodio (NaCl)
Autoclave	Micropipeta de 10µL	Agua destilada estéril (H ₂ O)
Cámara de flujo laminar	Hisopos estériles	Agar Mueller-Hinton (MH)
Vortex	Asa de siembra bacteriológica	Discos de sensibilidad antimicrobiana
	Puntas de micropipeta estériles	
	Pinza estéril	
	Tubos de ensayo	

Nota. Protocolo estandarizado por (Bernal R. & Guzmán, 1984).

Preparación del inóculo

Se preparó una disolución con 0,85 g de NaCl en 100mL de agua destilada estéril y se dispensó 10mL de solución salina en cada tubo de ensayo y se dejó en cámara de flujo laminar previamente esterilizada. Con un asa de siembra se resuspendió la bacteria en la solución salina y se homogenizó la muestra durante 3 minutos. Con un hisopo estéril se tomó aproximadamente 1mL de solución bacteriana y se dispensó por extensión de placa en todo el contorno de la caja Petri con medio Mueller Hinton Agar Difco™.

Con un asa de siembra estéril se colocó los discos de sensibilidad antibiótica marca OXOID de 8mm de diámetro. Los discos de sensibilidad utilizados en este estudio fueron amoxicilina/ácido clavulánico [30 MCG], sulfametoxazol/trimetoprima [25 SXT], nitrofurantoina [300 MCG] y ciprofloxacina [5 MCG]. Las unidades experimentales se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Diseño experimental

Factores y niveles

Tabla 17

Factores de estudio del análisis experimental

Factores	Simbología	Descripción
A: Enterobacterias	A0	<i>Aislado 1</i>
	A1	<i>Aislado 2</i>
	A2	<i>Aislado 3</i>
	A3	<i>E. coli</i> ATCC 27325 (Control positivo)
B: Antibióticos	B0	Ciprofloxacina [5 MCG]
	B1	Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]
	B2	Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]
	B3	Nitrofurantoina [300 MCG]

Nota. Se planteó un diseño bifactorial donde el factor A son los aislados caracterizados (enterobacterias) frente a antibióticos como factor B.

Cuadro de tratamientos

Tabla 18

Cuadro de tratamientos en el diseño experimental

N°	Tratamiento	Combinación
1	A0B0	<i>K. pneumoniae</i> vs Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]
2	A0B1	<i>K. pneumoniae</i> vs Nitrofurantoína [300 MCG]
3	A0B2	<i>K. pneumoniae</i> vs Ciprofloxacino [5 MCG]
4	A0B3	<i>K. pneumoniae</i> vs Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]
5	A1B0	<i>S. flexneri</i> vs Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]
6	A1B1	<i>S. flexneri</i> vs Nitrofurantoína [300 MCG]
7	A1B2	<i>S. flexneri</i> vs Ciprofloxacino [5 MCG]
8	A1B3	<i>S. flexneri</i> vs Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]
9	A2B0	<i>E. coli</i> vs Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]
10	A2B1	<i>E. coli</i> vs Nitrofurantoína [300 MCG]
11	A2B2	<i>E. coli</i> vs Ciprofloxacino [5 MCG]
12	A2B3	<i>E. coli</i> vs Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]
13	A4B0	<i>E. coli</i> ATCC 27325 vs Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]
14	A4B1	<i>E. coli</i> ATCC 27325 vs Nitrofurantoína [300 MCG]
15	A4B2	<i>E. coli</i> ATCC 27325 vs Ciprofloxacino [5 MCG]
16	A4B3	<i>E. coli</i> ATCC 27325 vs Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]

Nota. Esquema de diseño de bloques completamente aleatorizado con cinco repeticiones. Total: 80 unidades experimentales. La variable dependiente es milímetros de diámetro de inhibición.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Determinación de UFC y NMP

Los resultados obtenidos en base a las unidades formadoras de colonias de coliformes totales se detalla en la tabla 19.

Tabla 19

Resultados obtenidos a partir de siembra en Petrifilm

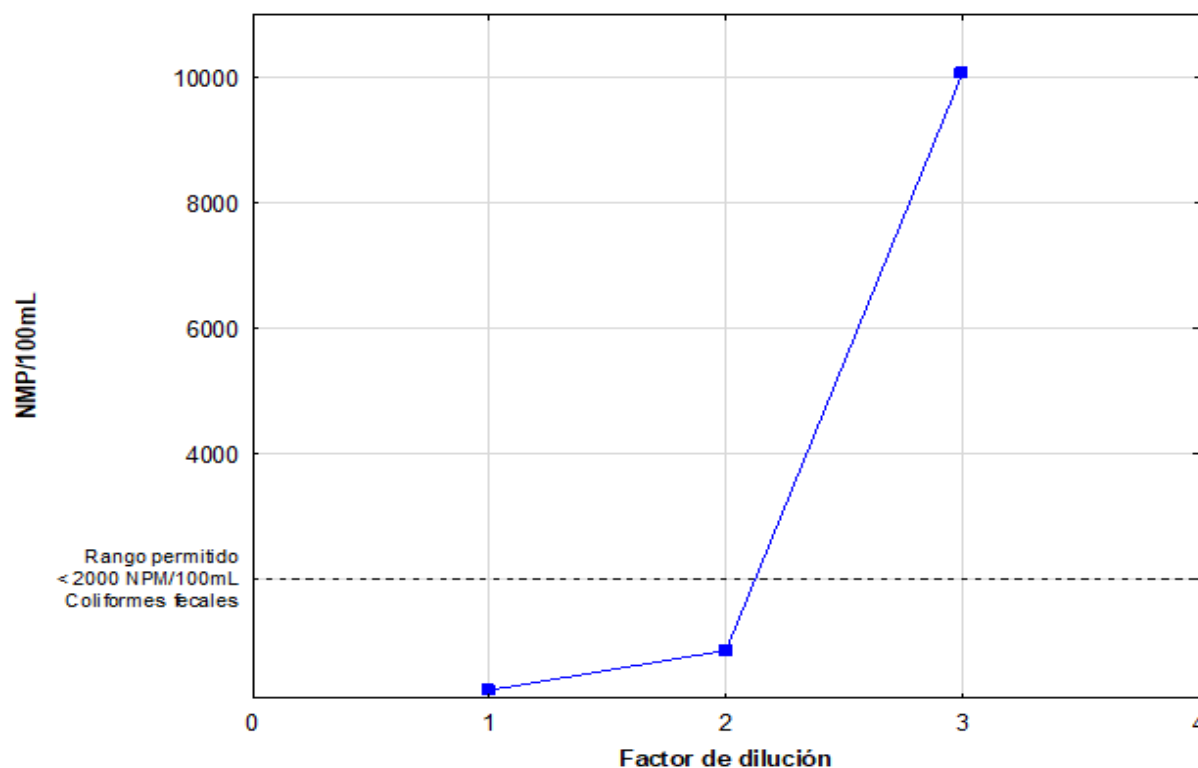
Dilución	Conteo de colonias	UFC/100 mL	NMP/100 mL
10 ⁻²	300	300	219
10 ⁻³	102	1020	855
10 ⁻⁴	94	9400	> 2000

Nota. Se determinó que la dilución con mayores unidades formadoras de colonias y número más probable de microorganismos es 10⁻⁴ mientras que la dilución 10⁻² presenta menor unidades formadoras de colonias en el volumen de muestra sembrado (v =100 mL).

Los resultados obtenidos en base al número más probable de microorganismos indica que existe contaminación no permitida en el sitio de descarga de aguas negras y grises, según lo establecido por la Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes al Recurso Agua, Registro 387, anexo 9 el rango del número más probable de coliformes fecales es menor o igual a 2000 NPM/100mL como se observa en la figura 7.

Figura 7

Gráfico lineal en base a NMP/100mL



Nota. Interpretación de la gráfica: NPM/100mL (Eje y). (1) Factor de dilución 10^2 . (2) Factor de dilución 10^3 . (3) Factor de dilución 10^4 (Eje x). Línea entrecortada refleja el límite permitido para coliformes fecales (2000 NPM/mL) según la Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes: Recurso Agua, Registro oficial 387, anexo 9.

Aislamiento microbiológico

De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} que fueron inoculadas en medio MacConkey se obtuvieron 15 aislados microbiológicos bacterianos, luego de aquello, se sembró dichos microorganismos en medio EMB, posterior a la siembra se aplicó la prueba de KIA, con la cual se determinaron cuáles eran posibles enterobacterias, finalmente se determinó que 6 aislados son posibles enterobacterias.

Tabla 20

Aislados caracterizados mediante siembra en EMB y prueba de KIA.

