



# 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

Autores: Cusme Vera, Brandon Adolfo y Delgado Quiñonez, Gustavo Harrison

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Directora: Naranjo Gaybor, Sandra PhD.

16 de agosto del 2022



- La OMS reportó en 2020 que una de cada 10 personas se enferma anualmente por ingesta de alimentos contaminados de los 420 000 personas mueren cada año.
- Las enterobacterias son microorganismos patógenos presentes en aguas residuales los cuales son indicadores de contaminación fecal del agua.
- Estos microorganismos provocan enfermedades gastrointestinales en los seres humanos. Algunos géneros representativos: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.
- Según (Jorgensen, 2018) algunos géneros de enterobacterias presentan múltiples mecanismos de resistencia a antimicrobianos lo que dificulta los tratamientos clínicos.
- Este estudio se justifica en caracterizar bioquímica y molecularmente enterobacterias a partir de aguas residuales que son descargadas directamente en cuerpos de agua.



## Objetivo general

- Aislar, caracterizar e identificar 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.

## 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.



# MARCO TEÓRICO

## El agua

### Propiedades

- Densidad
- Ópticas
- Químicas
- Térmicas
- Tensión superficial
- Punto de E y F

### Tipos de uso

- Doméstico
- Industrial
- Agrícola
- Recreación
- Obtención de energía
- Paisajismo

### Fuentes de contaminación

- Fuente puntual
- Fuente no puntual

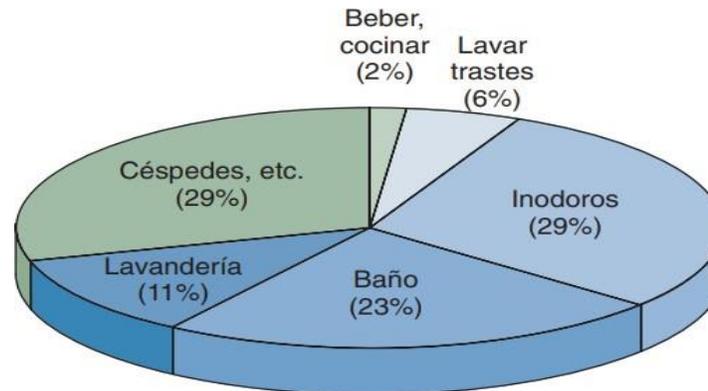
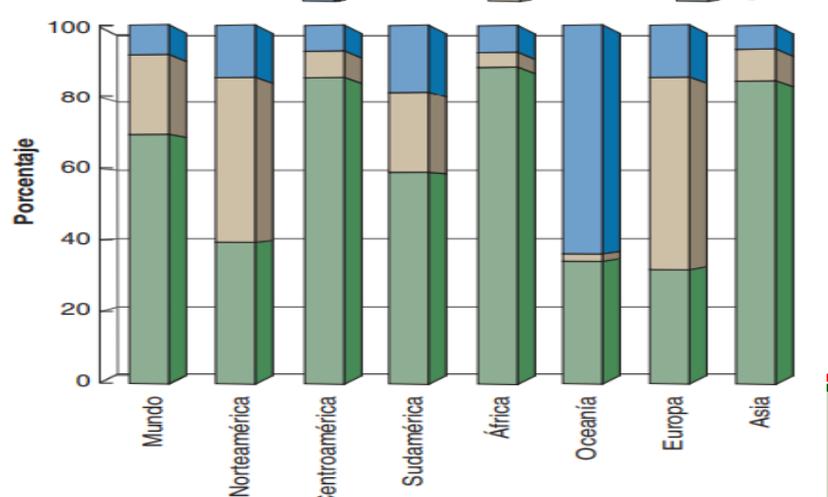
### Aguas residuales

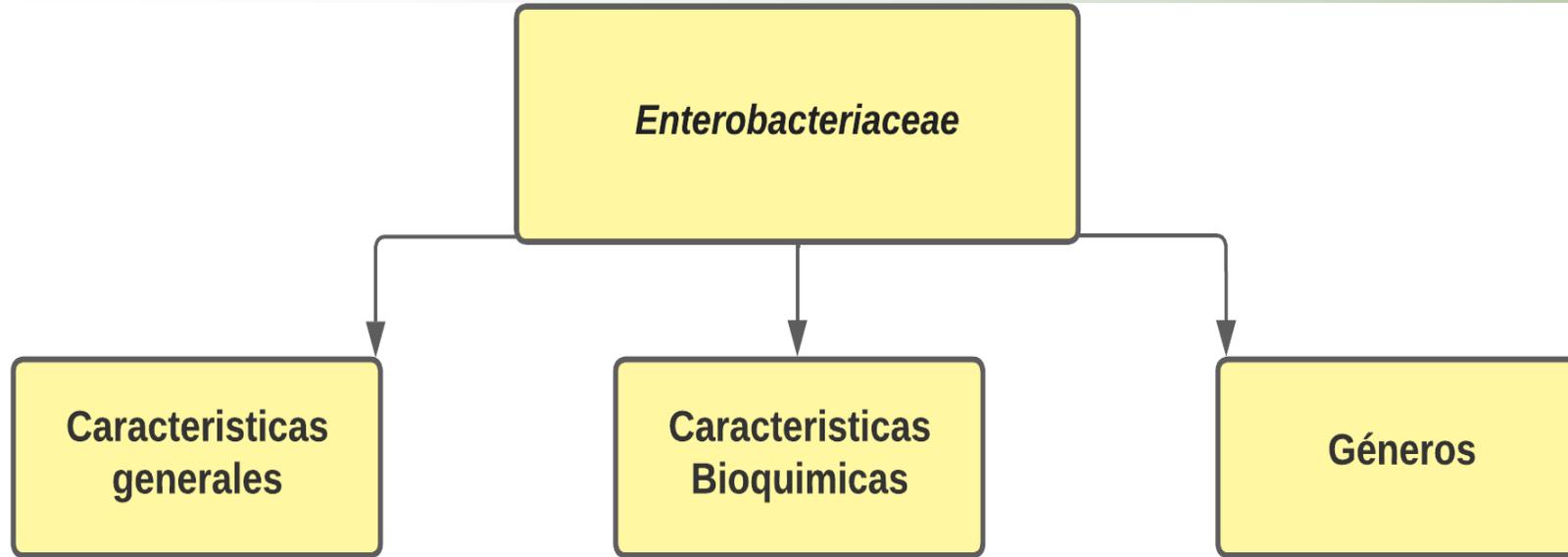
- Agua residual doméstica
- Agua residual urbana
- Agua residual industrial
- Aguas residuales agrícolas
- Aguas de lluvias

### Caracterización físico-química y microbiológica

- Coliformes totales y fecales
- Materia orgánica
- O.D
- DBO
- DQO
- Sólidos
- pH
- Metales pesados
- N
- P

Cómo se utiliza el agua



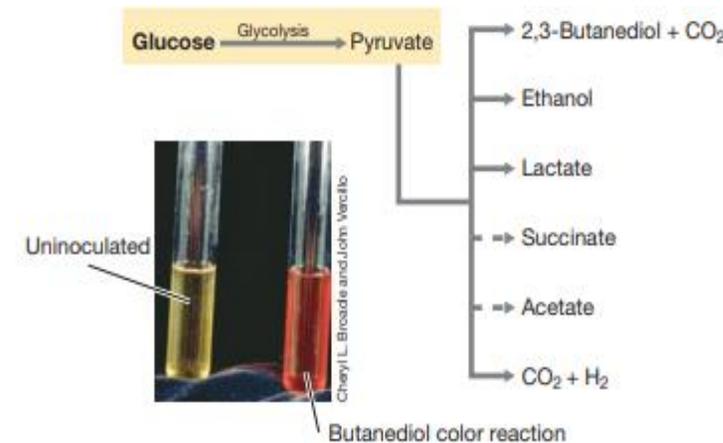


- Varillas o cocobacilos (0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,6 a 6,0  $\mu\text{m}$  de largo).
- Gram negativos.
- Aerobias o anaerobias facultativas.