Aislado	Característica de crecimiento (EMB)	Prueba de KIA	
A1	Rosado	Acido/Acido	G / A
A2	Morado	Alcalino/Acido	A / A
A3	Verde	Acido/Acido	G / A
A4	Verde	Acido/Acido	G / A
A5	Morado/Translucido	Alcalino/Acido	A / H
A6	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A7	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A8	Morado/Translucido	Alcalino/Acido	A / A
A9	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A10	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A11	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A12	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A13	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A14	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A
A15	Morado/Translucido	Alcalino/Alcalino	A / A

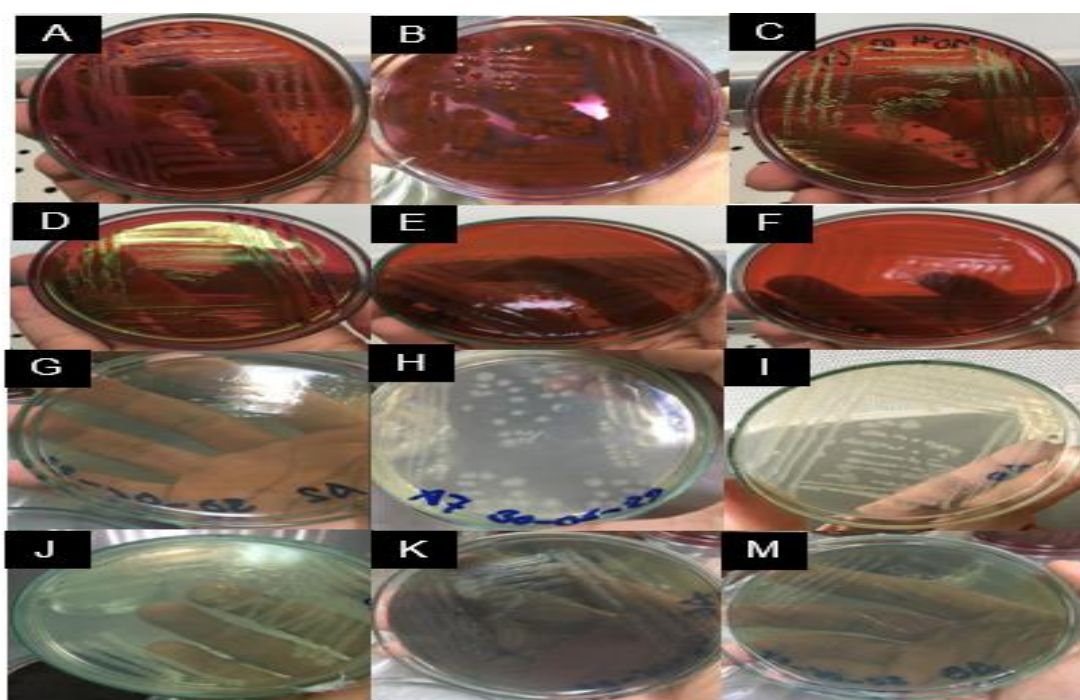
Nota. Cuadro de resultados obtenidos en aislamiento inicial.

En el aislamiento inicial se obtuvieron 15 aislados bacterianos, de los cuales 6 contaban con características de crecimiento diferentes (presuntivamente enterobacterias), se observó que estos aislados crecen en condiciones aerobias como lo menciona (Madigan *et al.*, 2009).

(Fadare *et al.*, 2020) establece el medio MacConkey permite el crecimiento de enterobacterias u otros bacilos Gram negativos y se complementó con medio EMB para la determinación de microorganismos fermentadores de azúcares como lo menciona (Becton, 2013) en la figura 8 se observa las características de crecimiento en MacConkey y EMB agar de los 6 aislados obtenidos (presuntivamente enterobacterias).

Figura 8

Aislados obtenidos de presuntivamente enterobacterias



Nota: Aislados obtenidos posibles enterobacterias a partir de las muestras líquidas del punto de descarga de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Sede Santo Domingo. 8A. Aislado “A1” medio EMB, 8B. Aislado “A2” medio EMB, 8C. Aislado “A3” medio EMB, 8D. Aislado “A4” medio EMB, 8E. Aislado “A5” medio EMB, 8F. Aislado “A6” medio EMB, 8G. Aislado “A1” medio nutriente, 8H. Aislado “A2” medio nutriente, 8I. Aislado “A3” medio nutriente, 8J. Aislado “A4” medio nutriente, 8K. Aislado “A5” medio nutriente, 8M. Aislado “A6” medio nutriente.

Identificación bioquímica

Se determinó presuntivamente 6 géneros distintos de enterobacterias en base a la identificación bioquímica como se detalla en la tabla 21.

Tabla 21

Identificación *bioquímica de enterobacterias aisladas*

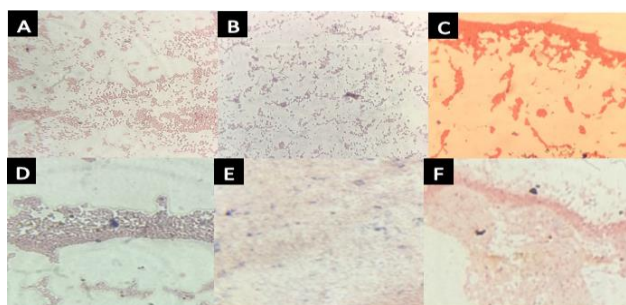
Prueba bioquímica # de Aislado	Tinción Gram	Catalasa	Indol	O/F	KIA	
					Produce Gas y/o H ₂ S	
A1	-	+	-	F	Acido/Acido	G / A
A2	-	+	-	F	Alcalino/Acido	A / A
A3	-	+	+	F	Acido/Acido	G / A
A4	-	+	-	F	Acido/Acido	G/A
A5	-	+	-	F	Alcalino/Acido	A/H
A6	-	+	-	O	Alcalino/Alcalino	A/A

Nota. Lectura de resultados (-) Negativo, (+) Positivo, (F) Fermenta, (O) Oxida, (G) produce gas, (H) produce ácido sulfhídrico y (A) ausencia.

Tinción Gram

Figura 9

Aislados obtenidos teñidos en tinción Gram



Nota: Fotografía obtenida mediante el uso de microscopio óptico marca Zeiss en aumento de 100X. Se observa en las figuras 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F bacterias Gram negativas las cuales presentan estructuras en forma de bacilos característicos de enterobacterias.

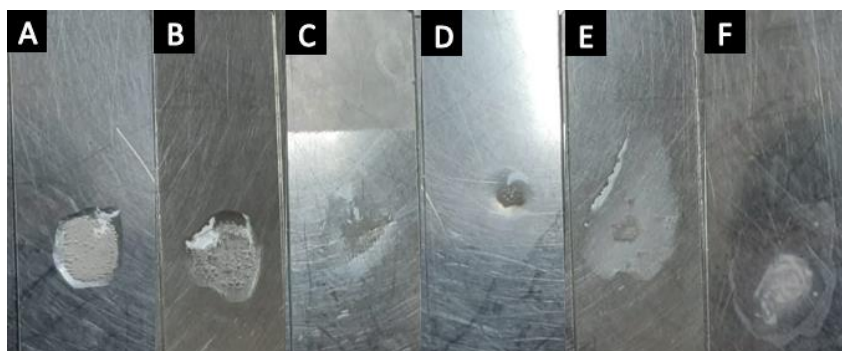
Las enterobacterias son bacilos Gram negativos que se tiñen de rosado o rojo en base a la tinción aplicada, los resultados obtenidos se muestran similares a lo indicado por (Crombet-Grillet *et al.*, 2013).

Los microorganismos Gram negativos poseen un organelo (capsula) que evita que los linfocitos ingresen en su estructura celular, también estos microorganismos poseen una membrana externa que libera endotoxinas que contribuyen en la gravedad de síntomas presentadas en las infecciones bacterianas (Willey *et al.*, 2010).

Prueba de Catalasa

Figura 10

Prueba de catalasa en aislados obtenidos



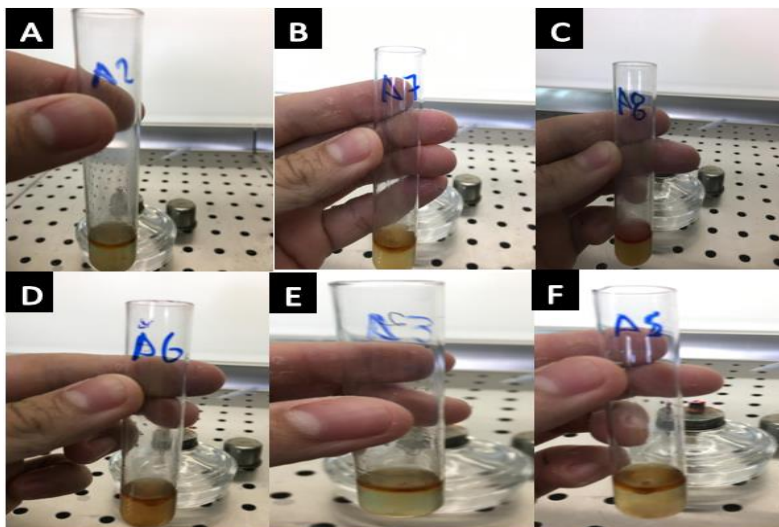
Nota. En las figuras 10A, 10B, 10C, 10D, 10E y 10F se observó formación de burbujas, es decir los aislados degradan peróxido de hidrogeno.

En base a los resultados obtenidos se observó que los aislados descomponen el peróxido de hidrógeno, es decir son positivos a catalasa, lo cual se corrobora con la caracterización bioquímica de enterobacterias en (Cappuccino & Welsh, 2018).