Fermentadores mixtos  
Fermentadores del butanediol

De importancia clínica:  
*Salmonella*, *Shigella*,  
*Klebsiella*, *Yersinia* y  
*Erwinia*.

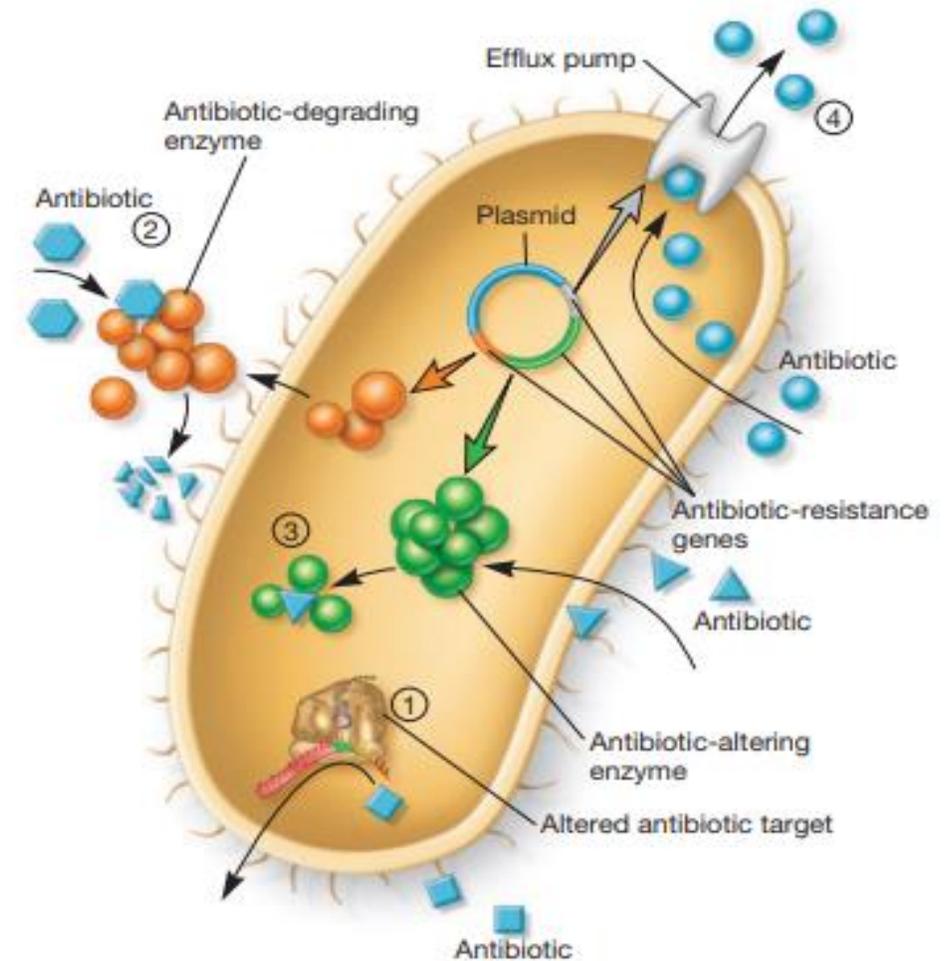
Otros: *Escherichia*,  
*Enterobacter*, *Serratia*,  
*Proteus*, etc.



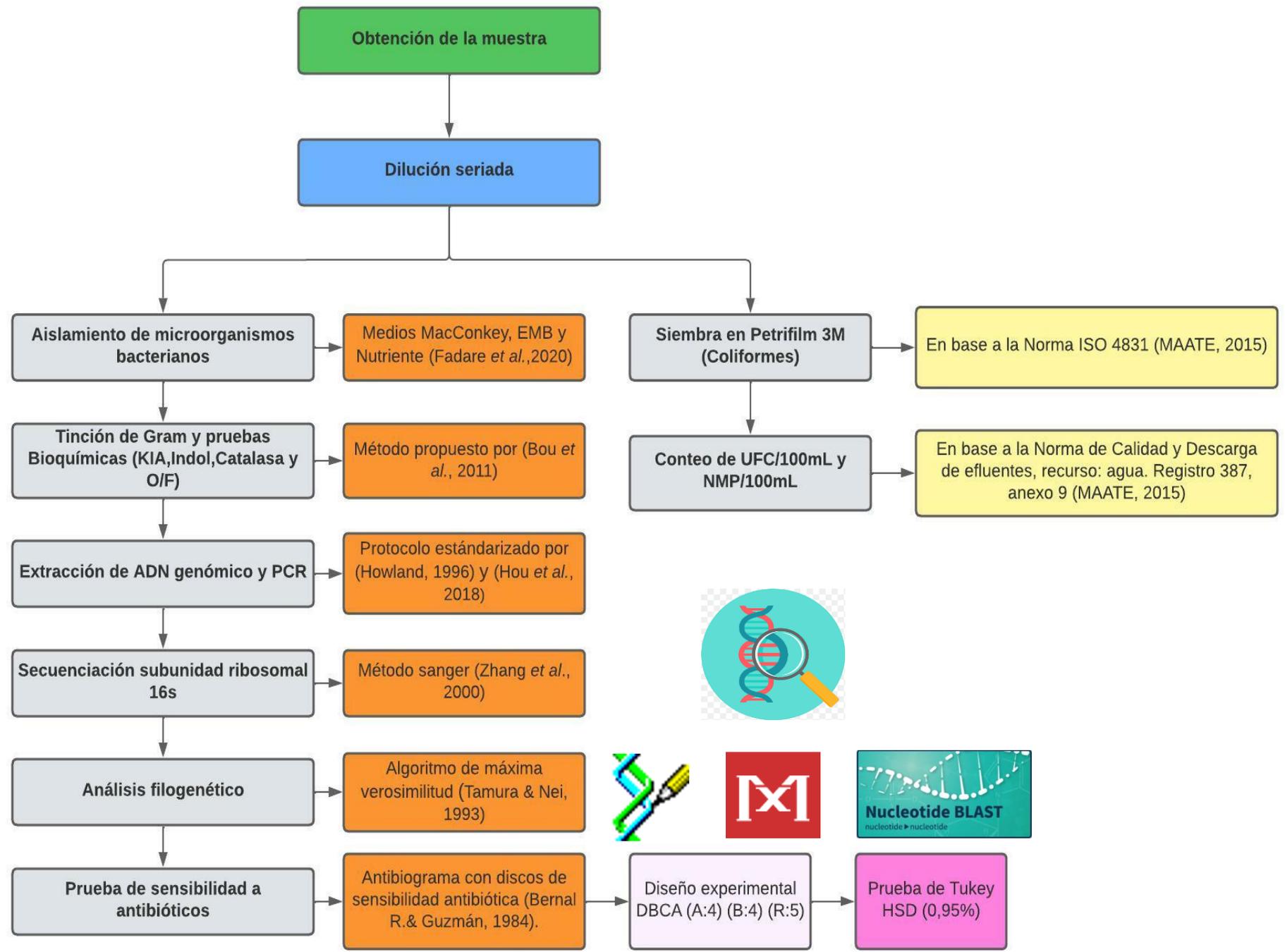
Tipo de antibiótico	Descripción
Medicamentos antimicrobianos sintéticos	Análogos del factor de crecimiento y quinolonas
Fármacos antimicrobianos naturales: antibióticos	Antimicrobianos producidos por microorganismos producidos bacterias y hongos inhiben o matan a otros microorganismos.

## Mecanismos de resistencia

1. Modificación de la molécula diana
2. Modificación del antibiótico
3. Acceso restringido a la diana
4. Bombas de flujo
5. Adquisición de genes de resistencia



# METODOLOGÍA



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Amplificación de ADN bacteriano (subunidad 16s)

Cebadores usados

16S\_rRNAF (5'– AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3')

16S\_rRNAR (5'– ACGGATACCTTGTTACGACTT– 3')

### Componentes para PCR de ADN genómico bacteriano

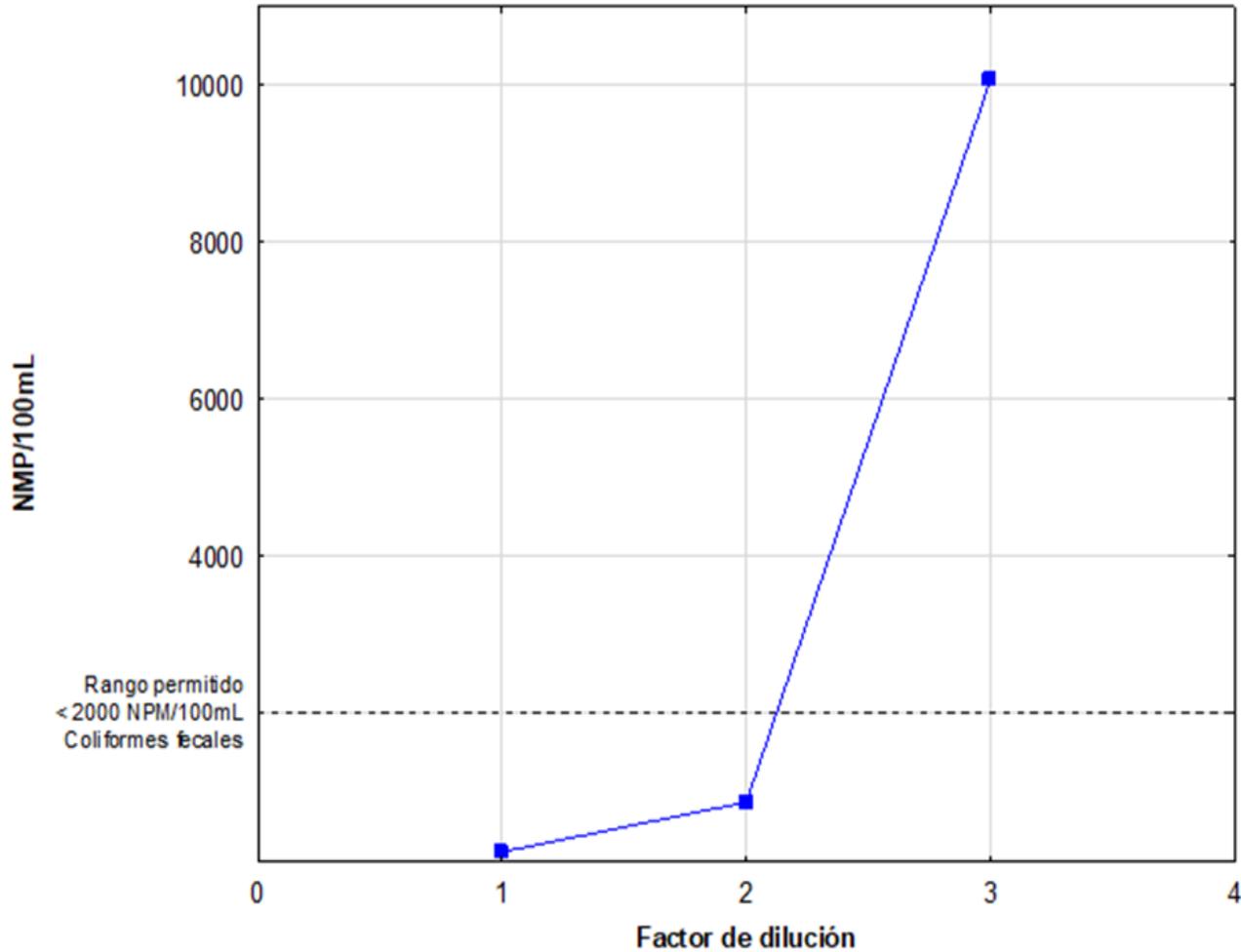
Reactivo	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de reacción (µL) (1rxn)	Volumen de reacción (µL) (8rxn)
Agua UP	-	-	-	10,5	84
BlaTaq 2X PCR MasterMix	x	2x	2x	12,5	100
Cebador forward	µM	100	10	1	8
Cebador reverse	µM	100	10	1	8
ADN	-	-	-	1	8
	Total			25	200

### 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



## Conteo de UFC/100mL y NPM/100mL

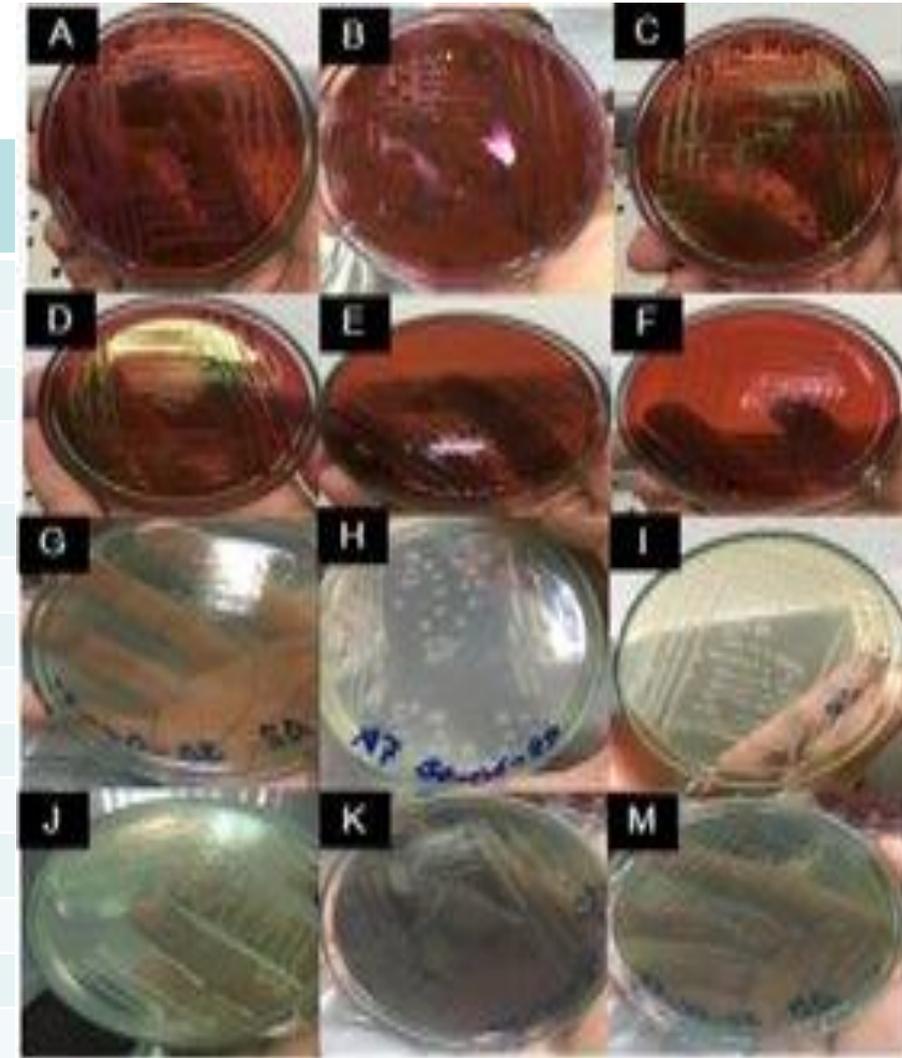


Dilución	Conteo de colonias	UFC/100 mL	NMP/100 mL
(1) $10^{-2}$	300	300	219
(2) $10^{-3}$	102	1020	855
(3) $10^{-4}$	94	9400	> 2000