Prueba de Indol

Figura 11

Resultados de prueba Indol



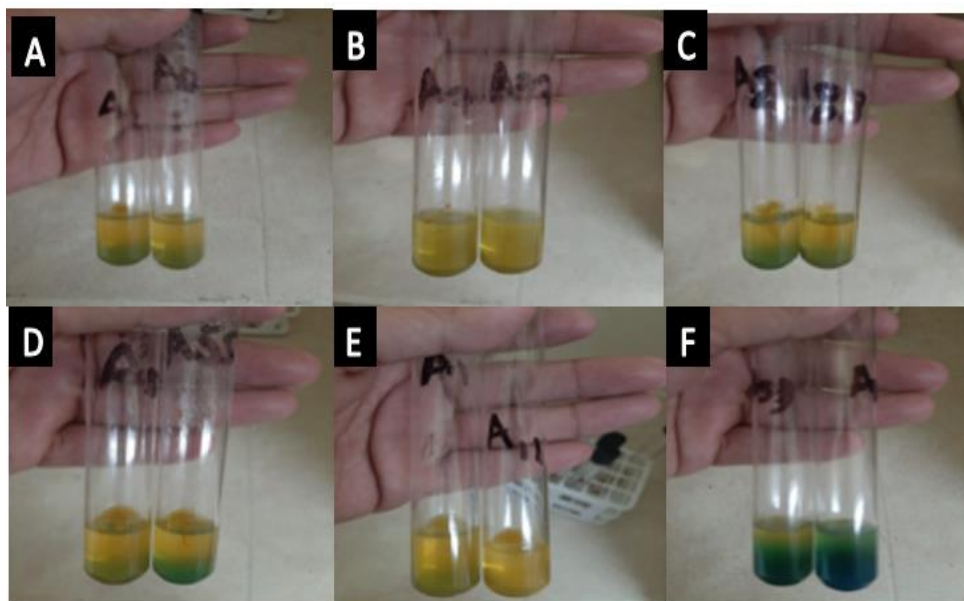
Nota: Resultados obtenidos en la prueba de Indol. 11A. Formación de anillo sin coloración adecuada, 11B. Formación de anillo sin coloración adecuada, 11C. Formación de anillo con coloración adecuada (rojo), 11D. Formación de anillo sin coloración adecuada, 11E. Formación de anillo sin coloración adecuada, 11F. Formación de anillo sin coloración adecuada.

En base a los resultados obtenidos se determinó que de los aislados obtenidos tanto en la figura 11A, 11B, D, 11E y 11 F se observó que los aislados no catabolizan el anillo de indol del triptófano es decir son indol negativo, en base a la guía práctica de microbiológica médica propuesta por (Jorgensen *et al.*, 2018) los géneros de enterobacterias que no degradan el anillo de indol son *Enterobacter spp*, algunas especies de *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*, y *Serratia spp*. Mientras que la figura 11C se observó un aislado indol negativo que, en base a la guía mencionada anteriormente, estas características corresponderían a los géneros de enterobacterias: *E. coli* y algunas especies de *Citrobacter spp*.

Prueba de óxido/fermentación

Figura 12

Resultados de prueba óxido/Fermentación



Nota: Descripción de resultados de prueba de OF, 12A. A1, Fermenta de glucosa, 12B. A2, Fermenta de glucosa, 12C. A3, Fermenta glucosa, 12D. Fermenta de glucosa, 12E. Fermenta de glucosa, 12F. Oxida glucosa.

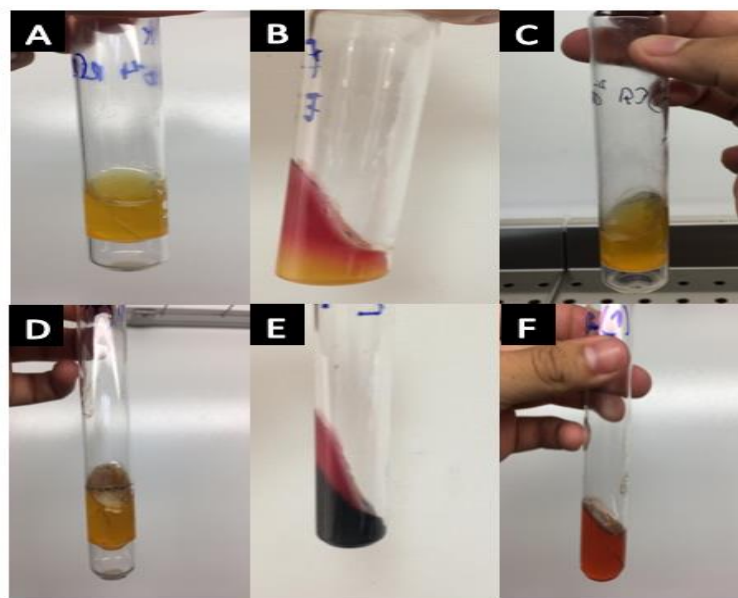
El medio Hugh-Leifson permite determinar la fermentación u oxidación de carbohidratos como glucosa, sacarosa, lactosa, etc. En este estudio el medio Hugh-Leifson se complementó con glucosa. En base a los resultados obtenidos se determinó que los aislados 12A, 12B, 12C, 12D y 12E fermentan glucosa, esto en base a la interpretación de (Bou *et al.*, 2011) y adicionalmente no presentan formación de ácidos debido a la tonalidad amarilla, mientras que el aislado 12F, presentó capacidad oxidativa. Las enterobacterias en condiciones anaeróbicas pueden fermentar carbohidratos con o sin producción de gas o ácidos (Brown & Smith, 2017).

Prueba de KIA (Kliger Iron Agar)

De los aislados seleccionados se les aplicó la prueba de KIA, y se obtuvieron los siguientes resultados.

Figura 13

Resultados de prueba KIA en los aislados obtenidos



Nota: Descripción de resultados de prueba de KIA, 13A. A1, Fermentación de lactosa y glucosa junto con producción de gas, 13B. A2, Fermentadora de glucosa, 13C. A3, Fermentación de lactosa y glucosa junto con producción de gas, 13D. A4, Fermentación de lactosa y glucosa junto con producción de gas, 13E. A5, Fermentadora de glucosa junto sulfuro de hidrógeno, 13F. A6, Sin fermentación.

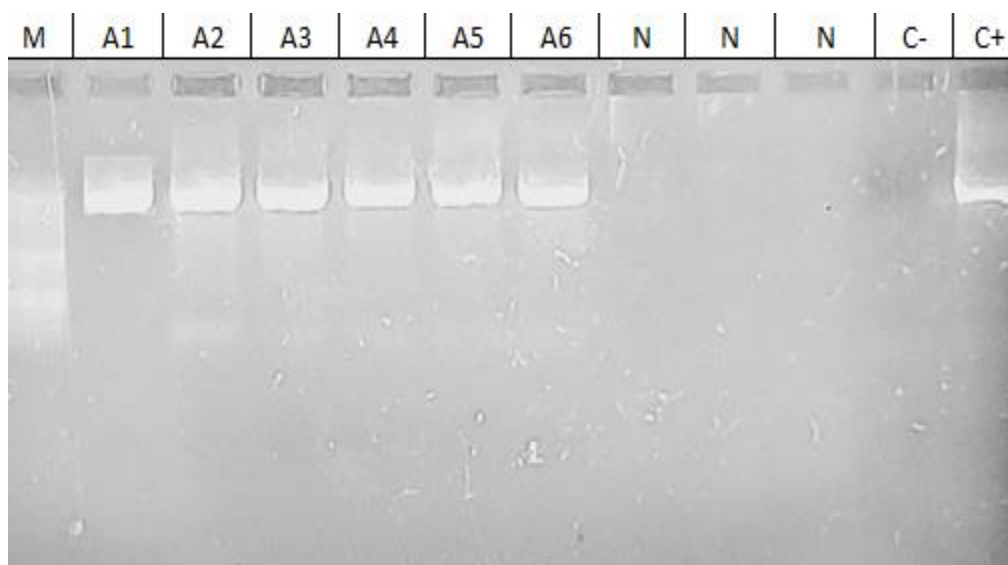
En base a los resultados obtenidos se observó que los aislados A1, A3 y A4 son fermentadores de glucosa y lactosa junto con producción de gas. El aislado A2 fermenta glucosa sin producción de gas, el aislado A5 fermenta glucosa con formación de ácido sulfhídrico, el aislado A6 no fermenta ni glucosa ni lactosa, los resultados reportados coinciden con (Cappuccino & Welsh, 2018).

Caracterización molecular

De los seis aislados obtenidos se obtuvo fragmentos de 1500pb aproximadamente comparando el fragmento obtenido con el marcado de peso molecular detallado en la metodología.

Figura 14

Amplificación de fragmentos de ADN genómico



Nota. Lectura de resultados: (M) Marcador de peso molecular. (A) Aislado bacteriano. (C-) control negativo. (C+) control positivo. (N) ausencia. Los resultados se observaron mediante técnica de electroforesis en gel de agarosa 2%.

En cuanto al análisis bioinformático se determinó la existencia de contaminación en el ADN extraído, esta contaminación puede deberse a las condiciones del laboratorio por lo cual los aislados A4, A5 y A6 se descartaron del estudio. Se determinó el porcentaje de identidad de las secuencias genómicas obtenidas mediante BLAST-n, los resultados se detallan en la tabla 22.

Tabla 22

Reporte del porcentaje de identidad de los aislados obtenidos

Número de aislado	Género y especie	Porcentaje de identidad
A1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98,98%
A2	<i>Shigella flexneri</i>	99,64%
A3	<i>Escherichia coli</i>	98,85%

Nota. Se obtuvo 3 fragmentos de ADN. Las longitudes son las siguientes; A1 (1369 pb), A2 (1407 pb) y A3 (1401pb).