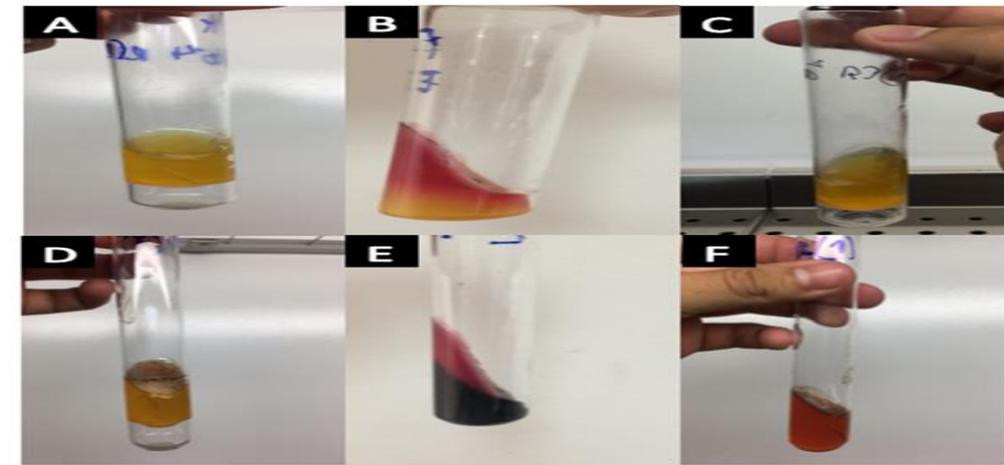
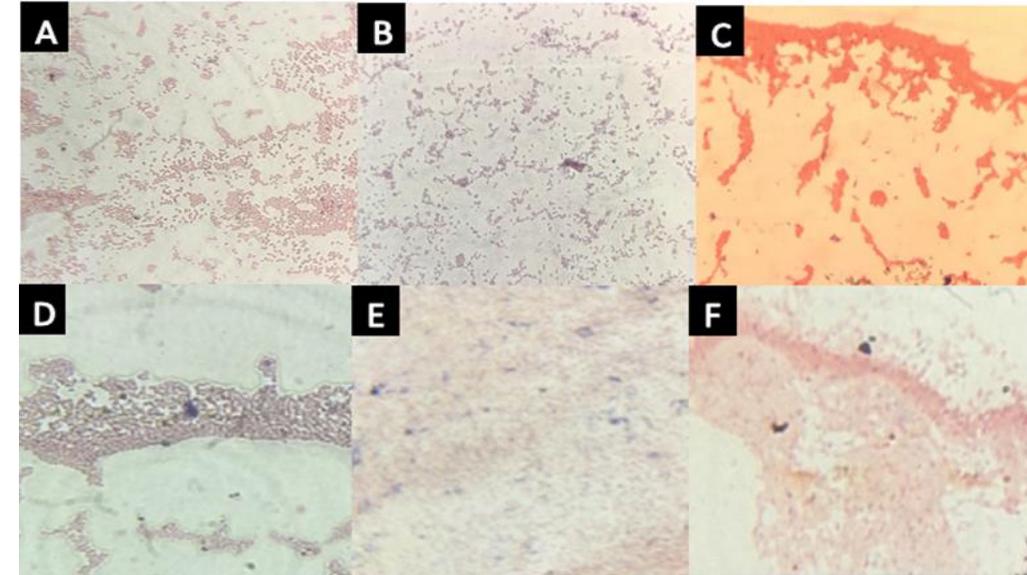
## Aislamiento microbiológico inicial (10-03-2022)

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

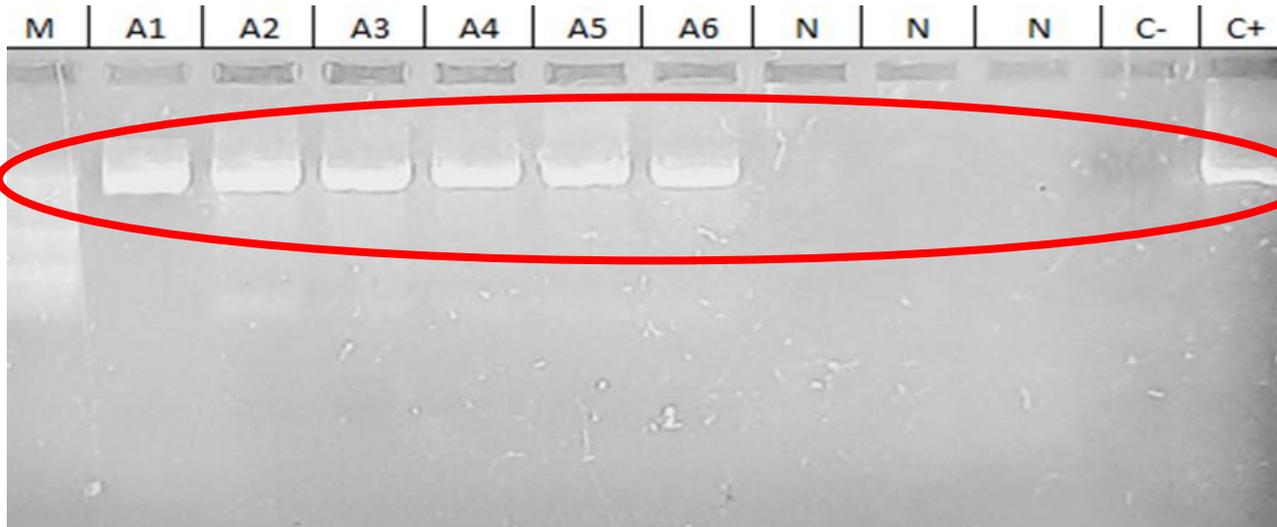


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

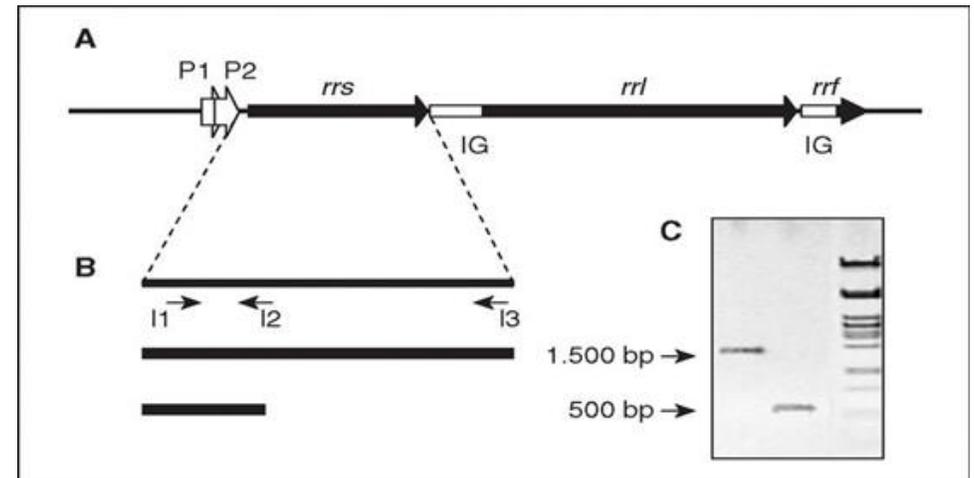
Prueba bioquímica	Tinción Gram	Catalasa	Indol	O/F	KIA	
					Produce Gas y/o H <sub>2</sub> S	
# de Aislado						
A1	-	+	-	F	Acido/Acido	G / A
A2	-	+	-	F	Alcalino/Acido	A / A
A3	-	+	+	F	Acido/Acido	G / A
A4	-	+	-	F	Acido/Acido	G/A
A5	-	+	-	F	Alcalino/Acido	A/H
A6	-	+	-	O	Alcalino/Alcalino	A/A



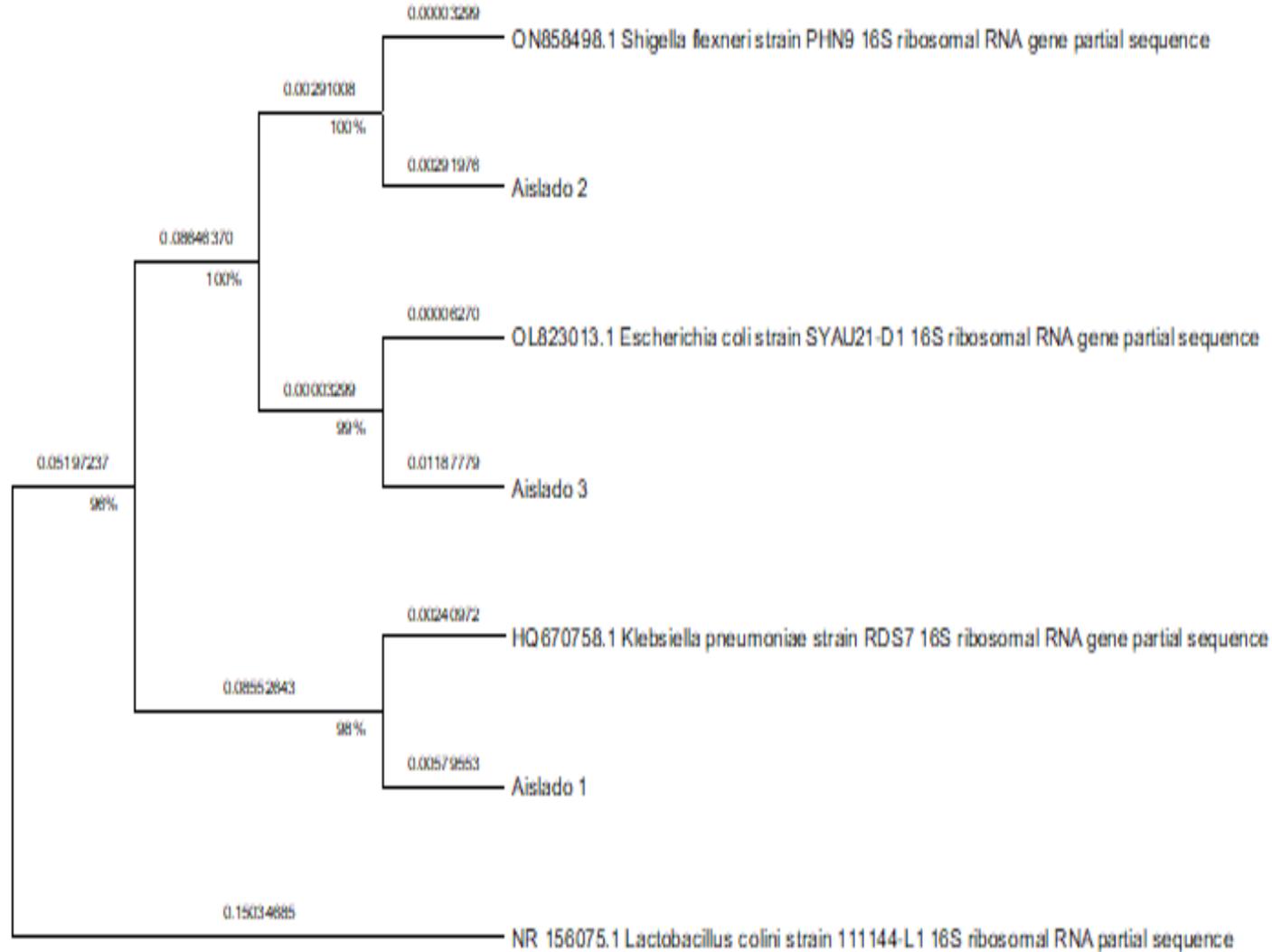
## Amplificación de ADN bacteriano



1500 pb



## Análisis filogenético



N°	Género y especie	Longitud de secuencia (pb)	Porcentaje de identidad
A1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1369 pb	98,98 %
A2	<i>Shigella flexneri</i>	1407 pb	99,64 %
A3	<i>Escherichia coli</i>	1401pb	98,85 %



## Análisis de sensibilidad antibiótica

### 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			

### Prueba de Tukey HSD para factor: Antibióticos

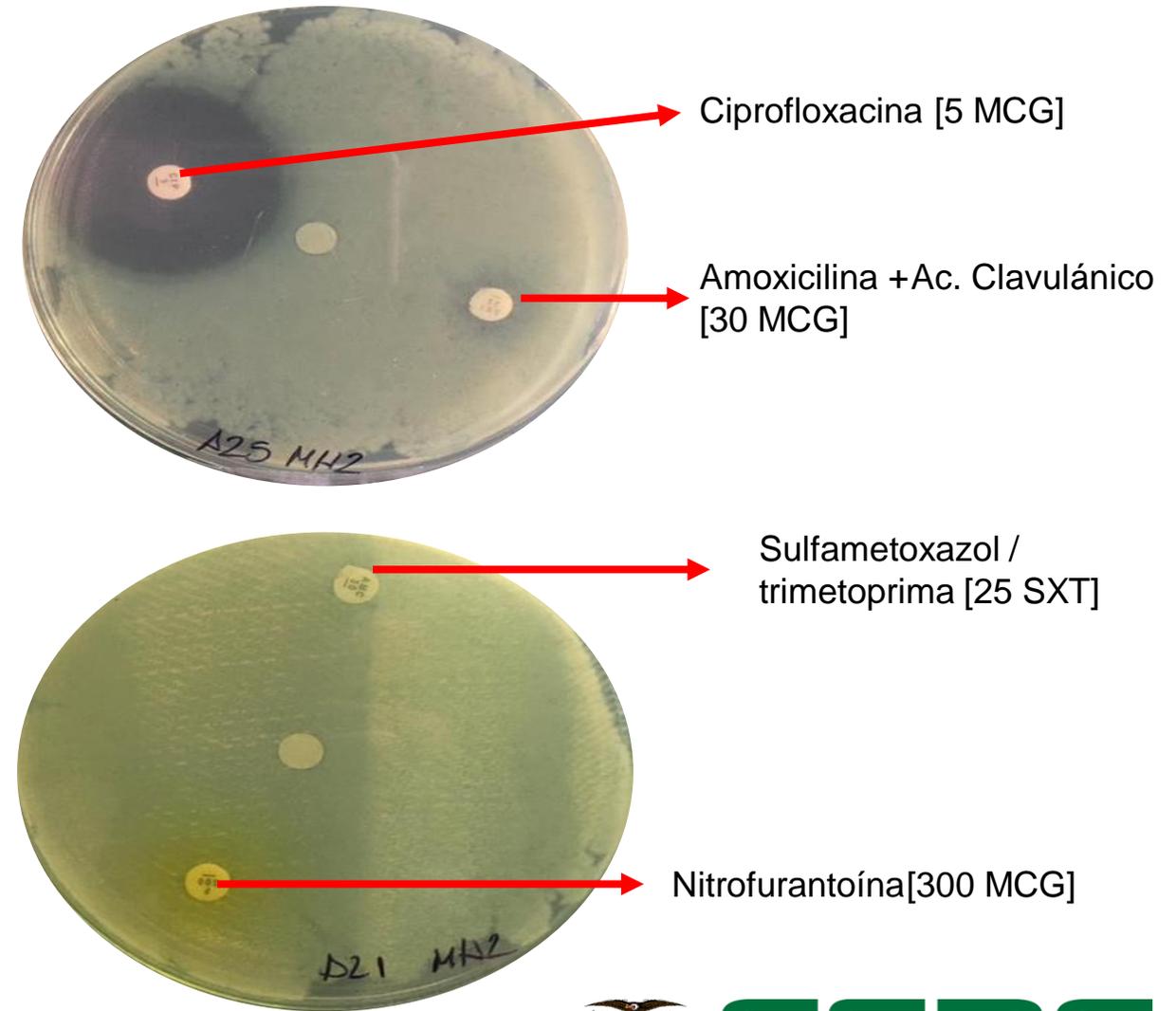
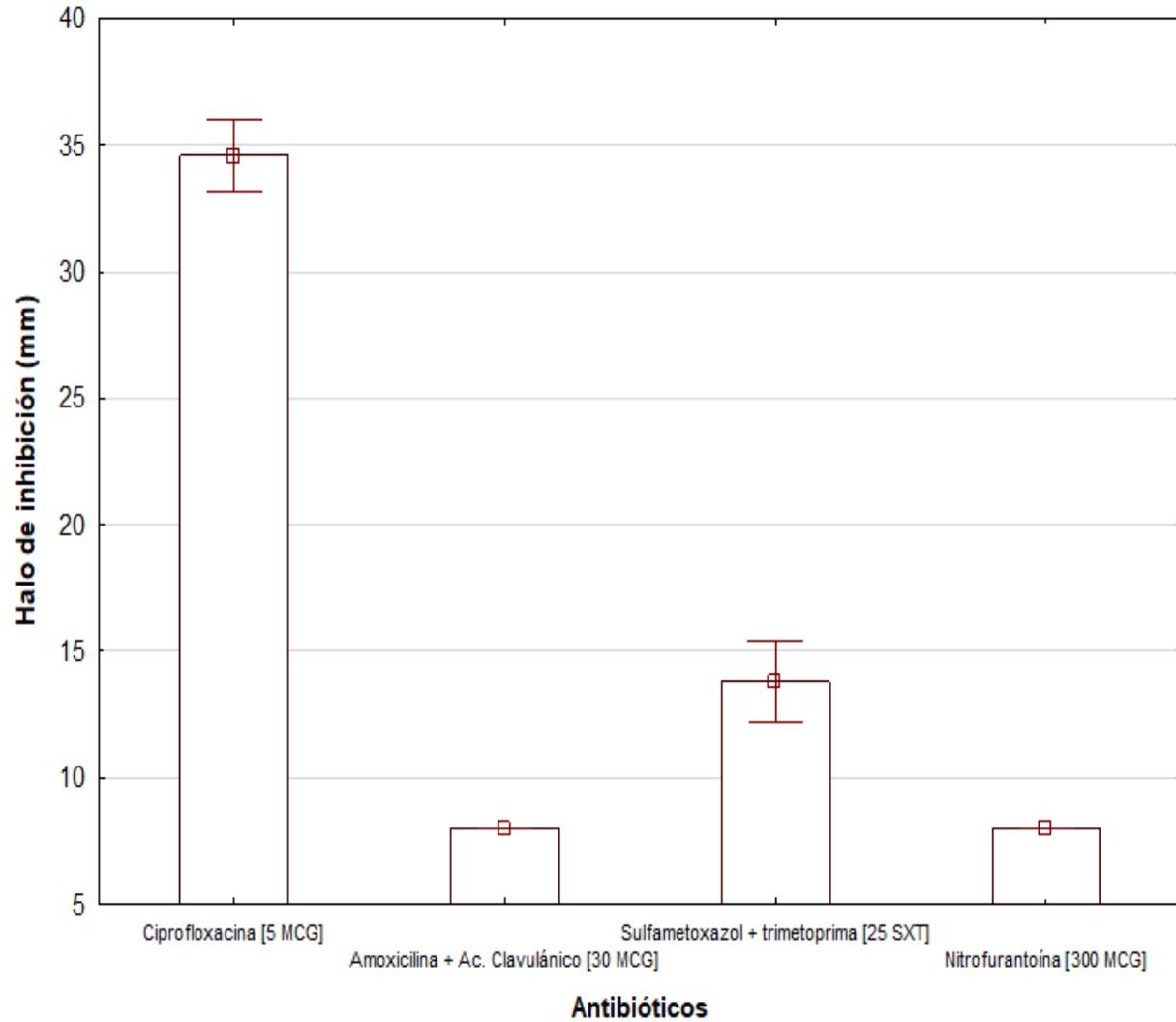
Antibióticos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nitrofurantoína [300 MCG]	20	15,15	0,273252	A
Amoxicilina + Ac. Clavulánico [30 MCG]	20	15,3	0,273252	B
Sulfametoxazol + trimetoprima [25 SXT]	20	23,25	0,273252	C
Ciprofloxacina [5 MCG]	20	32,95	0,273252	D