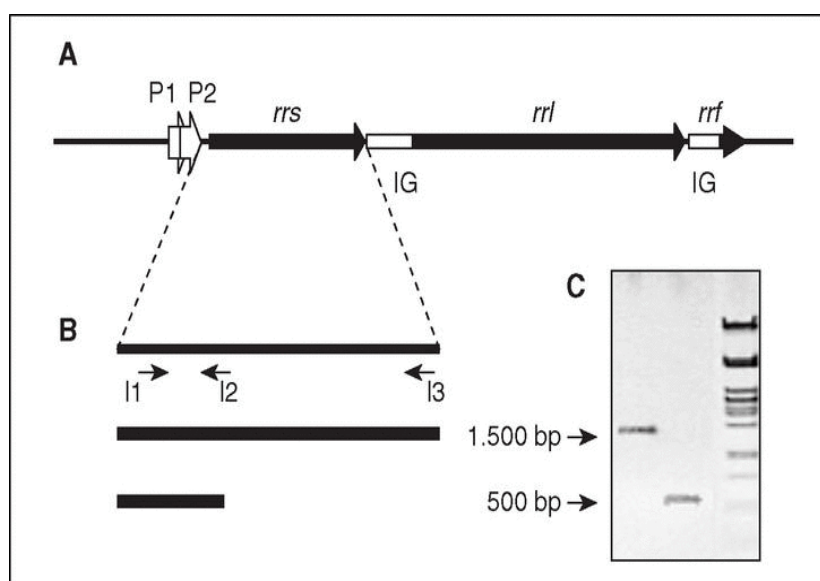
Según (Barrett *et al.*, 2020) el gen ARNr 16s es un polirribonucleótido de 1500 pb, para la amplificación de este gen el diseño de cebadores se facilita en regiones conservadas. Cuando se diseñan cebadores en regiones conservadas en los extremos 59 y 39 se originan amplicones de 1500pb sin embargo eso no quiere decir que para una identificación de un procarionte se puede obtener fragmentos de 500pb estos son pertenecientes al extremo 59.

Según los resultados obtenidos en la figura 14 el amplicón obtenido fue de 1500 pb por cada aislado, esto se corroboró ya que los cebadores usados están diseñados tomando en cuenta la región conservada de los extremos 59 y 39 como lo menciona (Rodicio & Mendoza, 2004).

La estructura del gen 16s se subdivide en tres regiones rrs, rrl y rrf, los promotores son P1 y P2. Las regiones IG son regiones no codificantes, en la figura se denota el diseño de cebadores en la región extremo 59 y 39 donde se explica porque se obtienen fragmentos de 1500pb como se observa en la figura 15.

Figura 15

Esquema de la estructura del gen 16s



Nota. Esquema (A) estructura del operón 16s. Esquema (B) región conservada. Esquema (C) visualización de fragmentos de ADN. Tomado a partir de (Rodicio & Mendoza, 2004).

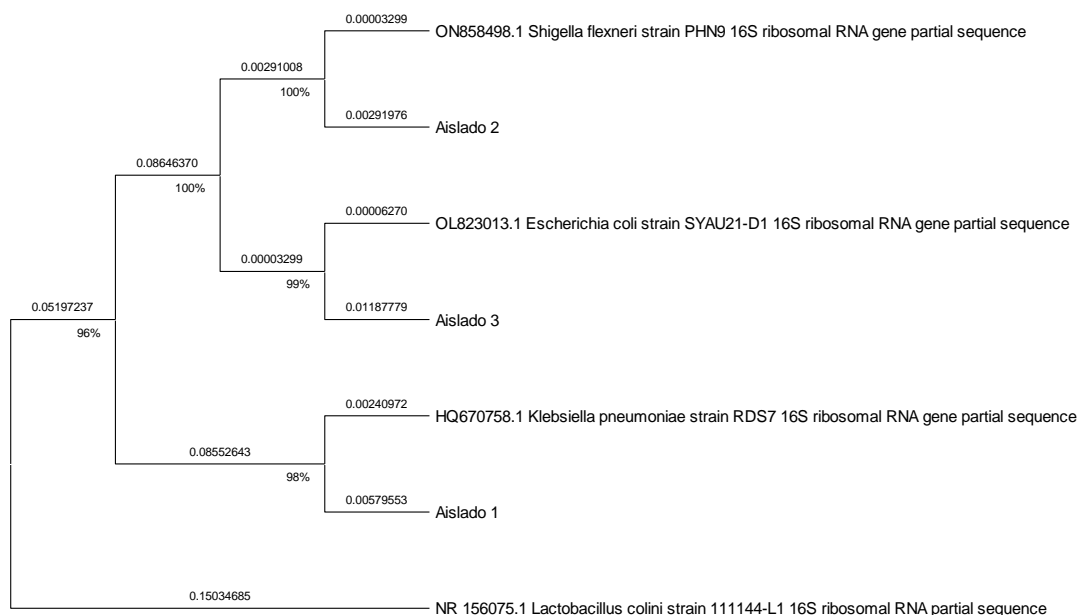
En base a los resultados de secuenciación del gen 16s de los aislados obtenidos, se determinó contaminación en la secuenciación de los amplicones, esto puede deberse a contaminación en el área de trabajo, protocolo de extracción de ADN o error del operador ya que las secuencias obtenidas fueron de longitud menor al fragmento de ADN 1500pb visualizado en gel y que reportó (Rodicio & Mendoza, 2004).

En cuanto al análisis filogenético se observó que las distancias entre los aislados obtenidos y los microorganismos moldes son $< 0,01$ y su porcentaje de similitud de secuencia es $> 97\%$. Es decir, el aislado (A1) se confirmó como *Klebsiella pneumoniae*, aislado (A2) *Shigella flexneri* y aislado (A3) *Escherichia coli*.

El método de máxima similitud juntamente con el modelo Tamura-Nei permite inferir la historia evolutiva de un organismo. El modelo empleado permitió analizar las distancias en base a la secuencia de nucleótidos de los aislados obtenidos donde se determinó que la distancia entre el aislado 1 con el aislado 3 es de (0,21) la cual es mayor significativamente en comparación con la distancia evolutiva entre aislado 2 y 3 (0,1). La mayor distancia se observó entre aislado 1 y 2 (2,93). Los resultados obtenidos concuerdan con (Dib *et al.*, 2018).

Figura 16

Diagrama filogenético de los aislados obtenidos



Nota. Para la interpretación de resultados se utilizó como grupo externo *Lactobacillus colini*.

Mediante secuenciación de la subunidad 16s se determinó 3 géneros y especies de enterobacterias presentes en aguas negras y grises, estos resultados se corroboraron mediante pruebas bioquímicas y análisis filogenético en comparación de secuencias de microorganismos ya registrados en la biblioteca de NCBI. Los resultados obtenidos son similares a (Fadare *et al.*, 2020).

Resistencia a antibióticos

En el análisis de la resistencia a antibióticos se midió como variable dependiente el halo de inhibición en milímetros, en la tabla 23 se detalla el ANOVA considerando el 5% de nivel de confianza, para estimar los efectos de cada nivel por factor se realizó prueba de Tukey HSD.

Para el análisis de sensibilidad a antibióticos se descartó los aislados A4, A5 y A6 por motivos de contaminación.

Tabla 23

Análisis de varianza para halo de inhibición (mm)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Enterobacterias	1345,64	3	448,546	300,37	0,0000
B: Antibióticos	4256,44	3	1418,81	950,10	0,0000
C: Repeticiones	1,2	4	0,3	0,20	0,9369
AB	1237,01	9	137,446	92,04	0,0000
Residuos	89,6	60	1,49333		
Total (corregido)	6929,89	79			

Nota. Se determinó diferencia significativa en el factor A, factor B y en la interacción AxB. No se observó diferencia significativa en las repeticiones del estudio.

En las tablas 24, 25, 26 se denota los resultados de la prueba de Tukey HSD para los factores A, B y la interacción AxB con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 24

Prueba de Tukey HSD para factor: Enterobacterias

<i>Enterobacterias</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>K. pneumoniae</i>	20	16,1	0,273252	A
<i>S. flexneri</i>	20	20,05	0,273252	B
<i>E. coli</i>	20	23,25	0,273252	C
C+	20	27,25	0,273252	D

Nota. Se observó 4 grupos independientes donde se denota que *E. coli* presenta mayor halo de inhibición, seguido de *S. flexneri* y por último *K. pneumoniae*.

Tabla 25

Prueba de Tukey HSD para factor: Antibióticos

<i>Antibióticos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Nitrofurantoína [300 MCG]	20	15,15	0,273252	A
Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	20	15,3	0,273252	B
Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	20	23,25	0,273252	C
Ciprofloxacina [5 MCG]	20	32,95	0,273252	D

Nota. Se observó 3 grupos independientes donde nitrofurantoína causa el mismo efecto en comparación con amoxicilina + ácido clavulánico, mientras que trimetoprima/sulfametoxazol y ciprofloxacina causan mayor halo de inhibición.

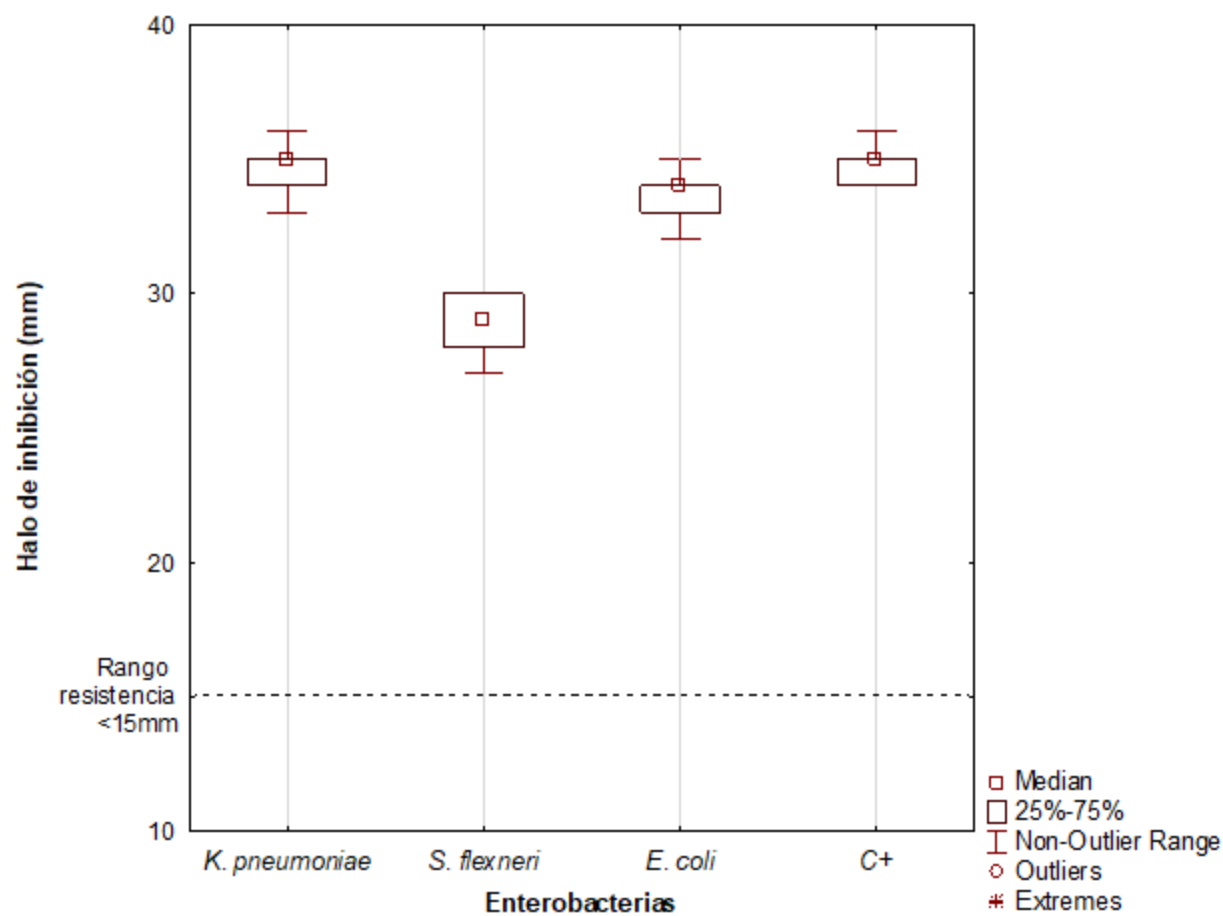
Tabla 26*Prueba de Tukey HSD para la interacción AxB: Enterobacterias x Antibióticos*

Enterobacterias	Antibióticos	Media	Casos	Sigma LS	Grupos homogéneos
<i>K. pneumoniae</i>	Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	8,00	5	0,55	A
<i>K. pneumoniae</i>	Nitrofurantoína [300 MCG]	8,00	5	0,55	A
<i>E. coli</i>	Nitrofurantoína [300 MCG]	9,80	5	0,55	AB
<i>S. flexneri</i>	Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	12,40	5	0,55	BC
<i>K. pneumoniae</i>	Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	13,80	5	0,55	C
<i>E. coli</i>	Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	18,00	5	0,55	D
<i>S. flexneri</i>	Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	19,00	5	0,55	D
<i>S. flexneri</i>	Nitrofurantoína [300 MCG]	20,00	5	0,55	D
C+	Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	22,80	5	0,55	E
C+	Nitrofurantoína [300 MCG]	22,80	5	0,55	E
C+	Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	28,60	5	0,55	F
<i>S. flexneri</i>	Ciprofloxacina [5 MCG]	28,60	5	0,55	F
<i>E. coli</i>	Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	31,60	5	0,55	G
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacina [5 MCG]	33,60	5	0,55	GH
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacina [5 MCG]	34,60	5	0,55	H
C+	Ciprofloxacina [5 MCG]	34,80	5	0,55	H

Nota. Se observó 9 grupos homogéneos donde se denota que el grupo H demuestra mayor halo de inhibición, las unidades experimentales que pertenecen a los grupos A, B, C denotan menor halo de inhibición en el estudio.

Figura 17.

Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de ciprofloxacina

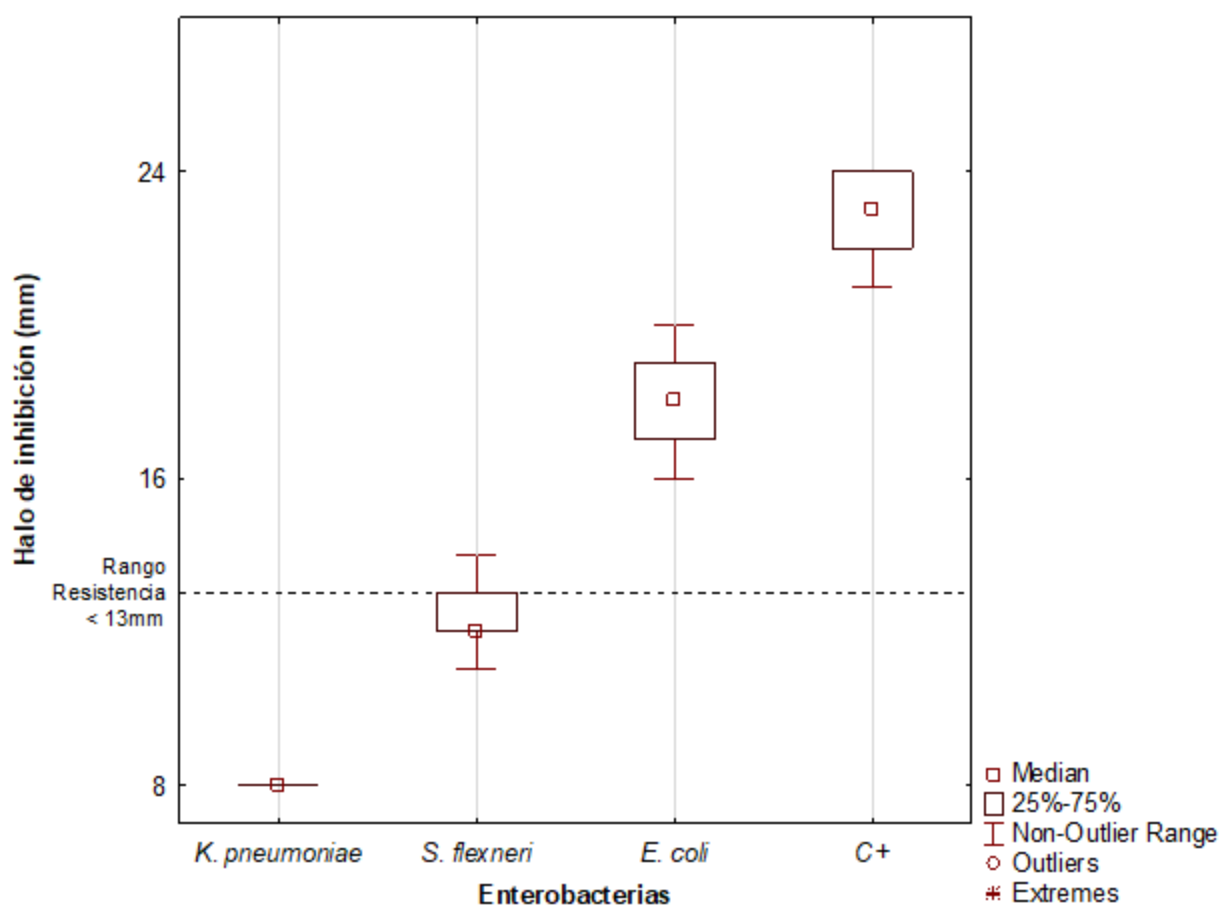


Nota. Línea entrecortada representa rango de resistencia (<15mm) por efecto de ciprofloxacina [5 MCG].

Según (Brown & Smith, 2017) las enterobacterias son consideradas resistentes a ciprofloxacina si presentan un halo de inhibición menor o igual a 15mm. Ninguna de las bacterias analizadas presentó resistencia a ciprofloxacina.