### Prueba de Tukey HSD para factor: Enterobacterias

Enterobacterias	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<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

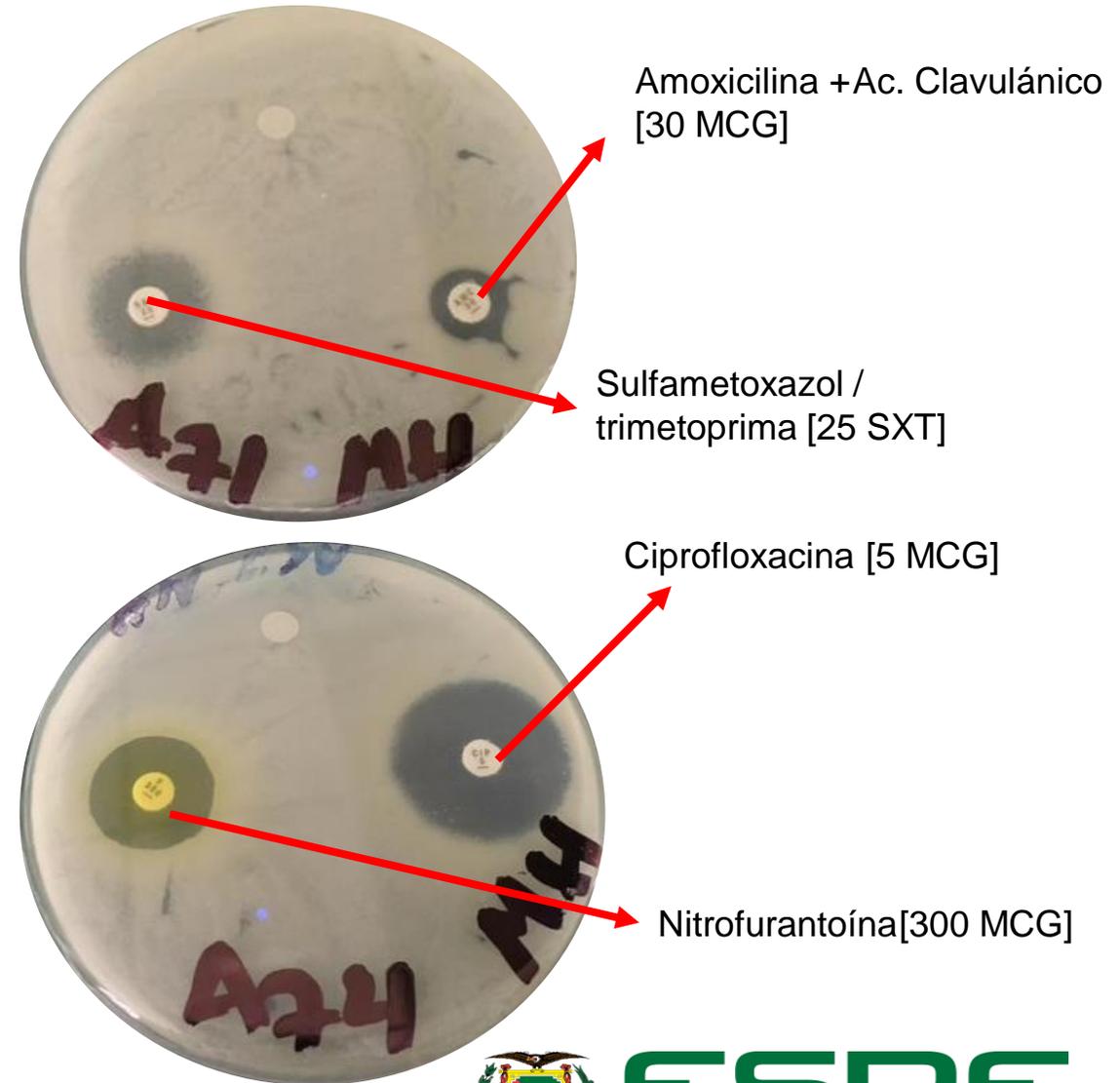
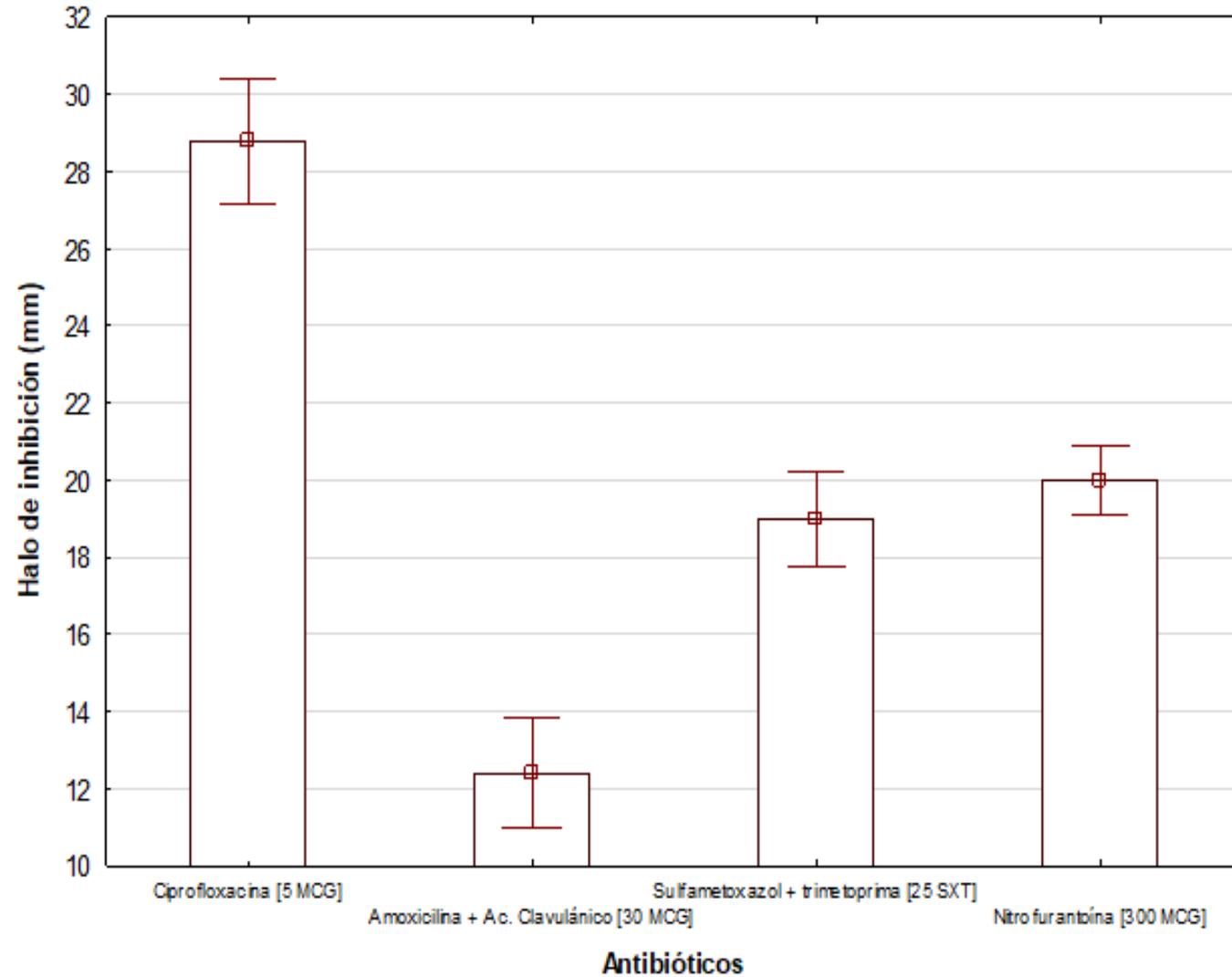