Figura 18

Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de amoxicilina + ácido clavulánico

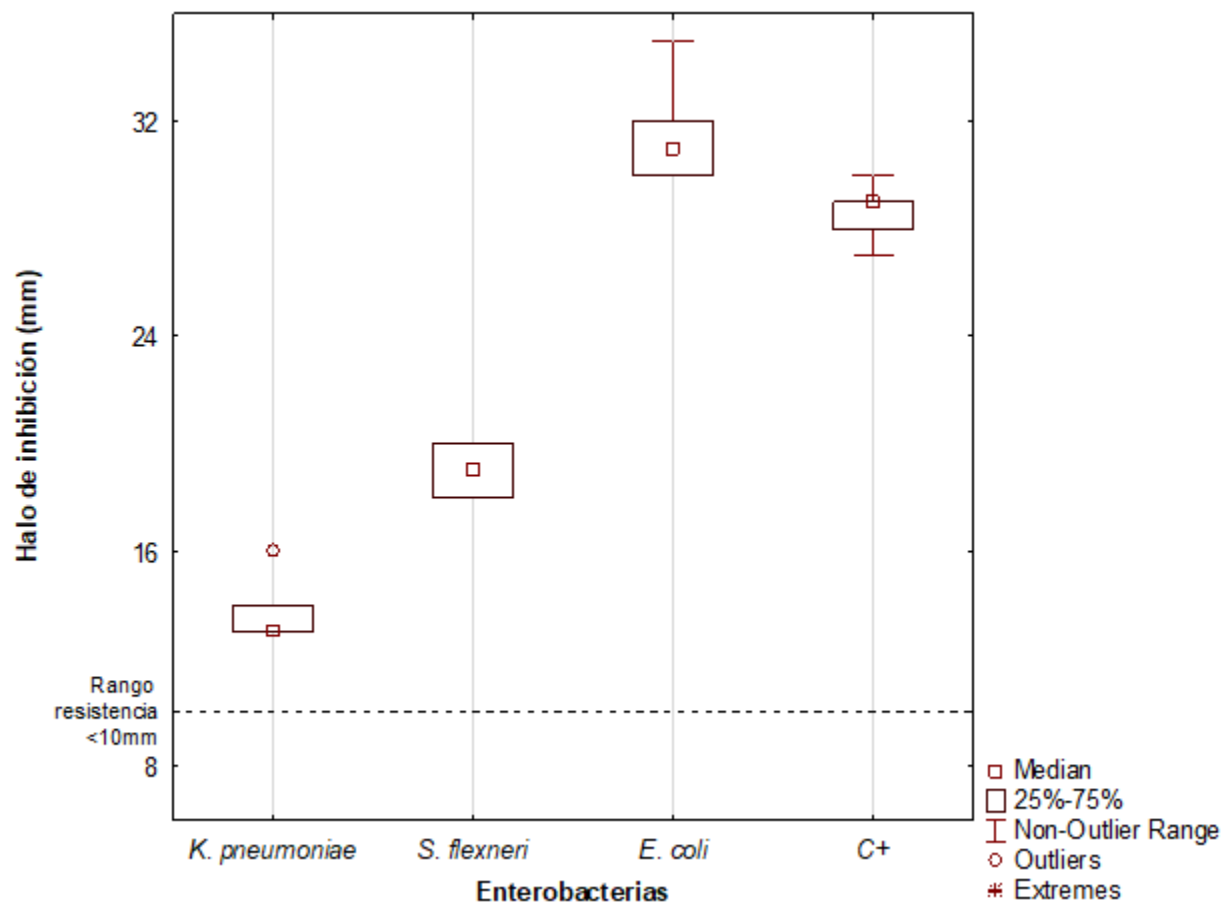


Nota. Línea entrecortada representa rango de resistencia (<13mm) por efecto de Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG].

Según (Brown & Smith, 2017) “las enterobacterias son consideradas resistentes amoxicilina + ácido clavulánico si presentan un halo de inhibición menor o igual a 13 mm. Siendo así que *K. pneumoniae* y *S. flexneri* presentan resistencia a amoxicilina + ácido clavulánico.

Figura 19

Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de Trimetoprima/sulfametoxazol

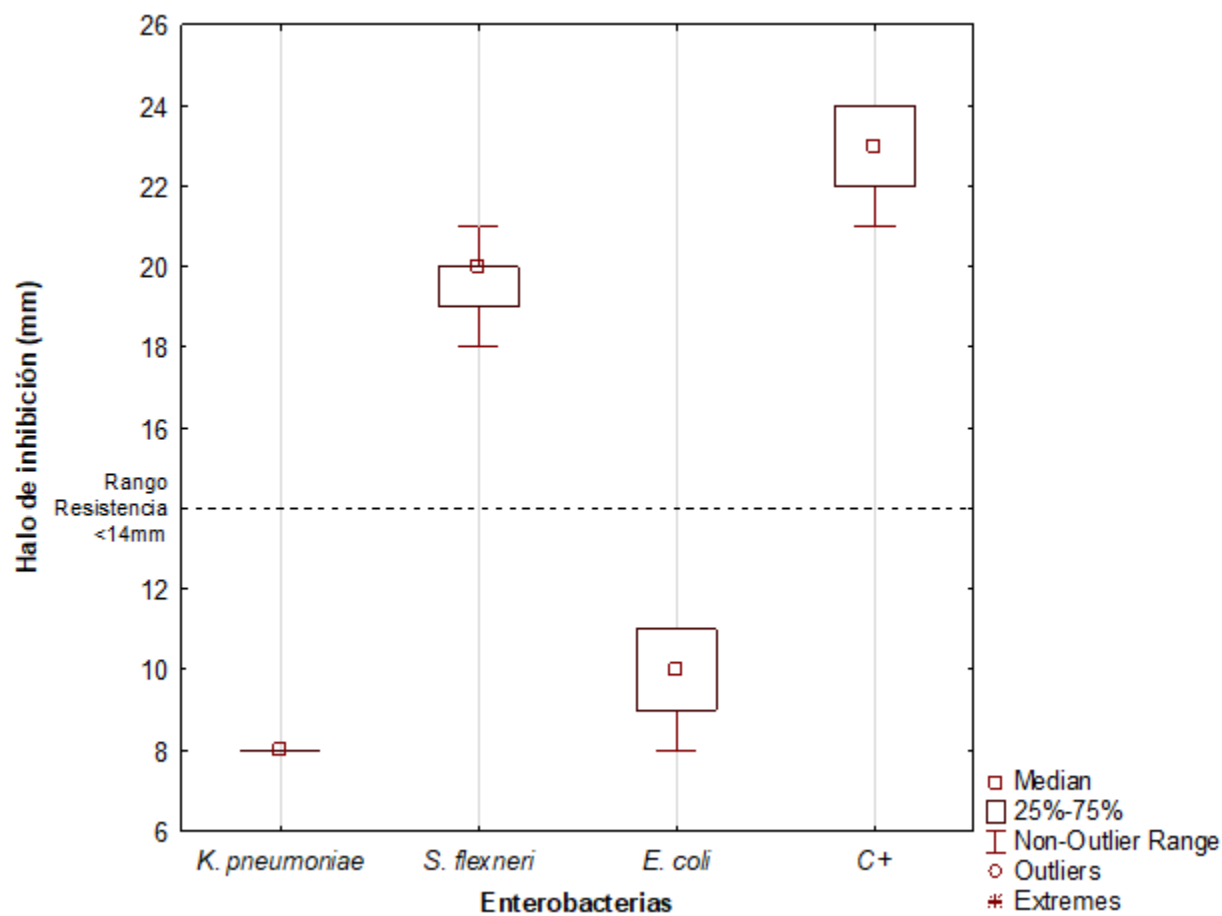


Nota. Línea entrecortada representa rango de resistencia (<10mm) de Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT].

Según (Jorgensen *et al.*, 2018) “considera a una bacteria resistente a Trimetoprima/sulfametoxazol si presenta un halo de inhibición menor o igual a 10 mm. Siendo así que ninguna de las bacterias analizadas es resistente, sin embargo *K. pneumoniae* es la única bacteria analizada que presenta sensibilidad intermedia a este fármaco. Las demás bacterias son sensibles al fármaco”.

Figura 20

Gráfico de cajas para halo de inhibición por efecto de Nitrofurantoína

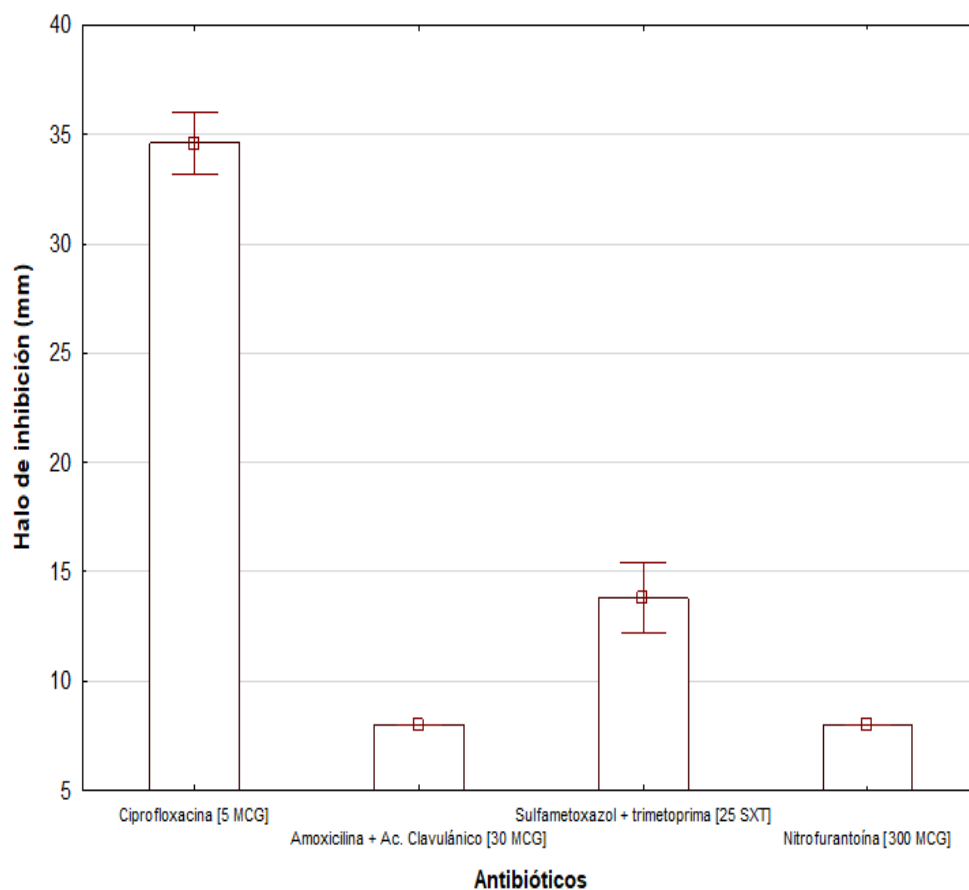


Nota. Línea entrecortada representa rango de resistencia (<14mm) por efecto de Nitrofurantoína [300 MCG].

Según (Jorgensen *et al.*, 2018) “las bacterias se consideran resistentes a nitrofurantoína si presentan un halo de inhibición menor o igual a 14mm. Tanto *K. pneumoniae* como *E. coli* son resistentes a nitrofurantoína.

Figura 21

Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: *Klebsiella pneumoniae*.



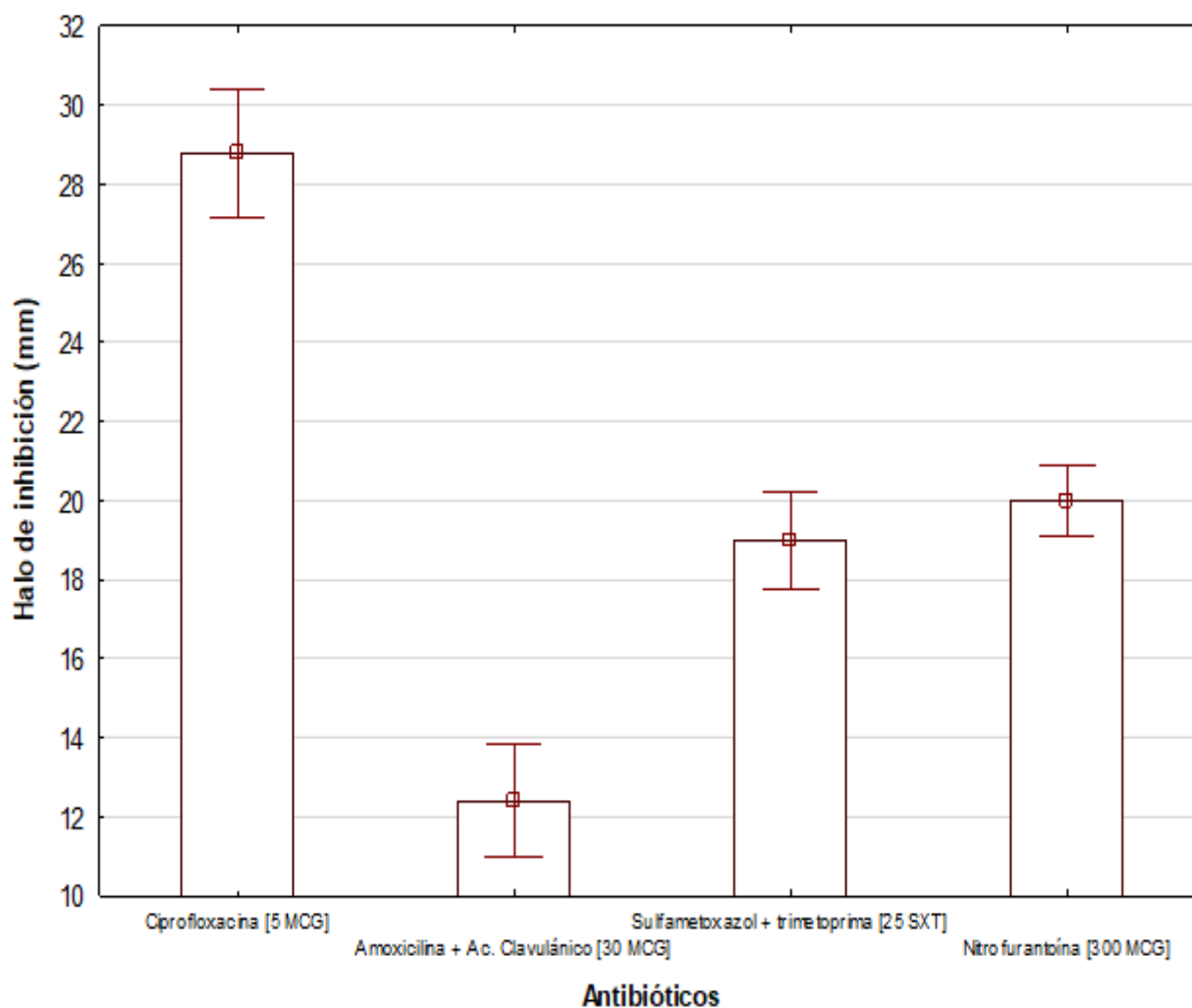
Nota. Halo de inhibición evaluando antibióticos frente a *K. pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae es resistente tanto a Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG] como a Nitrofurantoína [300 MCG], además de presentar una sensibilidad media a Sulfametoxazol/trimetoprima. La resistencia a los dos primeros fármacos puede deberse a dos mecanismos en concreto, en el caso de la resistencia a Amoxicilina + Ac. Clavulánico, puede deberse a la adquisición de genes de resistencia que permitan la síntesis de enzimas que modifiquen al antibiótico.

(Jorgensen *et al.*, 2018) detalla que existen cepas de *K. pneumoniae* que contienen el grupo de enzimas AmpCs (CMY, MOX, FOX, tipos de DHA) las cuales otorgan resistencia a ácido clavulánico. Para el caso de la Nitrofurantoína, puede deberse a mecanismos de resistencia sustentados en bombas de flujo, según (Xu *et al.*, 2019) ciertas cepas de *Klebsiella pneumoniae* si cuentan con mecanismos de resistencia de bombas de flujo, los cuales suelen estar regulados por los genes *acrB* y *oqxB*.

Figura 22

Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: *Shigella flexneri*

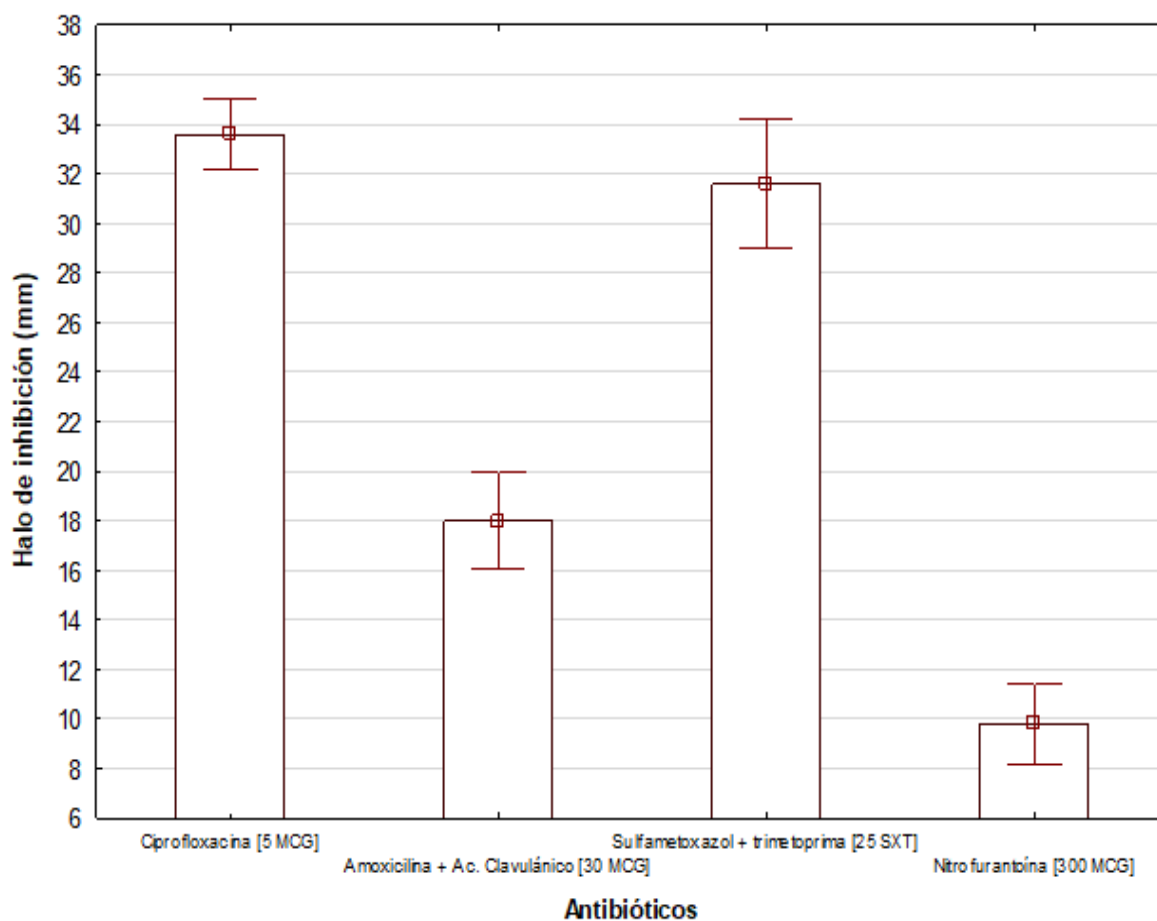


Nota. Halo de inhibición (mm) evaluando antibióticos frente a *S. flexneri*.