## *Klebsiella pneumoniae*



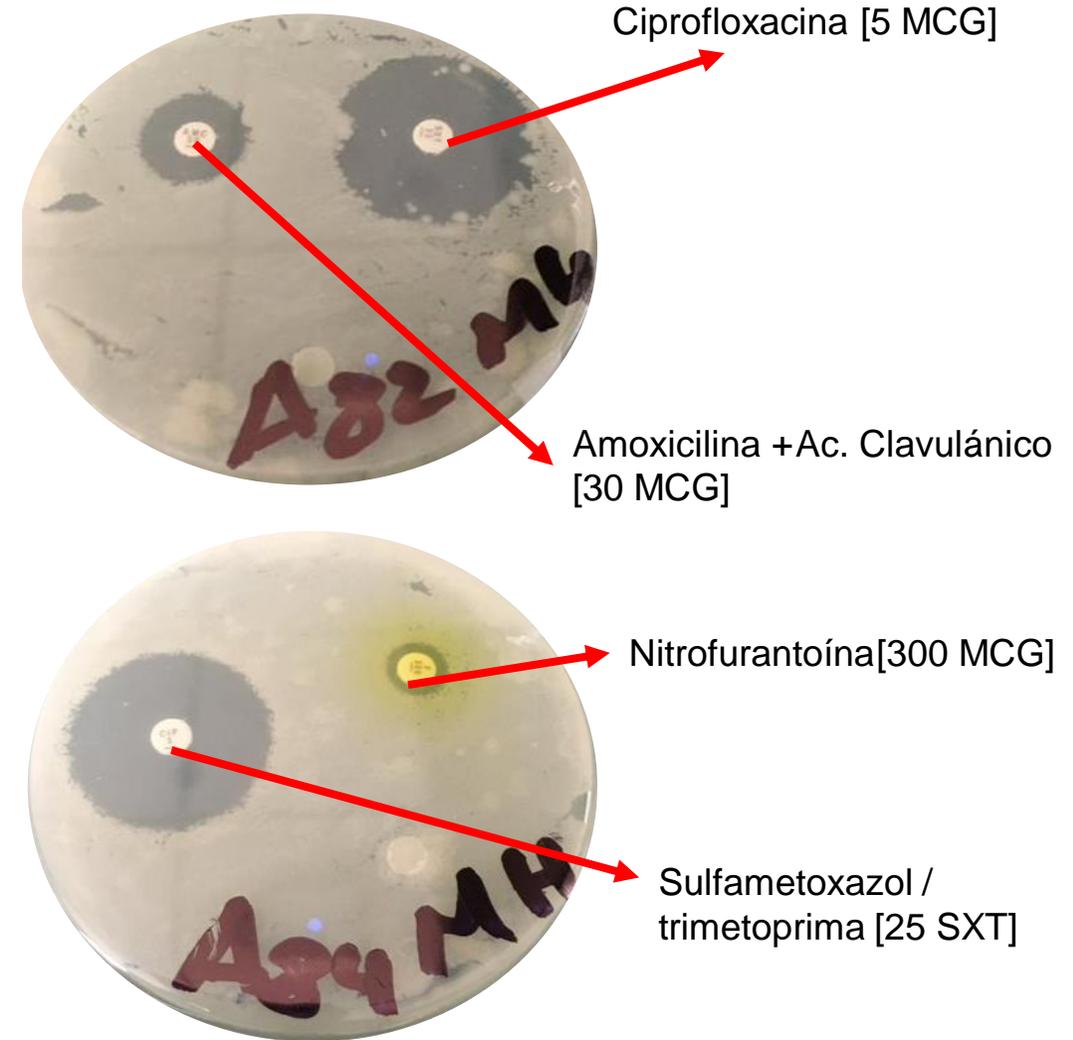
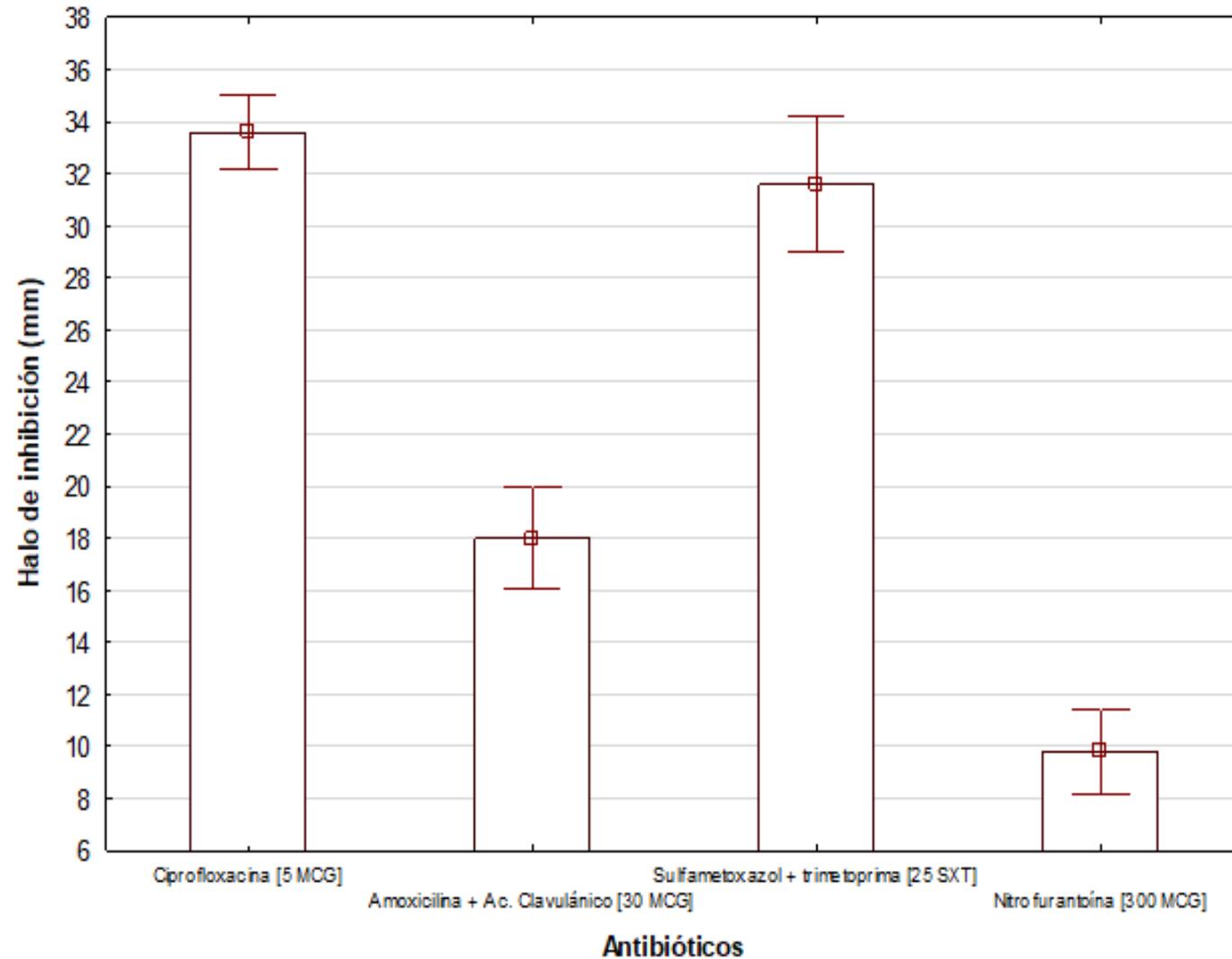
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## *Shigella flexneri*