Shigella flexneri presenta resistencia a Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG], mientras que hacia los demás fármacos analizados es sensible. Según (Pakbin *et al.*, 2021) “*S. flexneri* es la especie predominante de la shigelosis causada por *Shigella spp.* en países en desarrollo, también indican cepas de resistentes a amoxicilina + ácido clavulánico, esto puede deberse a la presencia de genes de resistencia a las betalactamasas, en concreto para *S. flexneri* (Pakbin *et al.*, 2021) mediante técnicas moleculares encontró los genes bla_{OXA} y bla_{SHV}.”

Figura 23.

Gráfico de barras. Análisis de sensibilidad antibiótica: *Escherichia coli*



Nota. Halo de inhibición (mm) evaluado en antibióticos frente a *Escherichia coli*.

Escherichia coli es resistente a nitrofurantoína, pero es sensible hacia los demás fármacos analizados. Según (Jorgensen *et al.*, 2018) la resistencia a la nitrofurantoína está relacionada a la participación de la enzima nitrorreductasa ya que esta enzima expresa la resistencia a este fármaco cuando existe una actividad reducida de la nitrorreductasa, (Jorgensen *et al.*, 2018) también detalla que en *E.coli* estas enzimas son codificadas por genes *nfnA* (*nfsA*) y *nfnB* (*nfsB*), existen cepas con actividad de nitrorreductasa disminuida.

Capítulo V: Conclusiones

Se aceptó la hipótesis nula (H_{01}) es decir existe presencia de enterobacterias en la zona de descargas de aguas negras y grises de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, en el muestreo realizado se determinó que la carga contaminante microbiológica del efluente no cumple con la Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes al Recurso Agua, Registro 387, anexo 9.

Se obtuvo tres cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, lo cual se confirmó mediante caracterización bioquímica y biología molecular. Los microorganismos identificados fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*.

En base al análisis filogenético, *E. coli* comparte ciertas propiedades evolutivas en base a la caracterización bioquímica y genómica con *S. flexneri*. Mientras que *K. pneumoniae* es distante evolutivamente de *E. coli* y *S. flexneri*.

Se aceptó la hipótesis alternativa (H_{a2}) es decir al menos un aislado presentó resistencia a antimicrobianos. En cuanto análisis de resistencia a antibióticos, se concluye que la bacteria *K. pneumoniae* presenta en promedio un menor halo de inhibición hacia los fármacos en comparación a las otras cepas bacterianas; mientras que el fármaco con mayor halo de inhibición fue ciprofloxacina [5mcg], es decir todas las cepas bacterianas son sensibles a dicho fármaco.

En base a los niveles de la interacción AxB, se concluyó que *K. pneumoniae* es resistente a Amoxicilina + Ac. Clavulánico y nitrofurantoína ya que no se observó halo de inhibición.

Capítulo VI: Recomendaciones

En base al muestreo se debe cumplir todas las normas de bioseguridad por parte de los operadores del estudio debido a que se trata con patógenos presentes en aguas residuales con carga contaminante elevada.

Para el aislamiento de enterobacterias se recomienda utilizar medios selectivos como EMB y MacConkey debido a sus propiedades químicas que favorecen el crecimiento de estos microorganismos con el objetivo de caracterizar microorganismos en cuerpos de aguas contaminados.

En base a los resultados de secuenciación del gen 16s se recomienda mejorar condiciones del laboratorio, debido a que la contaminación afectó en la calidad del ADN, además, es necesario optimizar el protocolo de extracción de ADN, mejorar las técnicas de operaciones en el laboratorio preservando la bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio.

En base al análisis de resistencia a antibióticos se recomienda aumentar el diseño experimental en el factor antibióticos y así poder determinar un perfil de resistencia antibiótica para estos microorganismos.

En base al no cumplimiento de la Norma de Calidad Ambiental y de Descargas de Efluentes al Recurso Agua, Registro 387, anexo 9, se recomienda seguir la propuesta de diseño de planta de tratamiento planteada por Naranjo Sandra y Valdivieso Mariela publicado en su estudio para reducir la carga contaminante de los efluentes descargados en los cuerpos de agua ubicados en Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo.

Capítulo VII: Bibliografía

- Agencia de Regulación y Control del Agua del Ecuador. (2021). *Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales Gestión de Agua Potable y Saneamiento 2020 Resumen Estadístico*. 1–20.
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/gad-municipales/>
- Barrett, S. R., Hoffman, N. G., Rosenthal, C., Bryan, A., Marshall, D. A., Lieberman, J., Greninger, A. L., Peddu, V., Cookson, B. T., & Salipante, S. J. (2020). Sensitive identification of bacterial DNA in clinical specimens by broad-range 16s rRNA gene enrichment. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.01605-20>
- Becton, D. (2013). *BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar)*. <http://www.bd.com>
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, *4*(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In G. Arévalo (Ed.), *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (1st ed., Vol. 29, Issue 8). Eimc. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brown, A., & Smith, H. (2017). Microbiología médica. In L. Breithaupt (Ed.), *Benson' s Microbiological applications* (14th ed., Vol. 17, Issue 1, pp. 64–104). McGraw-Hill.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2018). Microbiology, a laboratory manual. In K. Churchman (Ed.), *Pearson Education Limited* (11th ed.). Kay Holman.

- Crombet-Grillet, S., Pérez-Pompa, N., Ábalos-Rodríguez, A., & Rodríguez-Pérez, S. (2013). Caracterización de las aguas residuales de la comunidad “Antonio Maceo” de la Universidad de Oriente. *Wastewater Characterization of the Community “Antonio Maceo” of the Oriente University.*, 25(2), 134–142.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=93387792&lang=es&site=ehost-live>
- Dib, A. L., Agabou, A., Chahed, A., Kurekci, C., Moreno, E., Espigares, M., & Espigares, E. (2018). Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control*, 88, 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.005>
- Enger, E., Smith, B., & Bockarie, A. (2006). Administración del agua. In R. del Bosque (Ed.), *Ciencia ambiental un estudio de interrelaciones* (10th ed., Issue December, pp. 352–360). McGraw-Hill.
- Fadare, F. T., Adefisoye, M. A., & Okoh, A. I. (2020). Occurrence, identification, and antibiogram signatures of selected Enterobacteriaceae from Tsomo and Tyhume rivers in the Eastern Cape Province, Republic of South Africa. *PLOS ONE*, 15, 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238084>
- Feitelson, E. (2012). What is water? a normative perspective. *Water Policy*, 14(SUPPL. 1), 52–64. <https://doi.org/10.2166/wp.2012.003b>
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02045>

- Howland, J. L. (1996). Preparación de ADN genómico bacteriano. In F. Ausubel (Ed.), *Short protocols in molecular biology* (3rd ed., Vol. 24, Issue 1, p. 68). Biochem. Educ.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.1996.5690240143>
- Jorgensen, J., Carrol, K., & Funke, G. (2018). Manual de microbiología clínica. In P. Michael (Ed.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (11th ed.). ASM Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00232-2>
- Koneman, E. (2016). *Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology* (P. C. Schreckenberger (ed.); 7th ed.). LWW.
- MAATE. (2015). Revisión y actualización de la norma ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua. In *Registro Oficial No. 387* (Issue 97).
<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155128.pdf>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). Diversidad procarionta en el contexto filogenético. In F. Ruiz (Ed.), *Brock, Biología de los microorganismos* (12th ed., pp. 480–500). Person.
- MSP. (2021). *Enfermedades transmitidas por agua y alimentos y otras intoxicaciones alimentarias*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/GACETA-GENERAL-ETAS-SEM-30.pdf>
- Naranjo Gaybor, S. J., & Valdivieso Menéndez, M. L. (2022). Diagnóstico de la contaminación de las descargas de las aguas residuales generadas en la ESPE, Sede Santo Domingo y diseño de la planta de tratamiento [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. In *Dspace ESPE*. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/31522>

- OMS. (2017). *Enfermedades diarreicas*. Who.Int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- OMS. (2020, April 30). Inocuidad de los alimentos. *Who.Int*, 1–7. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Orozco, C., Serrano, A., & Delgado, N. (2002). Contaminacion ambiental una visión desde la química. In M. López (Ed.), *Parainfo S.A* (1st ed.). Editores Thomson.
<http://www.scielo.org.co/pdf/inno/v12n20/v12n20a07>
- Perlman, H. (2017). *La Ciencia del Agua para Escuelas: Uso doméstico del agua*. USGS.
<https://water.usgs.gov/gotita/wudo.html>
- Pulido, S. P. (2016). *Origen y características de las aguas residuales*. Google Sites; Google sites. <https://sites.google.com/site/ptaruniminuto/origen-y-caracteristicas-de-las-aguas-residuales>
- Riedel, S., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., Sakanari, J. A., Hotez, P., & Mejia, R. (2015). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (S. Riedel (ed.); 28th ed.). McGraw-Hill.
<https://books.google.com/books?id=PumOCgAAQBAJ>
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica*, 22(4), 238–245.
<https://doi.org/10.1157/13059055>

Ryan, K., & Ray, G. (2010). Bacterias patógenas. In S. Olivares (Ed.), *Microbiología Médica* (5th ed.). McGraw-Hill.

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>

Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2010). *Prescott 's Microbiology* (S. Prescott (ed.); 10th ed.). McGraw-Hill.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1–2), 203–214.
<https://doi.org/10.1089/10665270050081478>