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## *Escherichia coli*



Se aceptó la hipótesis nula (1), es decir existe presencia de enterobacterias en punto de descarga de aguas negras y grises.

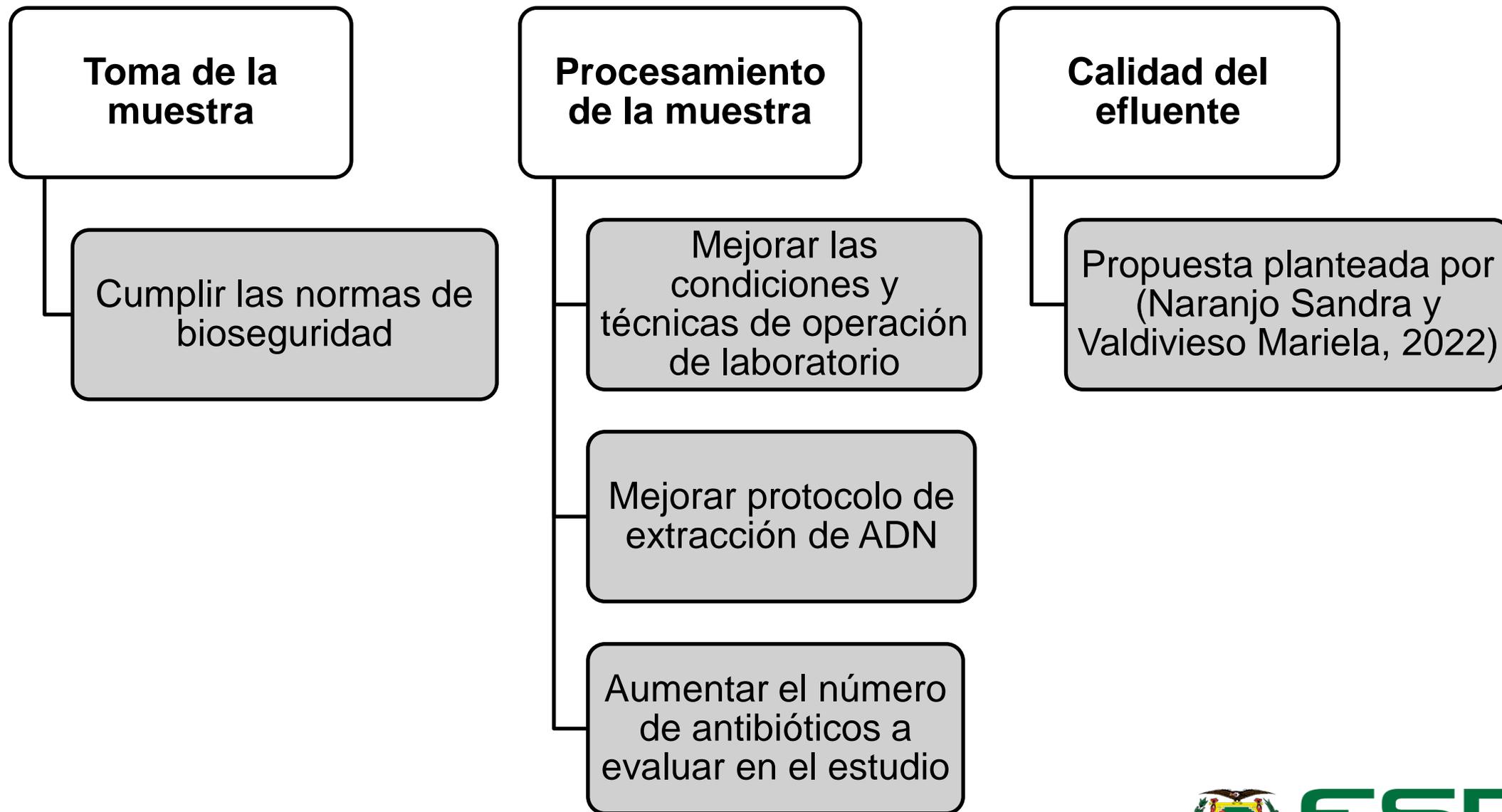
Se obtuvo tres bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que son: *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*.

Se aceptó la hipótesis alternativa (2), es decir al menos un aislado presentó resistencia a antimicrobianos.

*K. pneumoniae* presenta mayor resistencia antibiótica en comparación a las otras cepas bacterianas. La ciprofloxacina inhibió todas las cepas bacterianas.



# RECOMENDACIONES



# AGRADECIMIENTOS

A Armando Reyna y Sandra Naranjo.

A Katty Medina, Vanessa Armijos y Mariela Valdivieso.

A Evelyn C, Kevin C, Génesis D y Jéssica L.

A Mateo B, Hugo A, Jorge C y Jefferson J.

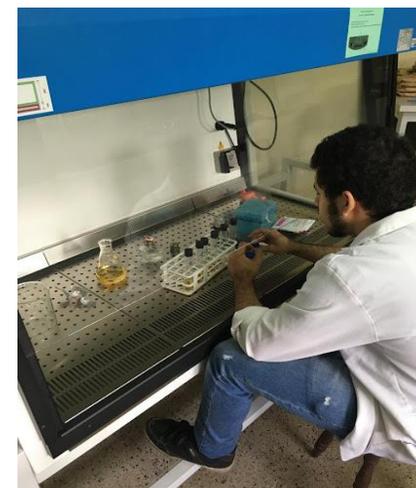
A nuestras familias

A quien nos brindó su ayuda

**¡Muchas gracias a todos!**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**MUCHAS  
GRACIAS**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA