

**Aplicación de Métodos Microbiológicos y Químicos en la Exploración de Bacterias
Resistentes a Antibióticos en Aguas y Lodos Activados Hospitalarios.**

Diego Fernando Chamorro Toro

Universidad de Caldas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Programa de Biología

Manizales - Caldas

2023

**Aplicación de Métodos Microbiológicos y Químicos en la Exploración de Bacterias
Resistentes a Antibióticos en Aguas y Lodos Activados Hospitalarios.**

Diego Fernando Chamorro Toro

Director: PhD: Milton Rosero Moreano

Codirector: Mag: Duverney Gaviria Arias

Trabajo de grado para optar al título de:

Biólogo

Modalidad Investigación

Universidad de Caldas

Manizales – Caldas, 2023

Dedicatoria

A mis padres y hermana por el constante apoyo y cariño en este proceso formativo y en cada uno de los logros obtenidos y por venir

«Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero los hay que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles»

Bertolt Brecht.

Tabla de contenido

Resumen Ejecutivo.....	5
Descripción.....	7
Pregunta de investigación.....	9
Hipótesis.....	9
1. Objetivo general:.....	9
1.1. Objetivos específicos:.....	9
2. Marco Teórico.....	10
2.1. Panorama de la resistencia bacteriana a antibióticos.....	10
2.2. Resistencia bacteriana en Colombia.....	13
2.3. Contaminación xenobiótica por antibióticos.....	16
2.4. Tratamiento de aguas residuales hospitalarias.....	17
3. Microorganismos Gram positivos.....	18
4. Microorganismos Gram negativos.....	19
5. Antibióticos.....	20
5.1. β -Lactámicos.....	20
5.2. Amoxicilina.....	21
5.3. Cefalexina.....	22
5.4. Aminoglucósidos.....	22
5.5. Quinolonas.....	23
6. Tipos de resistencia bacteriana.....	24
6.1. Natural o intrínseca.....	25
6.2. Adquirida.....	25
6.3. Mecanismos resistencia bacteriana.....	25
6.3.1. Las β -lactamasas.....	25

6.3.2.	Cloranfenicol acetil transferasa.	26
6.3.3.	Alteración de los blancos.....	26
6.3.4.	Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa.	27
6.3.5.	Bombas de eflujo.	27
7.	HPLC y técnicas analíticas para la determinación de contaminantes emergentes.	28
8.	Materiales y métodos.....	30
8.1.	Sitio de estudio y toma de muestras.	30
8.2.	Preparación y esterilización de material de trabajo.	33
8.3.	Medios de cultivo.	34
8.4.	Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.	35
8.5.	Condiciones Cromatográficas.	36
8.5.1.	Preparación y Extracción.....	37
8.6.	Análisis estadístico.	38
9.	Resultados y Discusión.	38
9.1.	Microbiológico.	38
9.1.1.	Bacterias heterotróficas totales.	39
9.1.2.	Bacilos Gram negativos agar MacConkey.	40
9.1.3.	Agar Chromocult Coliformes.	42
9.2.	Prueba de Resistencia antibióticos.	45
9.2.1.	Mueller Hinton Agar Heterotróficas totales.	45
9.2.2.	Agar selectivo <i>Chromocult</i> , Coliformes.	46
9.2.3.	Agar MacConkey Bacilos Gram negativos y Enterobacterias	49
9.3.	Presencia de amoxicilina y cefalexina en la PTAR Hospital Santa Sofía	51
9.3.1.	Curva de Calibración: LOQ, LOD, sensibilidad.....	52
9.3.2.	Detección y cuantificación.	53
9.4.	Identificación de antibióticos presentes.....	55

9.5. Perspectivas.....	56
10. Conclusiones.....	59
Bibliografía	62

Lista de Ilustraciones y Tablas

Ilustración 1. Estructura membrana Gram positiva	19
Ilustración 2. Estructura membrana Gram negativa	20
Ilustración 3. Anillo lactámico, tipos de antibióticos β -lactámicos	21
Ilustración 4. Molécula de amoxicilina.....	21
Ilustración 5. Molécula de cefalexina.	22
Ilustración 6. Estructura representativa de un aminoglucósido	23
Ilustración 7. Estructura básica de las quinolonas.	24
Ilustración 8. Efecto de β -lactámicos en organismos Gram negativos.....	26
Ilustración 9. Localización de la E.S.E Hospital Departamental Universitario Snt Sofía.....	31
Ilustración 10. PTAR Hospital Santa Sofía.....	32
Ilustración 11. Recolección muestras PTAR Santa Sofía.	33
Ilustración 12. Diluciones seriadas y sembrado en placas.....	33
Ilustración 13. Prueba de susceptibilidad, método dilución en agar	36
Ilustración 14. Crecimiento de colonias en agar Mueller Hinton.	39
Ilustración 15. Agar Mueller Hinton, bacterias heterotróficas totales	40
Ilustración 16. Crecimiento de colonias en agar MacConkey	41
Ilustración 17. Agar MacConkey: Bacilos Gram negativos y enterobacterias	41
Ilustración 18. Crecimiento de colonias en agar CHR en lodos y aguas.....	43
Ilustración 19. Medio diferencial Chromocult..	43
Ilustración 20. Total, de colonias encontradas en medio diferencial.	44
Ilustración 21. Porcentaje de resistencia Bacterias Heterotróficas totales agar Mueller Hinton .	45
Ilustración 22. Porcentaje coliformes resistentes tipificados, agar Chromocult.....	47
Ilustración 23. Porcentaje bacilos Gram negativos, entero bacterias resistentes	49
Ilustración 24. Bacterias heterotróficas totales	50
Ilustración 25. Curva calibración estándares amoxicilina, cefalexina.....	52
Ilustración 26. Comparación estándares de calibración y muestra real amoxicilina cefalexina..	54
Tabla 1. Preparación de diluciones de antimicrobianos para dilución en agar.	34
Tabla 2. Gradiente: método identificación antibióticos (amoxicilina, cefalexina)..	37
Tabla 3. Tipificación Agar MacConkey.....	41
Tabla 4. Tipificación en agar Cromogeneo Chromocult	44
Tabla 5. Estimación lineal, calibración amoxicilina.	52
Tabla 6. Estimación lineal, calibración cefalexina	53
Tabla 7. Concentraciones de antibióticos PTAR Santa Sofía.....	54
Ecuación 1. Porcentaje de Resistencia.	46

Resumen Ejecutivo.

La resistencia de las bacterias a distintos antibióticos ha constituido un problema de salud pública a nivel mundial, puesto que puede desencadenar infecciones difíciles de tratar, contaminación hídrica y ambiental, a la par el vertimiento de efluentes no tratados, constituye una de las principales causas de la pérdida de calidad de fuentes hídricas y se considera un mecanismo potencial de propagación de patógenos y generación de riesgos ambientales. Particularmente los hospitales se han convertido en sitios de descargas de fármacos como antibióticos hacia el medioambiente, por esta razón resulta pertinente el estudio de efluentes hospitalarios, considerando representan un problema de particular importancia al ser sitios en donde confluye materia orgánica, antibióticos, antisépticos, detergentes, solventes y otros fármacos utilizados en el tratamiento clínico, a los que se suman excretas y secreciones humanas contaminadas por diferentes tipos microorganismos. De esta manera este tipo de efluentes podrían ser reservorios para la selección de bacterias resistentes, contribuyendo a la generación de presión selectiva ante los microorganismos autóctonos del medio, favoreciendo la aparición y diseminación de cepas resistentes.

En esta investigación se realizó la exploración, y análisis de susceptibilidad en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la E.S.E Hospital Departamental Universitario Santa Sofía en la ciudad de Manizales, para lo que se emplearon técnicas de cultivo como, diluciones seriadas y ensayo biológico de susceptibilidad “dilución en agar”, enfrentando a las bacterias presentes en este sitio a diferentes concentraciones de antibióticos. Se determinó el porcentaje de resistencia para 4 tipos de antibióticos (gentamicina, ceftriaxona, ampicilina, ciprofloxacina) mostrando resistencia creciente en la PTAR Hospitalaria. Encontrando resistencia persistente a la ciprofloxacina, y ceftriaxona, mayor al 80 % en bacterias heterotróficas totales, el grupo de los coliformes mostros la misma tendencia de resistencia a la ceftriaxona obteniendo

porcentajes de 48 % en la MIC y mayores al 90 % en las tres concentraciones inferiores; para la ciprofloxacina se encontró resistencia en la MIC usada con valores superiores al 90. En el grupo de los bacilos Gram negativos y las Enterobacterias, (fermentadores y no fermentadores de lactosa), se pudo observar una tendencia a la adquisición de resistencia a la ampicilina, mostrando porcentajes de resistencia mayores al 90 % en la concentración menor. ($1 \mu\text{g L}^{-1}$). A su vez mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC se identificó la presencia de dos fármacos (amoxicilina y cefalexina) en las aguas del afluente de la PTAR, en 5 muestras y cuantificando cefalexina en una concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ señalando que los contaminantes emergentes como los antimicrobianos están generando el fenómeno de la RAM (resistencia anti microbiana).

Palabras clave: Presión Selectiva, BLEE, Resistencia, Ecosistema, Contaminantes, RAM

Descripción.

Bajo un contexto de creciente desarrollo industrial y urbano se han desencadenado problemas ambientales por el vertimiento de aguas residuales, industriales y domésticas al medio ambiente. La liberación de compuestos tóxicos y bacterias patógenas resistentes a varios compuestos químicos presentes en estas aguas, contribuyen a la contaminación de los ecosistemas acuáticos, como ríos y quebradas, causando la disminución de la calidad de los recursos hídricos disponibles (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

A la par, el consumo significativo de agua por parte de hospitales ha generado altos volúmenes de aguas residuales cargadas con compuestos químicos tóxicos, residuos de drogas y microorganismos, entre estos. Diversas cepas bacterianas patógenas o potencialmente patógenas pueden adquirir resistencia por presión selectiva la cual podría ser transferida a los demás microorganismos de su entorno, aprovechando las condiciones que este tipo de matriz ofrece (Maroneze et al., 2014a, 2014b). Se ha identificado, inclusive, que algunos de estos microorganismos presentan multirresistencia tanto a antibióticos como a elementos radiactivos, metales pesados y compuestos órgano-halogenados (Ramos. C 2008).

Algunos estudios demuestran que el agua constituye el principal mecanismo de generación de resistencia bacteriana, siendo una matriz idónea que facilita el transporte e introducción tanto de genes de resistencia como de microorganismos al ecosistema (Acevedo et al., 2015). Con base en lo anterior, se puede afirmar que, los efluentes hospitalarios se han convertido en grandes generadores de aguas residuales, de las cuales se estima que cerca del 80% contribuye a la generación de desechos con una gran carga de contaminación (Ramos et al., 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, la resistencia bacteriana a distintos antibióticos ha constituido un problema de salud pública, ya que estas podrían desencadenar infecciones que pueden llegar a ser mortales si no se ejecutan estrategias necesarias para su control. Existe una marcada relación entre los residuos de antibióticos en ecosistemas y el aumento de bacterias resistentes a ellos, el mal uso de antimicrobianos en entidades hospitalarias, uso doméstico, y agrícola ha generado fuertes presiones sobre las comunidades de bacterias nativas. Entre las más comunes se destacan las enterobacterias, las cuales pueden desarrollar resistencia mediante la transmisión horizontal de genes, implicando un deterioro de la calidad ambiental, aumento de infecciones persistentes y enfermedades en los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres (Acevedo et al., 2015).

Las bacterias potencialmente patógenas liberadas constantemente en las aguas albergan genes de resistencia a antibióticos que se insertan en plataformas genéticas móviles (plásmidos, transposones e integrones) capaces de propagarse entre las comunidades bacterianas que viven en el agua y en el suelo (Vanegas et al., 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que la resistencia de cepas bacterianas del género *Aeromonas* sp muestran resistencia natural a distintos antibióticos como la eritromicina, ampicilina y amoxicilina, de igual manera se ha analizado patrones de resistencia a las cepas de *E. coli*, presentando porcentajes significativos de resistencia a antibióticos como, amoxicilina, trimetropin sulfa y tetraciclina (Acevedo et al., 2015). Teniendo en cuenta la problemática expuesta, en esta investigación se realizó un análisis de antibióticos presentes en los efluentes de la entidad hospitalaria por medio de cromatografía líquida HPLC, la cual nos permite separar y analizar los componentes de las muestras, paralelo a esto se realizó una exploración mediante análisis microbiológicos utilizando técnicas como: diluciones seriadas, pruebas de susceptibilidad frente a 5 antibióticos (ceftriaxona, ceftazidima, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina,) utilizando la técnica de dilución en agar (Cavaliere, 2005).

Todo esto con el fin de evaluar el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias y correlacionar estos resultados con la presencia de antibióticos en las aguas residuales hospitalarias.

Pregunta de investigación.

¿Cuál es el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos encontradas en el efluente y recámara de lodos activados de la PTAR del hospital Santa Sofía en la Ciudad de Manizales?

Hipótesis.

Algunas de las bacterias aisladas de aguas residuales y lodos de la PTAR del hospital Santa Sofía presentan resistencia a los siguientes antibióticos: ceftriaxona, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina.

1. Objetivo general:

Evaluar el porcentaje de resistencia bacteriana en efluente de aguas residuales de hospital de mediana complejidad utilizando aproximaciones biológicas y químicas

1.1. Objetivos específicos:

- Explorar microbiológicamente las aguas y los lodos de la PTAR, empleando métodos selectivos de cultivo y pruebas de susceptibilidad a antibióticos.
- Identificar el porcentaje de resistencia a los antibióticos de las bacterias extraídas de aguas hospitalarias, mediante la técnica de dilución en agar.

- Determinar la concentración de amoxicilina y cefalexina en el afluente y en los lodos de la PTAR mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia HPLC.

2. Marco Teórico

2.1. Panorama de la resistencia bacteriana a antibióticos.

Bajo un contexto de desarrollo urbano a escala mundial, se han desencadenado diversas problemáticas ambientales que afectan tanto al hombre como a los demás seres vivos presentes en los ecosistemas. Tópicos emergentes como la contaminación ambiental por combustión de derivados del petróleo, el vertimiento indiscriminado de sustancias químicas, biológicas nocivas y el mal manejo de residuos en general, han ido deteriorando la calidad de vida y degradando en distintos niveles el bioma terrestre y acuático.

La creciente actividad humana ha representado un gran impacto en el medioambiente, desatando problemáticas como la generación de presión selectiva en los microorganismos terrestres y acuáticos, a causa de la mala disposición de residuos químicos y biológicos. En la actualidad la presencia de antibióticos, productos bactericidas y desinfectantes en las aguas residuales está promoviendo el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos, haciendo así más difícil el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos que no responden a los tratamientos con antibióticos convencionales, de esta manera aumentando los costos hospitalarios, al igual que la mortalidad y morbilidad en los humanos (Hernández Rodríguez, 2006).

Es sabido que, desde el descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX, se han identificado cepas resistentes a estos, lo que ha generado preocupación por parte de las autoridades de salud pública mundial, debido a que dicho problema se extiende a todos los

grupos etarios en todos los países del mundo sin distinción alguna (Ministerio de salud Chile, 2017). Por consiguiente, el desarrollo de antimicrobianos en el siglo XX contribuyó al tratamiento y manejo de enfermedades infecciosas y a su vez a la disminución de los índices de mortalidad y morbilidad. Sin embargo, este avance fue paulatino en países en desarrollo, por factores como la pobreza y falta de políticas de salud pública que reciben las poblaciones humanas (Ministerio de salud Chile, 2017).

Por tanto, se hace necesaria la implementación de estudios, planes de manejo y control de aguas residuales, afluentes hídricos, PTAR urbanas y hospitalarias para tener mayor vigilancia e incrementar el conocimiento sobre el tipo de xenobióticos presentes en sitios de vertimiento, junto a la implementación de métodos efectivos para su mitigación, evitando que se generen fenómenos como la presión selectiva en las comunidades de bacterias autóctonas, aportando a la disminución de la contaminación por antimicrobianos (Pallares-Vega et al., 2019; Wang et al., 2018).

Con las investigaciones desarrolladas por Alexander Fleming en 1928 y con sus observaciones sobre como el crecimiento de mohos que generaban halos circulares libres de bacterias inhibiendo el crecimiento de estas, los antibióticos se han considerado la familia de fármacos más importante para el mejoramiento de la salud humana, animal y la agroindustria (Acevedo Barrios et al., 2015). Pero, desde 1945, Fleming sugirió los riesgos potenciales ligados al uso de los antibióticos, él temía que su uso a gran escala seleccionara bacterias resistentes. En estudios hechos en su laboratorio, observó el desarrollo de bacterias sensibles a la penicilina, con estos experimentos dilucidó que estas conseguían multiplicarse en presencia de concentraciones crecientes de antibióticos, así constató que las bacterias sensibles habían sido destruidas y las bacterias resistentes se habían multiplicado sin límite (Florez & Sanchez, 2017).

En la actualidad el empleo inadecuado de antibióticos, antisépticos, desinfectantes junto a inexistentes o nulas prácticas de disposición final tanto en clínicas veterinarias, sector agrícola y el desconocimiento del impacto de estos componentes, ha generado en el medio el desarrollo de presión selectiva, genes de resistencia y producción de enzimas inhibidoras, como respuesta adaptativa de los microorganismos a estos factores. Facilitando así la difusión de estos en las comunidades bacterianas nativas, desencadenando su multiplicación y adquisición de características de resistencia a diferentes tipos de antimicrobianos.

Es por esto que resulta vital profundizar en el estudio de la resistencia antibiótica en diferentes matrices hídricas, como plantas de tratamiento, afluentes de aguas residuales, lagos y ecosistemas acuáticos, permitiendo un acercamiento a la comprensión de la relación existente entre los antibióticos presentes en tales medios y las poblaciones de bacterias a las que estos generan tolerancia (Celis A et al., 2017). Este tipo de problemática se ha visto reflejada en investigaciones y estudios recientes donde se clasifica a estos microorganismos de especial cuidado, como el grupo ESKAPE, iniciales de las especies que corresponden a: *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp*) (Boucher et al., 2009).

Se ha descubierto que las bacterias valiéndose de ciertos mecanismos pueden diseminarse y adquirir inmunidad ante los antimicrobianos que estén presentes en la matriz acuosa o terrestre. Entre los mecanismos más comunes se destacan: producción de enzimas que inhiben o destruyen el antimicrobiano; impermeabilización de la pared celular, impidiendo la entrada del fármaco; cambios en el sitio de acción por mutación adquirida. Algunas bacterias también poseen bombas de eflujo, un sistema que expelle al antibiótico antes de que este llegue al punto blanco. Existen también rutas metabólicas en algunas bacterias que son alteradas genéticamente haciendo que el agente antimicrobiano pierda su efecto en el blanco específico (Cavaliere, 2005).

Teniendo en cuenta la cantidad de posibles adaptaciones que tienen estos microorganismos, la resistencia bacteriana es actualmente un serio problema de salud a nivel mundial y requiere del máximo esfuerzo de todas las instituciones gubernamentales que garanticen su control. Dado que este fenómeno tiene como principales consecuencias el fracaso de la terapia antimicrobiana, el incremento de la morbilidad y la mortalidad y el aumento en los costos de la atención médica, resultando indispensable su contención a nivel internacional (García Castellanos et al., 2014).

2.2. Resistencia bacteriana en Colombia.

Esta problemática ha sido poco estudiada en Colombia, se reportan pocas investigaciones que evalúen el impacto del uso de antibióticos en los hospitales, agroindustria, el escenario veterinario, como también sistemas de acueductos municipales en donde son casi inexistentes los protocolos para análisis de microorganismos, lo mismo sucede con las estrategias para su control, ya que no hay información suficiente que aborde el impacto de dichos efectos con respecto a la resistencia antimicrobiana (Paredes. A, 2014). Sin embargo, se ha demostrado en nuestro medio que las prácticas basadas en el conocimiento del empleo de antibióticos contribuyen a la disminución de prescripciones inapropiadas y, por lo tanto, a la reducción de costos e impactos ambientales que se generan por su mal uso (Instituto Nacional de Salud, 2018).

Estudios de La RAM (Resistencia Antimicrobiana), mediante análisis realizados en unidades de cuidado intensivo en algunos hospitales de Bogotá. Han evidenciado el incremento de microorganismos multirresistentes, al igual que una amplia distribución de las carbapemenasas. (Hernández-Gómez et al., 2014). A partir del año 2001 se cuenta con reportes de estudios de tipo observacional, pero solo enfocados en la ciudad de Bogotá (Espinosa et al., 2011). A nivel comunitario se ha encontrado que infecciones por *E. coli*, las cuales son tratadas con medicamentos internacionalmente recomendados, como las cefalosporinas, están presentando resistencia y por ende ya no resulta efectivo su uso (Vacca et al., 2011).

La resistencia bacteriana se consolida como una amenaza para los sistemas de salud en el manejo de las enfermedades infecciosas, la vigilancia epidemiológica tiene indicios de ser una estrategia efectiva para evaluar los patrones de susceptibilidad de bacterias de interés, teniendo que analizarse y abordar el problema efectivamente para establecer medidas de contención eficaces y específicas para cada región del país (Martínez. B et al., 2013). En Colombia, las redes de vigilancia y los grupos de investigación han iniciado estudios desde finales de los años 90, logrando una caracterización molecular de las diferentes variantes bacterianas, de igual manera se han reportado una gran prevalencia y diseminación de patógenos bacterianos en los hospitales de mediana y alta complejidad, denotando el impacto clínico de las infecciones causadas por estos microorganismos (Instituto Nacional de Salud, 2018). Además, se ha podido evidenciar el alto grado de endemia de algunas betalactamasas y, en consecuencia, la necesidad de una inmediata implementación de programas para inducir el uso prudente de los antibióticos y de medidas de vigilancia que permitan controlar y prevenir el crecimiento del problema, con el fin de disminuir la morbilidad, mortalidad en los pacientes y preservar las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad (Rada et al., 2019).

Esta problemática de resistencia a los antibióticos se ha asociado con el retraso en el inicio del tratamiento antibiótico apropiado, con la prolongación de la estancia en los hospitales y con el aumento en los costos hospitalarios. Además, se ha evidenciado que el inicio tardío del tratamiento antibiótico adecuado puede estar acarreado significativamente al aumento de las tasas de mortalidad en pacientes con infecciones por microorganismos persistentes (Instituto Nacional de Salud, 2018).

Casos de estudio, como las crecientes tasas de resistencia de las enterobacterias, genera preocupación y requiere desarrollo investigativo inminente para conocer los comportamientos

epidemiológicos que aporten a la difusión de la RAM, para así lograr una mejor selección de los antibióticos y tener control de infecciones, y de esta manera prevenir la expresión y diseminación de las diferentes formas de resistencia bacteriana y agravamiento de estas (Alós, 2015).

Con el fin de atender la preocupación mundial del aumento de la RAM, en Colombia el Ministerio de Salud y Protección Social ha establecido un plan para la mitigación de este fenómeno, estableciendo medidas como:

- En 1987 implementó la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana para *N. gonorrhoeae*, dentro del marco de la prevención de las enfermedades de transmisión sexual.
- En 1994 a través del Sistema de Redes de Vigilancia de Agentes Bacterianos responsables de Neumonías y Meningitis (SIREVA II).
- Implementación desde el año 1997 por el Instituto Nacional de Salud de un sistema de vigilancia para la enfermedad diarreica aguda (EDA), para vigilar la resistencia antimicrobiana de organismos como *Salmonella spp.*, *Shigella spp* y *Vibrio cholerae*. (Instituto Nacional de Salud, 2018).
- En el 2012 se implementó la vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), enmarcándola en el monitoreo de enterobacterias, para la caracterización fenotípica de bacterias Gram positivas y Gram negativas, que presentan perfiles inusuales de resistencia o multirresistencia, provenientes del ámbito hospitalario (Muñoz et al., 2012).
- El plan estratégico Nacional de Respuesta a la Resistencia a los Antimicrobianos, liderado por el Ministerio de Salud y Protección Social en colaboración con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, para atender a los riesgos derivados de la resistencia a los antimicrobianos en la salud humana y animal, el control fitosanitario y su impacto en el medio ambiente. Este plan es una respuesta a la iniciativa de la Organización Mundial de

la Salud, que se incluyó en la Resolución de la 68ª Asamblea Mundial de la Salud en 2015 y responde a los elementos estratégicos definidos en el mismo.

2.3. Contaminación xenobiótica por antibióticos.

Los contaminantes resultantes de aguas hospitalarias pueden contener una gran cantidad de fármacos y moléculas no metabolizadas de antimicrobianos, agentes desinfectantes con variada composición y estructura, provenientes de los tratamientos terapéuticos que se aplican dentro de las instalaciones médicas. A partir de los estudios realizados en la década de los 90 en Alemania se encontraron herbicidas en lagos, ríos y aguas del mar del norte (Peñate et al., 2009), después de estos estudios se ha venido explorando la contaminación por parte de fármacos y productos utilizados en el sector agrícola, hospitalario, industrial y como estos están afectando el equilibrio del ecosistema. Los hospitales tienen un flujo considerablemente mayor cada día en comparación con el consumo de aguas domésticas, se ha estimado que cerca del 80% de estas aguas resultantes generan contaminación xenobiótica. Además, se sabe que este tipo de aguas contienen agentes bacterianos, patógenos, fragmentos de virus y microorganismos resistentes que en interacción con contaminantes químicos y biológicos pueden tener sinergia entre ellos y así ocasionar una grave problemática de salud pública generalizada (Ramos C, 2008).

Se ha evidenciado una gran cantidad de productos farmacéuticos provenientes de tratamientos médicos o veterinarios que pueden distribuirse en el medio por aire, agua, suelos o sedimentos, como lo reportan algunos estudios realizados (Nikolaou et al., 2007). Sin embargo, la baja volatilidad de muchos productos farmacéuticos facilita principalmente que sean diseminados por medio acuoso, no obstante pueden valerse también de la cadena alimentaria, clasificándose así como contaminantes de tipo emergente debido a que cada día se están volviendo recalcitrantes y por ende detectándose de manera más frecuente gracias al desarrollo de técnicas analíticas cada día más sensibles como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

(GC-MS), también la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS o LC-MS-MS) que permiten detectar concentraciones cada vez más bajas. Considerando esto y teniendo en cuenta que la tasa de transformación de algunos fármacos es menor a su tasa de liberación, ocasionando esto, se vuelvan cada vez más persistentes facilitando de esta manera la adsorción por suelos, como en el caso los antibióticos de tipo amino glucósidos y β -lactámicos (Sarret et al., 2006). Según estudios realizados por (Serna-Galvis et al., 2022). En donde se llevó a cabo la caracterización de aguas residuales hospitalarias en tres ciudades distintas de Colombia, entre ellas un hospital de la ciudad de Manizales, al analizar la persistencia de 38 tipos de fármacos se mostró que 20 de estos tenían frecuencia de ocurrencia del 100%, en el caso de Manizales se observa la persistencia del antibiótico ciprofloxacina durante todo el muestreo. Algunos estudios describen que la adsorción de algunos fármacos en lodos activados es relativamente baja y estos productos adsorbidos pueden llegar fácilmente al medio con la disposición final de estos lodos a manera de fertilizantes o por medio de animales criados en pastizales que tengan presencia de este tipo de sustancias siendo así eslabones de la cadena alimenticia hasta llegar al ser humano (Nikolaou et al., 2007).

2.4. Tratamiento de aguas residuales hospitalarias.

El tratamiento de aguas residuales ya sea de tipo doméstico hospitalario o industrial, se lleva a cabo por una serie de procesos que pueden ser físicos, químicos o biológicos cuya finalidad es la eliminación o reducción de diversos tipos de contaminantes. Por su parte, se denomina planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) a un conjunto de estaciones en donde se trata el agua con la finalidad de hacerla apta para el vertimiento seguro a un afluente hídrico, quitándole contaminantes provenientes de la industria, hospitales, o aguas domésticas para convertirla en agua que no implique riesgos a la salud o al medioambiente, dónde será vertida (Guevara et al., 2018).

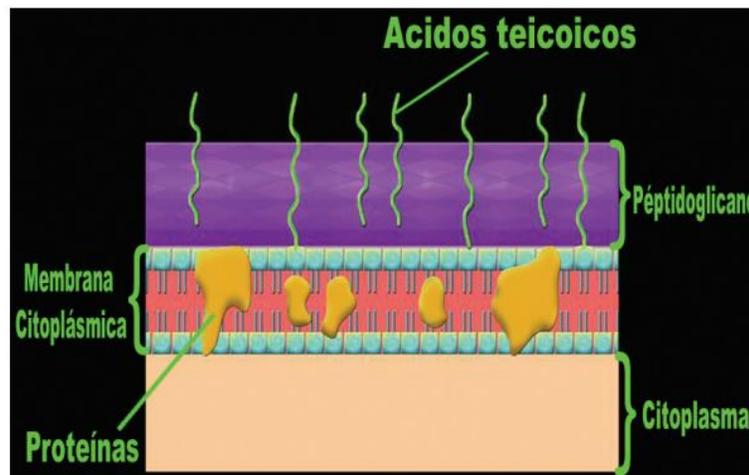
Las aguas residuales que ingresan a una planta de tratamiento pasan por procesos de aireación, desinfección y clarificación. Teniendo en cuenta los tratamientos convencionales, se manejan dos líneas de depuración, i) tratamientos que permiten reducir los contaminantes presentes en las aguas residuales, y ii) línea de lodos en donde tratan la mayor parte de los subproductos que se originan en la línea de entrada de agua (Sarret et al., 2006). Dentro del tratamiento de aguas residuales podemos encontrar tres tipos de tratamientos principales, tratamiento primario, secundario y terciario. En el tratamiento primario se llevan a cabo procesos de eliminación y filtración de sólidos suspendidos, sedimentables mediante procesos como: flotación, floculación. Seguidamente, el tratamiento secundario o biológico se encarga de la degradación de compuesto gracias a la acción de lodos activados que contienen una gran carga microbiana, los cuales degradan la materia orgánica de forma aerobia y anaerobia en donde dicha materia se transforma en sólidos suspendidos que posteriormente sedimentarán por acción de la gravedad y finalmente el agua clarificada continúa con el proceso de desinfección y vertimiento al medio. (Luis & Lisboa, 2011).

En el tratamiento terciario se llevan a cabo procesos físicos y químicos para la eliminación de contaminantes específicos: fósforo, nitrógeno, minerales, metales pesados, virus, compuestos orgánicos. Este tipo de tratamiento requiere mayores costos que el primario y secundario y es utilizado especialmente en la purificación de desechos industriales (Guevara et al., 2018).

3. Microorganismos Gram positivos.

Los microorganismos Gram positivos son células bacterianas a diferencia de los Gram negativos, presentan una membrana más sencilla, conformada únicamente por dos componentes, el peptidoglicano o capa de mureína que tiene mayor grosor en estos organismos, encargada de dar forma a la célula, es considerada como pared celular. Y los ácidos teicoicos, que son

polímeros entrelazados en la capa de peptidoglicano que se extienden hacia la superficie de la célula para brindar protección en el espacio extracelular (Cavalieri, 2005). Estos producen enzimas plasmídicas, inducibles y extracelulares para la inactivación de antibióticos. La pared de las bacterias Gram positivas ejerce un efecto protector o de resistencia contra numerosos antibióticos que tienden a atravesar esta estructura para llegar a su interior y ejercer su efecto antibacteriano. Sin embargo, esta estructura se convierte en el punto de ataque de varios antibióticos, afectando fácilmente la viabilidad de estas bacterias y creando susceptibilidad (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).



*Ilustración 1. Estructura membrana Gram positiva.
Fuente: (Cavalieri, 2005).*

4. Microorganismos Gram negativos.

Las células de los microorganismos Gram negativos se pueden diferenciar en muchos componentes, entre los más importantes se destacan: la membrana externa que sirve como barrera y permite la permeabilidad de la célula, también importante en la retención de proteínas en el espacio periplásmico. En esta podemos encontrar diferentes tipos de proteínas como porinas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, esta es una de las principales diferencias existentes entre organismos Gram negativos y Gram positivos en los cuales solo se presenta una

membrana plasmática donde se encuentra adicionado el peptidoglicano y algunos ácidos teicoicos (Cavaliere, 2005). Las bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp., son una causa fundamental de infecciones hospitalarias del aparato urinario, el desarrollo de bacteriemia, neumonía hospitalaria y de meningitis postoperatoria (Instituto Nacional de Salud, 2018). Este grupo de microorganismos ha generado un interés especial por el aumento de cepas productoras, de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otras de carbapenemasas (Kanj & Kanafani, 2011).

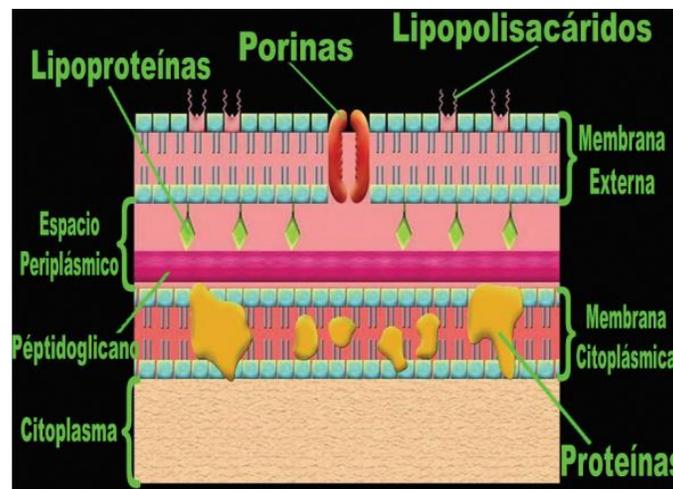


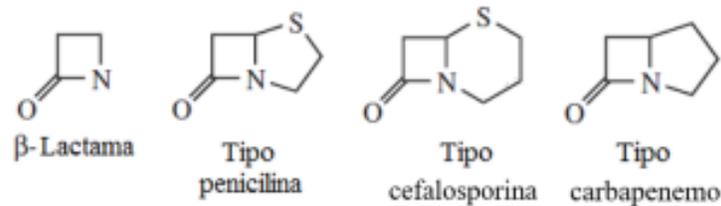
Ilustración 2. Estructura membrana Gram negativa.
 Fuente: (Cavaliere, 2005).

5. Antibióticos.

5.1. β -Lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos como la amoxicilina son bactericidas, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a proteínas específicas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular, estas al impedir que la pared celular se construya correctamente, ocasionan la lisis de la bacteria y su muerte. Los β -lactámicos como amoxicilina no resisten la acción hidrolítica de las β -lactamasas, producidas por algunos estafilococos, por lo que no se usan en el tratamiento de estafilococos. Aunque la

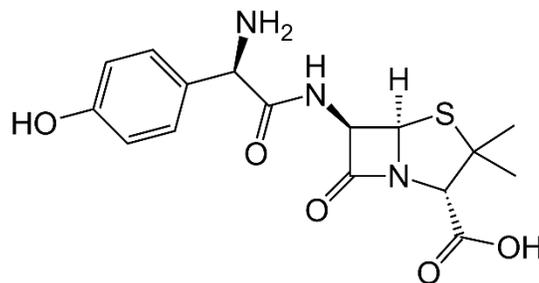
amoxicilina es activa frente a los estreptococos, muchas cepas han mostrado resistencia gracias a diferentes mecanismos, por ejemplo, la inducción de β -lactamasas (G Martin N, 2002).



*Ilustración 3. Anillo lactámico, tipos de antibióticos β -lactámicos.
 Fuente: (Fresco Merino, 2016).*

5.2. Amoxicilina.

La amoxicilina es un antibiótico semisintético de amplio espectro derivado de la penicilina, actúa en microorganismos Gram positivos y Gram negativos. No debe ser empleada en gérmenes productores de β -lactamasas, porque no es estable ante estos. Es una amino-penicilina análogo de la ampicilina, es empleada para el tratamiento de enfermedades respiratorias, gastrointestinales, urogenitales, de piel y tejidos blandos empleada en bovinos, cerdos y equinos. (Durand & Garcinuño, 2016). La amoxicilina es un β -lactámico, con fórmula molecular $C_{16}H_{19}O_5N_3S$ (anhidra). A simple vista es un sólido incoloro soluble en agua, metanol y etanol, estable en soluciones acuosas con valores de pH entre 3,5-6,0. Su estructura química se muestra en la Ilustración 4.



*Ilustración 4. Molécula de amoxicilina.
 Fuente: (Vignette, 2015).*

5.3. Cefalexina.

Es un antibiótico de primera generación del grupo de las cefalosporinas, que a su vez son β -lactámicos aislados del hongo *Cephalosporium acremonium*, por G. Brotzu, su estructura química es similar a la de las penicilinas (PNC), contienen un anillo lactámico al igual que estas. Las cefalosporinas de primera generación actúan en gran número de cocos Gram positivos tales como: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Entre los organismos Gram negativos susceptibles se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Shigella sp.* (Universidad Mayor, 2019). . Entre sus propiedades físico-químicas están su absorbancia máxima de 260 nm, en cuanto a sus características físicas, son cristales blancos de olor característico, pH de 4,5 de un gramo disuelto en 100 mL de agua.

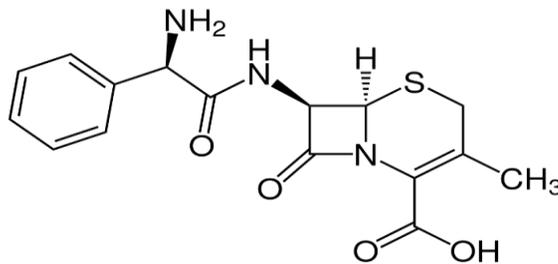


Ilustración 5. Molécula de cefalexina.
Fuente:(García Borges, 2016)

5.4. Aminoglucósidos.

Los Aminoglucósidos son un grupo de agentes antimicrobianos para el tratamiento de infecciones bacterianas asociadas particularmente a aquellas producidas por bacilos Gram negativos aeróbicos, generan una fuerte acción bactericida teniendo como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de proteínas (unión al ribosoma). Los amino glucósidos están constituidos por la combinación de dos tipos de compuestos químicos, azúcares no aminados (glucósidos) o aminados (amino glucósidos); alcoholes cíclicos no aminados (ciclitoles) o aminados

(aminociclitolos). Por su carácter policatiónico, los aminoglucósidos presentan alta solubilidad en agua. (Mella et al., 2004). Entre estos se encuentra antibióticos ampliamente usados como la estreptomicina y gentamicina. (Yolanda Fuchs et al., 1993).

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se da en la subunidad ribosomal 30 S, esta interacción genera errores en la lectura del ARNm dando como resultado la inhibición de la síntesis proteica. Cuando los aminoglucósidos son modificados, ya no pueden acoplarse a la subunidad ribosomal y, por tanto, la síntesis de proteínas no se ve afectada. (Yolanda Fuchs et al., 1993). Estas enzimas modificantes se encuentran en el espacio periplásmico, y algunas de estas han sido identificadas y purificadas como, por ejemplo, la codificada por el gen AAC identificado en *P. aeruginosa*. (Biddlecome et al., 1976).

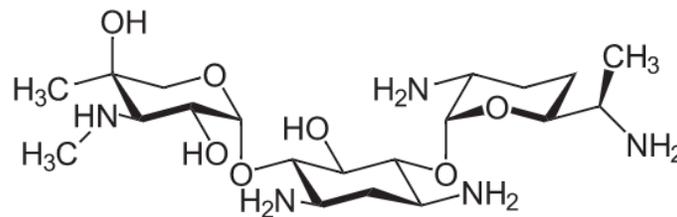


Ilustración 6. Estructura representativa de un aminoglucósido.
Fuente: (Yolanda Fuchs et al., 1993).

5.5. Quinolonas.

Las quinolonas son una familia de antibióticos bactericidas de amplio espectro que actúan frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, bloqueando la duplicación bacteriana al inhibir las topoisomerasas II (ADN girasa) y IV. Específicamente, el ADN girasa es el blanco primario en bacterias Gram negativas, mientras que topoisomerasa IV lo es en bacterias Gram positivas. Algunas quinolonas con espectro de actividad y potencia mejorada parecen tener como blanco ambas enzimas (Serra, 2008).

El término “quinolona” se usa en un sentido genérico para referirse a la clase de inhibidores de la síntesis del ADN que incluyen; naftiridonas, quinolonas, isotiazol quinolonas, quinazolininas y agentes relacionados. Esto llevó al desarrollo de otros antimicrobianos basados en el anillo 4-quinolona, como el ácido oxolínico, cinoxacina y flumequina, empleados clínicamente para tratar infecciones causadas por bacterias Gram negativas. (Cavalieri, 2005).

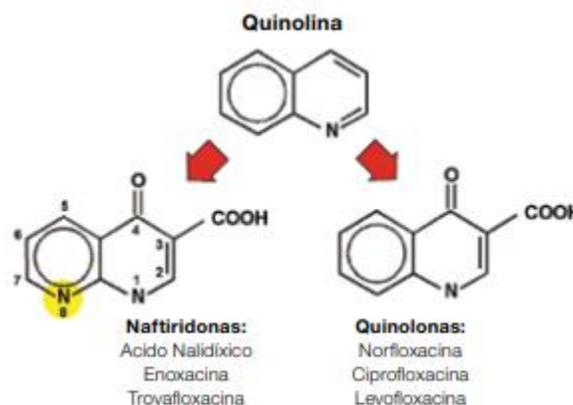


Ilustración 7. Estructura básica de las quinolonas.
 Fuente:(Serra, 2008).

6. Tipos de resistencia bacteriana.

Las bacterias por su gran capacidad de adaptación han desarrollado mecanismos que les permite adquirir resistencia a fármacos y a cualquier agente externo que ejerza competencia contra ellas. Esta adaptación puede ser de tipo natural o adquirida, siendo esta última la más preocupante en el ámbito clínico y de salud pública. Existen diferentes mecanismos por los cuales las bacterias ejercen resistencia ante los antimicrobianos, entre estos están, la producción de enzimas que modifican el antibiótico haciéndolo inútil ante el blanco, la impermeabilización de la membrana u otras estrategias como bombas de eflujo que expelen el fármaco fuera de la célula antes de que este alcance su blanco. (Cavalieri, 2005).

6.1. Natural o intrínseca.

Es una propiedad inherente de las bacterias, como lo menciona (Fernández et al., 2003), se ha identificado mediante el aislamiento bacterias resistentes de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de glaciares en regiones árticas de Canadá. En el caso de la resistencia natural de los microorganismos al adquirir inmunidad a algunos agentes ambientales como metabolitos secundarios y xenobióticos han desarrollado ventajas competitivas frente al resto de las cepas existentes en el entorno y garantizando su éxito reproductivo y posterior proliferación. (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

6.2. Adquirida.

Se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y mediante la transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias. Constituye un problema en el sector de salud pública; se detecta mediante pruebas de sensibilidad, provocada por presión selectiva en el medio, presencia de antibióticos, antimicrobianos y desinfectantes en la matriz. (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

6.3. Mecanismos resistencia bacteriana.

Las bacterias pueden producir algunas enzimas que inactivan el antimicrobiano, hidrolizando o modificándolo y así haciendo incapaz de que este actúe en su blanco. (Cavaliere, 2005).

6.3.1. Las β -lactamasas.

Son enzimas que hidrolizan agentes microbianos β -lactámicos, dando como resultado una resistencia de la célula a este tipo de antibióticos. Estos tienen tres mecanismos que actúan de forma independiente, pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de la membrana externa; alteración de las enzimas diana y producción de enzimas inactivantes (β -lactamasas)

(G Martin N, 2002). En bacterias Gram negativas las β —lactámicas actúan dentro del espacio periplásmico en contra de los fármacos hidrolizándolos y así impidiendo lleguen a sus blancos, las células Gram positivas excretan estas enzimas al exterior que interactúan con los antibióticos de tipo β -lactámico impidiendo así que estos tengan un efecto en el microorganismo (Cavaliere, 2005).

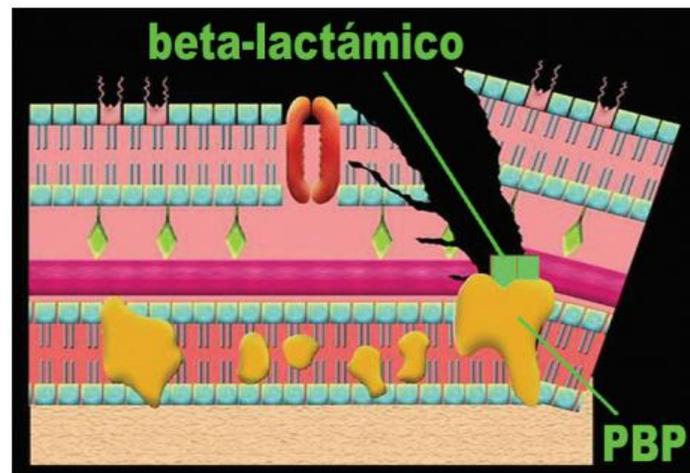


Ilustración 8. Efecto de β -lactámicos en organismos Gram negativos.
Fuente:(Cavaliere, 2005).

6.3.2. Cloranfenicol acetil transferasa.

Tanto las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas pueden producir una acetiltransferasa que modifica al cloranfenicol para inactivarlo. El Cloranfenicol ingresa a la bacteria por difusión facilitada y se une a la subunidad ribosomal 50 S impidiendo la síntesis de proteínas (Fuchs et al., 1993).

6.3.3. Alteración de los blancos

Las PBP's (*protein binding penicillin*) son proteínas fijadoras de β -lactámicos, estas se encuentran en la membrana, son transpeptidasas las cuales son responsables de la síntesis y construcción de la pared celular bacteriana, los cambios en la estructura de las PBP's parecen

ser los que involucran una disminución en la sensibilidad ante β -lactámicos. (G Martin N, 2002) Este mecanismo es comúnmente el responsable de la resistencia en bacterias Gram positivas y especialmente en *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, las cuales producen PBP's estructuralmente alteradas con baja afinidad por este antibiótico, se incluyen especies de *Streptococcus*, *Enterococcus* y diferentes especies de *Staphylococcus*. Las PBP's pueden ser alteradas tanto en células Gram negativas como en las Gram positivas, suelen ser modificadas por mutación de manera tal que los β -lactámicos no puedan ingresar (G Martin N, 2002).

6.3.4. Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa.

6.3.4.1. Alteración de porinas.

Algunas bacterias como las Gram positivas pueden volverse resistentes a los β -lactámicos desarrollando barreras de permeabilidad, dicha modificación se logra con la alteración de proteínas de la membrana externa, que bloquean la entrada de las moléculas del antibiótico. Cuando los β -lactámicos no pueden alcanzar los PBP's la célula se hace resistente (Cavaliere, 2005).

6.3.5. Bombas de eflujo.

Una amplia cantidad de bombas permiten a las células Gram positivas y Gram negativas adquirir resistencias a los antimicrobianos, este eflujo es mediado por proteínas transmembrana que transportan el antibiótico fuera de la membrana tan rápido como este entra en la célula (Cavaliere et al., 2005). La capacidad de los organismos para adaptarse a condiciones adversas del medio les ha permitido proliferar y subsistir, en el caso puntual las bacterias al ser sistemas biológicos relativamente sencillos, tienen la capacidad al igual que los demás organismos vivos de adaptarse al medio y poder realizar metabolismo y replicación.

En el caso de estos organismos procariontes teniendo en cuenta las condiciones actuales de urbanización, se han visto afectados los ambientes naturales de comunidades bacterianas con contaminantes, como: desinfectantes, plaguicidas y antibióticos utilizados tanto en el sector médico como agrícola. Lo cual ha generado presión selectiva en estos microorganismos desarrollando mecanismos de adaptación como los que se mencionó en el capítulo anterior, los cuales se deben tener en minuciosa vigilancia y control para evitar la aparición de cepas multirresistentes que ocasionarían un grave impacto no solo al hombre sino al ecosistema en general (Katouli et al., 2009).

7. HPLC y técnicas analíticas para la determinación de contaminantes emergentes.

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC es utilizada para el estudio de analitos con pesos moleculares grandes que no alcanzan a ser muy volátiles, este tipo de técnica analítica utiliza grandes presiones para hacer que las fases móviles (fases de arrastre) fluyan a través de una columna (fase estacionaria), conformada por partículas de sílice, con diámetro muy pequeño y variables según el tipo de la columna empleada y así consiguiendo la separación de los analitos según su afinidad con la fase estacionaria (Harris., et all 2003). Gracias a técnicas como HPLC y espectrometría de masas, se ha podido determinar pequeñas concentraciones de fármacos y contaminantes que antes pasaban desapercibidos y se desconocían los efectos que estos podrían causar a comunidades de microorganismos y a los ecosistemas en general.

En este estudio se hace un paralelo dando aproximaciones experimentales en el campo de la microbiología mediante cultivos en medios selectivos, pruebas de dilución en agar y técnicas analíticas, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la identificación de nuevos contaminantes como los antibióticos (amoxicilina y cefalexina), presentes en la PTAR del Hospital

Santa Sofía y de cómo pequeñas concentraciones del orden de mg/L y µg/L están generando fenómenos de la RAM utilizando diversas estrategias en los microorganismos ya sean metabólicas, fisiológicas, transferencia horizontal de genes, para su supervivencia, lo que implica un riesgo latente no solo para la salud de la comunidad humana sino para todo el bioma. (Hughes et al., 2013).

Debido a que hay poca información sobre las consecuencias que tienen este tipo de contaminantes emergentes en la ecología del medio, es necesario continuar con los estudios y realizar investigaciones en donde se aborde de manera amplia el monitoreo ambiental, empleando el enfoque analítico aplicando a la detección dirigida con espectrometría de masas, complementada con ensayos biológicos en microorganismos y organismos del ecosistema para así medir el impacto ecológico. (Petrie et al., 2015).

En este estudio se hicieron ensayos biológicos en bacterias aisladas en una planta de tratamiento, para mostrar así que hay resistencia bacteriana a los antibióticos dentro de la PTAR Hospital Santa Sofía, revelando porcentajes de resistencia de las bacterias heterotróficas totales, bacilos Gram negativos y grupo de los coliformes en este ambiente, y relacionar el impacto en la ecología de las bacterias nativas y presentes en este tipo de lugares, ante la presencia de antibióticos, mediante la utilización de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. Así correlacionar con la utilización de métodos microbiológicos y químicos que se está generando resistencia antibiótica en las bacterias presentes en la PTAR Hospital Santa Sofía debido a la presencia fármacos como amoxicilina y cefalexina en las aguas del efluente y así generando el fenómeno de selección de bacterias resistentes.

8. Materiales y métodos.

8.1. Sitio de estudio y toma de muestras.

El proyecto se llevó a cabo en la E.S.E Hospital Santa Sofia que se encuentra ubicado en el municipio de Manizales-Caldas (Ilustración 9). Como Empresa Social del Estado abierta a la comunidad caldense y del Eje Cafetero, ofrece un servicio de alta calidad fundamentado en cinco valores institucionales: justicia, diligencia, respeto, honestidad y compromiso; atiende los servicios correspondientes al plan obligatorio de salud con énfasis en las enfermedades de alto costo y ofrece especialidades únicas en la región. Actúa, igualmente, como centro de investigación con el (grupo de investigación SOFIA) y formación del personal requerido por el sector salud, por lo que coordina sus acciones con otras entidades públicas, incluidas las universidades de la región y los demás hospitales del Departamento.

Puntualmente el hospital se abastece del Acueducto local, Aguas de Manizales, con un consumo promedio mensual de 1310 m³ aproximadamente, por su parte las aguas residuales generadas en el establecimiento provienen de actividades desarrolladas dentro del laboratorio, área de urgencias, área de odontología y hospitalización; por tanto, se vierten fluidos corporales de mediano y alto riesgo, sustancias antisépticas, medicamentos (residuos no metabolizados presentes en las aguas residuales), adicionalmente, las actividades de aseo y lavado utilizan soluciones de desinfectantes, hipoclorito, detergentes y alcohol.

Para la determinación de antibióticos dentro de esta investigación, se recolectaron muestras compuestas a seis horas con intervalos de 30 minutos en aguas del afluente como también en lodos (lechos de secado), de la planta de tratamiento de aguas hospitalarias (Ilustración 10). Teniendo en cuenta que dentro del vertimiento se encuentran, sangre, fármacos, heces humanas, detergentes y desechos orgánicos, se tomaron dos muestras en frascos limpios y

estériles con capacidad de 250 mL, los cuales poseen un tapón roscado, el cuello de cada frasco fue cubierto con papel aluminio. Las muestras fueron transportadas en una nevera, cubiertos de la luz para evitar su degradación, hasta dar inicio al procesamiento en el laboratorio de química analítica y cromatografía de la Universidad de Caldas.



*Ilustración 9. Localización de la E.S.E Hospital Departamental Universitario Santa Sofía.
Fotografía: Elaboración propia.*

La planta de tratamiento cuenta con un total de 9 recámaras (Ilustración 9) divididas en: recámara de pretratamiento (cribado), tratamiento biológico, biorreactor (6 cámaras, aireación extendida), en donde se utilizan tratamiento biológico Septitrim (producto comercial). Posteriormente la cámara de clarificado en donde se lleva a cabo la sedimentación de la materia orgánica degradada por las bacterias del reactor.



*Ilustración 10. PTAR Hospital Santa Sofía.
Fotografía: Elaboración propia.*

Se realizó el muestreo en la PTAR de la E.S.E Hospital Departamental Universitario Santa Sofía en la ciudad de Manizales. Se tomaron en total 6 muestras por día de muestreo, 3 para aguas y 3 para lodos activados, se utilizó un frasco ámbar de tapa roscada y cada muestra se le tomó el pH mediante un PH-meter portátil (Prolab 3000). Para el transporte y tratamiento de las muestras se usó una nevera de icopor con pilas de refrigeración, Ilustración 11, para la conservación adecuada de las muestras hasta su llegada al laboratorio de investigación en microbiología y biotecnología grupo “MICROBIOTEC” de la Universidad Libre seccional Pereira.

Una vez las muestras llegaron al laboratorio se procedió a hacer diluciones seriadas por duplicado a cada frasco de muestra; para el sembrado se tomó 400 μL de muestra, ilustración 12, todos estos procedimientos se hicieron dentro de una cabina de flujo laminar, y se dejaron en incubación por 24 horas a 37,5 °C. Posteriormente se efectuó el conteo de colonias viables y verificación de crecimiento en los agares utilizados, Chromocult, Mueller Hinton y MacConkey.



Ilustración 11. Recolección muestras PTAR Santa Sofía.
 Fotografía: Elaboración propia.

8.2. Preparación y esterilización de material de trabajo.

Se utilizaron 120 tubos de 10 mL para la preparación de las diluciones seriadas por duplicado. Para el sembrado de las muestras se utilizaron en total 108 cajas de Petri, previamente esterilizadas en autoclave 120 °C por 1 hora.

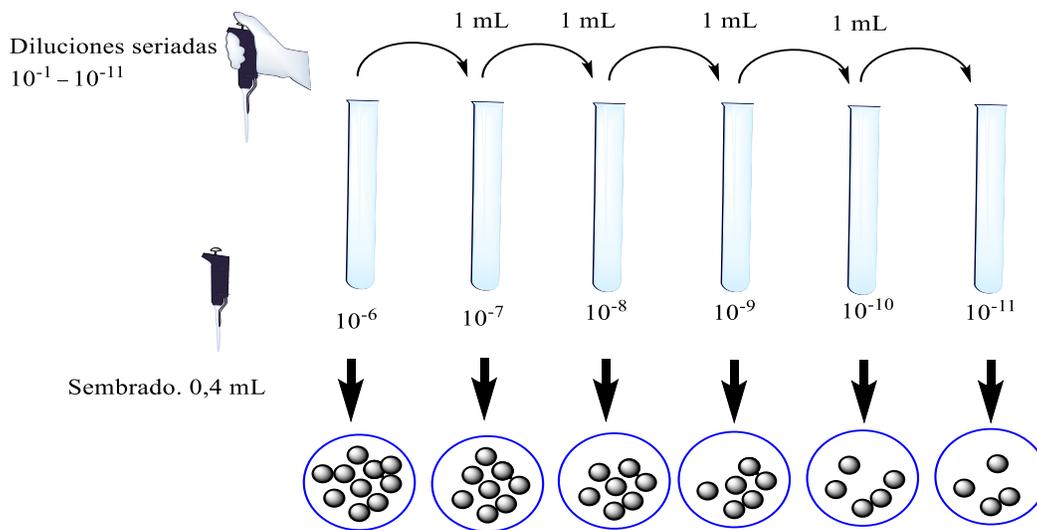


Ilustración 12. Diluciones seriadas y sembrado en placas.
 Fuente: Elaboración propia.

8.3. Medios de cultivo.

Se prepararon 3 agares selectivos para este análisis, en los cuales se sembraron las diluciones de (10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11}), ilustración 12, por duplicado de la siguiente manera: MacConkey Agar como medio de cultivo selectivo, para bacilos Gram negativos y enterobacterias, Mueller Hinton Agar para el ensayo de sensibilidad y no selectivo, Chromocult medio cromógeno selectivo para análisis de *E. coli* y otros Coliformes en Aguas. Se utilizaron 36 cajas por cada tipo de agar, todo esto se hizo dentro de una cabina de flujo laminar. Todas las cajas preparadas fueron selladas con papel *Parafilm*, para evitar la deshidratación y contaminación del medio. De ahí fueron marcados y guardados en refrigeración hasta el momento de la siembra. Para el recuento de bacterias heterotróficas utilizará agar Mueller-Hinton. Se utilizaron β -lactámicos (ampicilina, ceftriaxona); aminoglucósidos: (gentamicina); quinolonas (ciprofloxacina), para la prueba de susceptibilidad, todos se suplementaron por duplicado utilizando las concentraciones de la Tabla 1. Los tres tipos de agares se suplementaron con la MIC y tres concentraciones por debajo de estas tomando los valores de referencia según (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016a) (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016b).

Tabla 1. Preparación de diluciones de antimicrobianos para el método dilución en agar modificado de (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016a) (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016b).

Diluciones en Agar								
Ampicilina				Ciprofloxacina				
NaOH 0,1 M								
MIC	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Unidades	MIC	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
4	1	2	3	$\mu\text{g/L}$	2	0,5	1	1,5
Solución madre 120 $\mu\text{g/L}$ volumen 50 mL				Unidades	Solución madre 60 $\mu\text{g/L}$ volumen 50 mL			
4	1	2	3	$\mu\text{g/L}$	2	0,5	1	1,5
1667	417	833,3	1250	μL	1667	417	833	1250
Para todas las muestras se utilizó un tubo falcón 50 mL								

Gentamicina					Ceftriaxona			
Suero fisiológico 0,9% NaCl								
MIC	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Unidades	MIC	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
16	4	10	12	µg/L	2	0,5	1	1,5
Solución madre 480 µg/L (50 mL)				Unidades	Solución madre 120 µg/L (50 mL)			
16	4	10	12	µg/L	2	0,5	1	1,5
1667	417	1042	1250	µL	833	208,3	417	625
Para todas las muestras se utilizó un tubo falcón 50 mL								

8.4. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

Agares Selectivos.

- Agar Chromocult, grupo de los coliformes.
- Agar MacConkey como medio de cultivo selectivo, para bacilos Gram negativos y entero bacterias.
- Para el recuento de bacterias heterotróficas Mueller-Hinton agar

Para determinar el perfil de resistencia de los bacilos Gram negativos tipificados de los medios de cultivo con antibióticos se utilizó la técnica de difusión en agar MacConkey con los antibióticos anteriormente mencionados. Las pruebas de sensibilidad se realizaron siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)*.

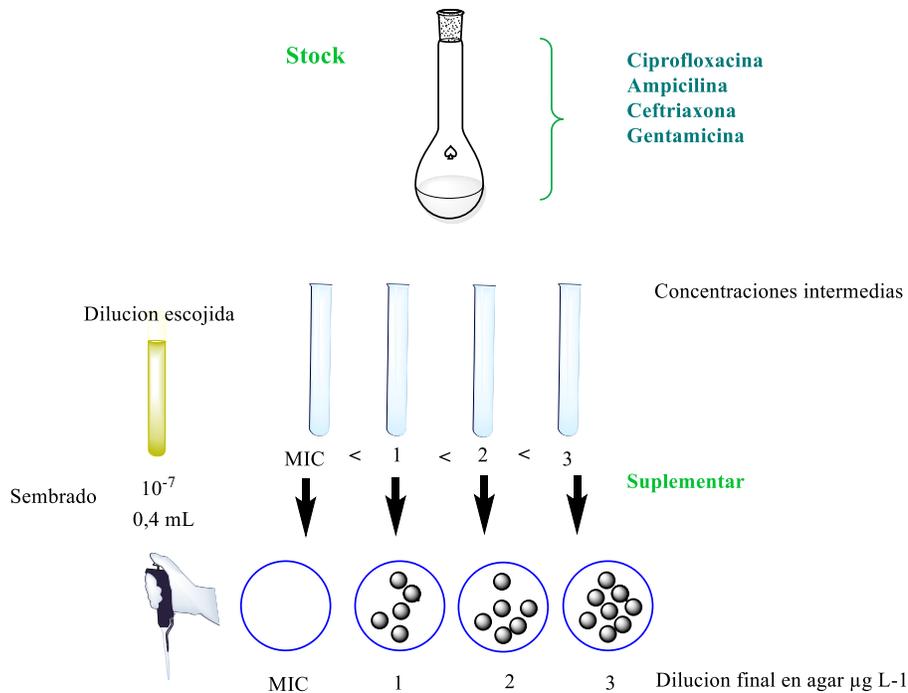


Ilustración 13. Prueba de susceptibilidad, método dilución en agar.
 Fuente: Elaboración Propia.

8.5. Condiciones Cromatográficas.

Para la identificación del método cromatográfico más idóneo a utilizar y la elección de las fases móviles fue necesario realizar revisión bibliográfica para los analitos a estudiar (Amoxicilina y Cefalexina). Se probaron diferentes fases móviles como ácido sulfúrico, metanol/ agua en diferentes proporciones, con esto se concluyó que las fases más afines según la naturaleza de los analitos estudiados fueron: Ácido fórmico al 0,1% y metanol 90/10 v/v. Se empleó un flujo de inyección de 0,8 mL/min, el método más idóneo para las condiciones de trabajo fue modo gradiente, como se muestra a continuación en la tabla 2. Se utilizó una longitud de onda de 220 nm para los dos analitos a estudiar. Siendo estos: β-lactámicos, presentan propiedades químicas y físicas similares entre sí. La fase estacionaria fue una columna C18 apolar y se utilizó cromatografía en fase reversa. Obteniendo un tiempo de análisis de 15 minutos para los antibióticos seleccionados.

Tabla 2. Gradiente: método identificación antibióticos (amoxicilina, cefalexina).
Fuente: Elaboración Propia.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% ácido fórmico	% metanol
0	0.8	90	10
0	0.8	90	10
12	0,8	60	40
15	0,8	90	10

8.5.1. Preparación y Extracción.

Se filtró cada una de las muestras con papel filtro, para la extracción se utilizaron 20 mL de cada una de las muestras, utilizando el método de disco rotatorio, para lo cual se pesó 0,03 g de C18 y se utilizó un filtro de (0,45 μ m). Luego se puso el disco en el vial de muestra en una plancha calefactora a 50 °C y 1500 RPM por 30 minutos, posteriormente, se desechó la muestra restante y para la desorción se adicionaron 10 mL de metanol para volver a la plancha calefactora bajo las mismas condiciones por 30 minutos.

Realizado este procedimiento se tomaron los 10 mL en los que se hizo la desorción y se dejaron en evaporación utilizando rapidvap a una temperatura de 60° C durante 30 min. Para la recuperación de las muestras se tomaron 200 μ L de ácido fórmico al 0,1% y 200 μ L de metanol al 98% correspondientes a las fases utilizadas.

Luego de este proceso se pasaron los frascos por vórtex durante 15 segundos; de cada muestra se tomaron 400 μ L y se agregaron a viales, utilizando metanol como blanco, finalmente se hizo el análisis por HPLC, 15 minutos por cada muestra, con las condiciones cromatográficas anteriormente descritas.

8.6. Análisis estadístico.

En primera instancia se hizo prueba Shapiro Wilck para corroborar normalidad en los datos obtenidos, utilizando el paquete CRAN, posteriormente, se realizan porcentajes para los perfiles de resistencia obtenidos utilizando la siguiente fórmula: (bacterias que crecieron en el medio con antibiótico/crecimiento bacteriano sin antibiótico).

Para la validación del método cromatográfico se elaboró una curva de calibración con seis concentraciones conocidas, se determinó el coeficiente de correlación R^2 y parámetros como: Límite de detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ), y las incertidumbres para los parámetros del calibrado, intercepto (b) y pendiente (m). El análisis de los datos se realizó utilizando herramientas de estadística descriptiva e inferencial en donde se puede usar el entorno de programación (R), un valor de p ($\leq 0,05$) se considera una diferencia estadísticamente significativa.

9. Resultados y Discusión.

9.1. Microbiológico.

Para el contraste de datos y realización de la prueba de resistencia (dilución en agar) de los tres grupos de antibióticos a emplear: (β -lactámicos, cefalosporinas, quinolonas). Se evaluó primero el crecimiento diferenciado de las colonias en aguas y lodos residuales hospitalarios. Utilizando los siguientes medios.

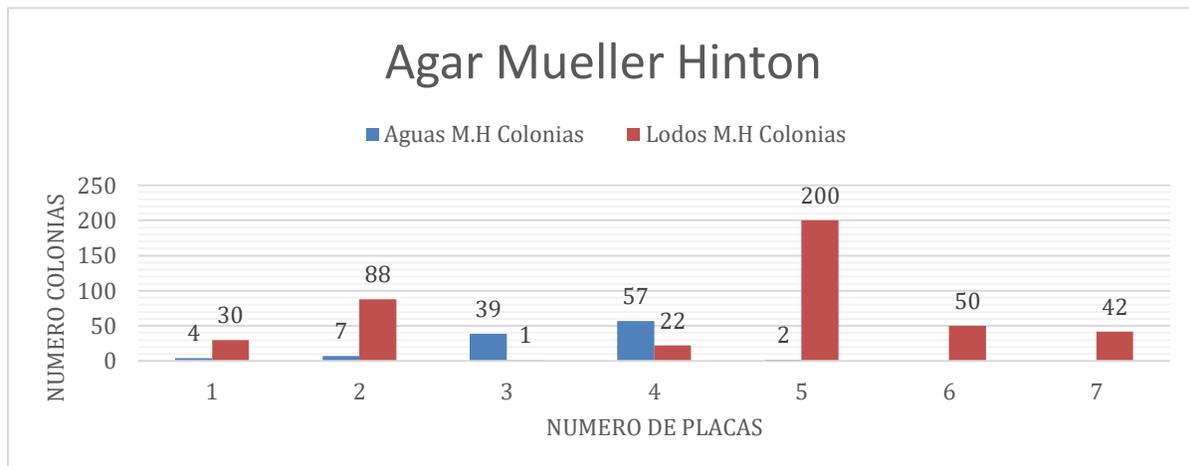


Ilustración 14. Crecimiento de colonias en agar Mueller Hinton, número vs cantidad de placas en aguas y lodos residuales, las muestras fueron tomadas por duplicado promediando el resultado.
Fuente: Elaboración Propia.

9.1.1. Bacterias heterotróficas totales.

Al realizar los diferentes cultivos para bacterias Heterotróficas totales, Ilustración 14, se observó el crecimiento y características como: color, forma, cantidad de colonias presentes en la PTAR del Hospital Santa Sofía, ilustración 15 en el efluente y la recámara de lodos activados. En el agar Mueller Hinton para bacterias heterotróficas totales se evidenció mucho crecimiento de colonias, inclusive en algunos casos el número no fue cuantificable, haciendo observación en este medio no selectivo se pudo notar un crecimiento mayor en las placas correspondientes a las muestras de lodos activados, lo siguiente puede mostrar una mayor concentración de bacterias heterotróficas en la recámara de lodos activados de la PTAR. Esto puede deberse a lo mencionado por. (Hassard et al., 2016). donde relacionan a las bacterias provenientes de este tipo de matrices, en donde se encuentran heces y fluidos humanos donde los microorganismos pueden estar unidos y por ende estar parcialmente protegidos de agentes antimicrobianos o procesos nocivos, como luz ultravioleta, que pueden ocurrir en el agua.



*Ilustración 15. Agar Mueller Hinton, bacterias heterotróficas totales.
Fuente: Elaboración Propia.*

9.1.2. Bacilos Gram negativos agar MacConkey.

Se encontraron bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa, evidenciándose por el cambio de color del medio. Ilustración 17, provocado por la caída del pH (lactosas positivo), correspondientes a Enterobacterias, tipificados en agar MacConkey, esto acorde a estudios realizados que evidencian que la mayoría de los organismos aislados de ambientes hospitalarios son de este tipo y causan enfermedades infecciosas cada vez más persistentes, (Hernández-Gómez et al., 2014). Ilustración 16, se pudo detectar el crecimiento de bacterias Coliformes identificándolas por la coloración rosa brillante a roja. En los cultivos realizados en agar MacConkey hay mayor presencia de bacilos Gram negativos en las Aguas del efluente Hospitalario, esto se debe a que estos son comúnmente encontrados en este tipo de ambientes y sirven como indicadores de calidad de agua. (Bolaños et al., 2015).

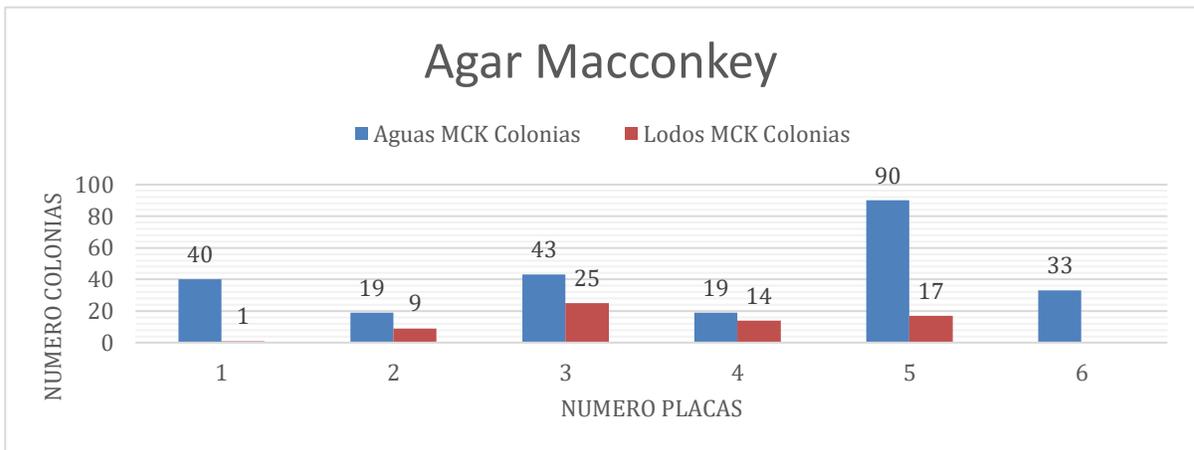


Ilustración 16. Crecimiento de colonias en agar MacConkey en aguas y lodos activados.
Fuente: Elaboración Propia.

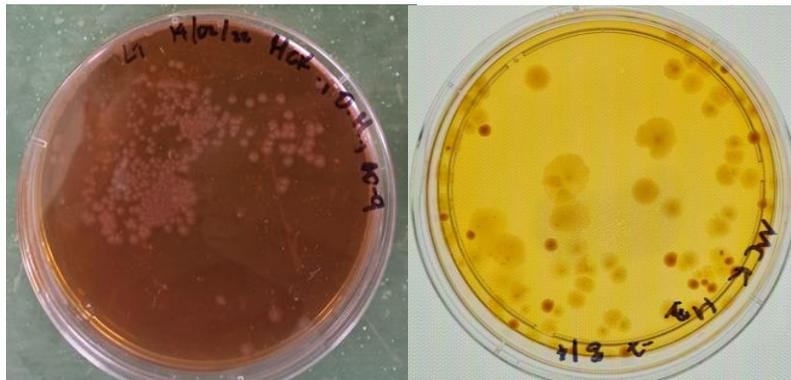


Ilustración 17. Agar MacConkey: Bacilos Gram negativos y enterobacterias, (fermentadores de lactosa, derecha, Lac+) Gram negativos, (no fermentadores de lactosa, (Izquierda, Lac-).
Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 3. Tipificación Agar MacConkey
Fuente: Elaboración Propia.

Tipo de Bacteria	Total, de Colonias	UFC mL promedio
Bacilos Gram +	310	Total
Lactosa +	76	3,38E+08
Lactosa -	234	6,26E+08

En la tipificación y conteo de colonias correspondientes a bacilos Gram negativos y entero bacterias hecha en agar MacConkey, Tabla 3, se puede observar, tipificar bacterias fermentadoras de lactosa (Lac +) y no fermentadoras de lactosa (Lac -) identificándolas por medio

del cambio de coloración en el medio ocasionado por la producción de ácido láctico en su metabolismo y por ende una caída del pH. Un cambio de color amarillo en este, Ilustración 17. Indica el crecimiento de bacilos Gram negativos que fermentan lactosa (Lac +), al contrario de una coloración roja (color original del medio), y colonias color blanquecinas y amarillentas muestra crecimiento de bacterias Gram negativas no fermentadoras de lactosa (Lac-) (Atlas, 2010). Estos resultados indican un alto porcentaje de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa, siendo estos últimos de mayor importancia debido a que dentro de esta tipificación pueden encontrarse patógenas como: *E. coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, que son comúnmente encontradas en aguas. (Hassard et al., 2016). Esto acorde con los resultados obtenidos en Ilustración 16, en donde se puede notar un crecimiento mayor en aguas para este cultivo.

9.1.3. Agar Chromocult Coliformes.

Para este agar se obtuvieron colonias en diferentes tonalidades: rojas, amarillas y azules. El agar para coliformes totales y *E. coli*. Chromocult es un medio de cultivo cromógeno diferencial para el análisis microbiológico de muestras de aguas. Mediante el uso de este medio se pudo diferenciar, y enumerar *E. coli* en un lapso de 24 horas y bacterias coliformes del agua. Ilustración 18. (Paredes. A, 2014). Se identificaron bacterias no coliformes, tornándose incoloras o con baja frecuencia, también tomando color beige o amarillo pálido. (Paredes. A, 2014).

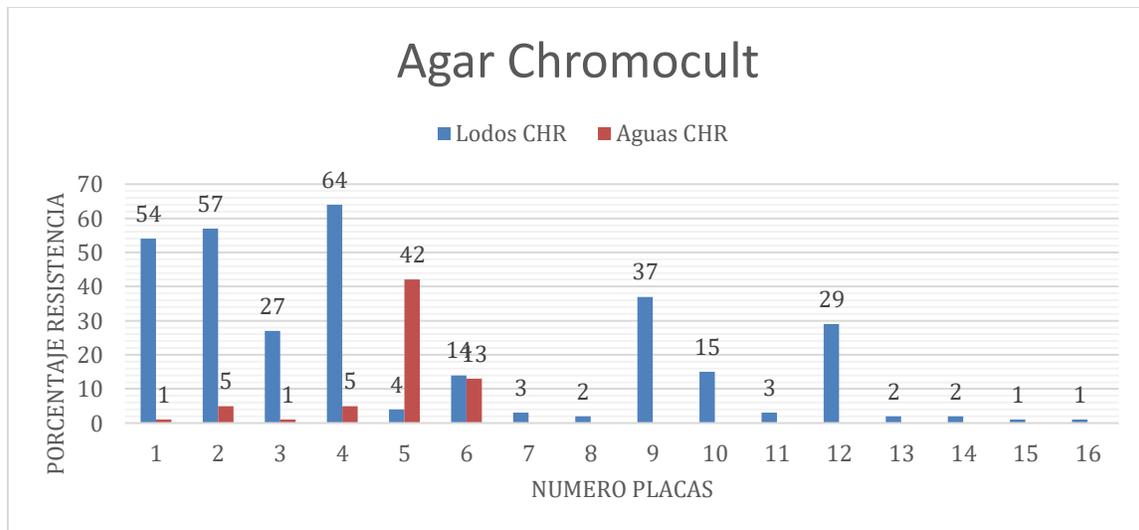


Ilustración 18. Crecimiento de colonias en agar CHR en lodos y aguas.
Fuente: Elaboración Propia.

Para coliformes totales y *E. coli*, se utilizó agar Chromocult, un medio de cultivo cromógeno diferencial para el análisis microbiológico de muestras de aguas y lodos. Se pudo encontrar en la PTAR mediante tipificación en medio diferencial, colonias azules correspondientes a *E. coli*, con un porcentaje total observado en todos los cinco muestreos de: 14% y un porcentaje de 31% para el conteo de colonias rojas correspondientes a otras bacterias Coliformes, Ilustración 20, también se observaron en los medios de cultivo colonias de coloración beige pálidas clasificándolas como otro tipo de bacterias no coliformes.

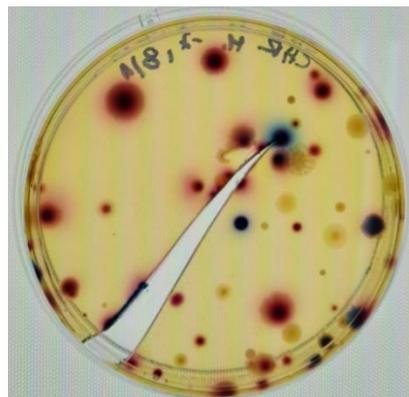


Ilustración 19. Medio diferencial Chromocult. Colonias azules-violeta (*E. coli*), Rojas (Coliformes), amarillas (otras bacterias-no coliformes) Entero cocos.
Fuente: Elaboración Propia.

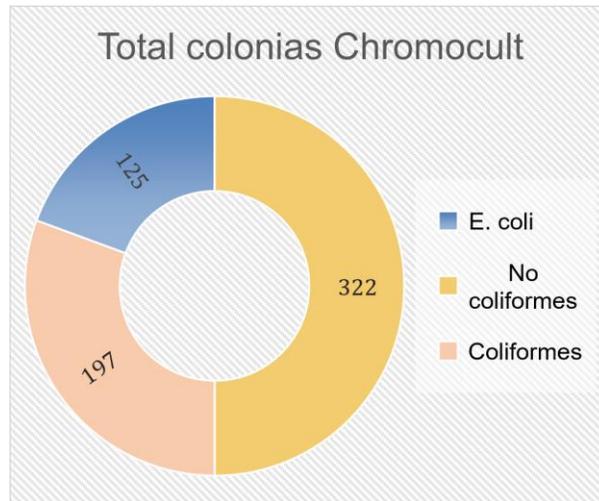


Ilustración 20. Total, de colonias encontradas en medio diferencial. Colonias azules *E. coli*, colonias rojas Coliformes, colonias Beige bacterias no coliformes.
Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 4. Tipificación en agar Cromogeneo Chromocult Fuente: Elaboración Propia.

Color	Total, colonias	Tipo bacteria	UFC mL promedio
Azules	125	<i>E. coli</i>	2,78E+09
Beige	322	Otras no coliformes	7,16E+09
Rojas	197	Grupo coliformes	4,38E+09

Según la Tipificación en agar Chromocult para *E. coli* y el grupo de los coliformes, Tabla 4, encontrados en sitio de estudio (PTAR Hospital Santa Sofia), se encontró colonias azules, según especificaciones del medio utilizado Chromocult corresponden a *E. coli*. (VALTEK S.A., n.d.). estos resultados muestran una gran presencia de *E. coli*, como también bacterias del grupo de los coliformes (color rojo) en este tipo de sitios destacando como en esta matriz compleja pueden encontrarse altas concentraciones de bacterias coliformes y desarrollar resistencia por parte de bacilos gran negativos teniendo en cuenta su alto número de UFC, 4,4E+09 para otros coliformes y 2,8E+09 para *E. coli*, así agravando el problema de la generación de resistencia a antibióticos como los β -lactámicos, gentamicina y amoxicilina tal como lo muestran en su estudio (Tzoc et

al., 2004). Estos resultados en UFC para E. coli y el grupo de los coliformes mostrando alta concentración de este tipo de bacterias en la recámara que corresponde al efluente de la planta de tratamiento, similar a los resultados mostrados por. (Beltrán Dávalos et al., 2019).

9.2. Prueba de Resistencia antibióticos.

9.2.1. Mueller Hinton Agar Heterotróficas totales.

Utilizando la técnica de dilución en agar, con cuatro antibióticos, AMP (ampicilina); GNT (gentamicina); CPF (ciprofloxacina); CFT (ceftriaxona), se encontró para las bacterias heterotróficas totales un alto grado de resistencia a Ciprofloxacina, obteniendo niveles muy altos de crecimiento en las cuatro concentraciones utilizadas incluyendo la MIC. En antibióticos como ampicilina y Ceftriaxona se notó porcentajes de resistencia entre 82% y 64% en la MIC. Para la gentamicina se observó crecimiento en la menor concentración utilizada correspondiente a 4 µg L⁻¹. Lo que muestra un indicio en la adquisición de resistencia de las bacterias heterotróficas totales a la Gentamicina (Ilustración 21).

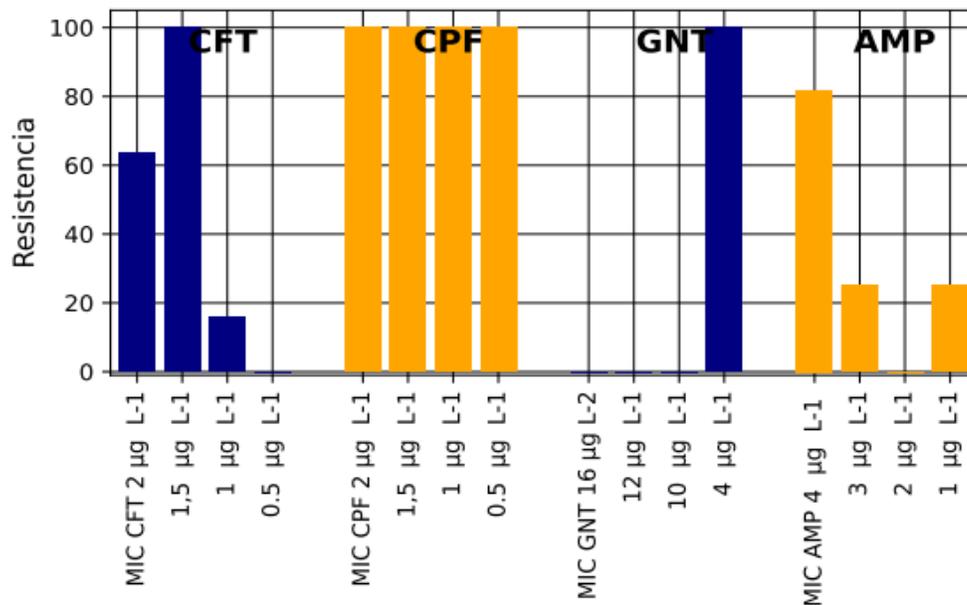


Ilustración 21. Porcentaje de resistencia Bacterias Heterotróficas totales agar Mueller Hinton.
Fuente: Elaboración Propia

El porcentaje de bacterias resistentes se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje Resistencia} = \frac{\text{Numero de colonias con antibiótico}}{\text{Numero de colonias sin antibiótico}} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de Resistencia.

Estos resultados sugieren que las bacterias heterotróficas totales presentaron un porcentaje considerable de resistencia a los antibióticos usados.

Por otra parte, es importante destacar que gracias a las aproximaciones analíticas realizadas en este trabajo mediante el uso de técnicas cromatográficas como UHPLC para la identificación de fármacos en este caso antibióticos, se puede hacer una correlación entre los contaminantes emergentes (antibióticos) y la relación ecológica que su presencia implica, en este caso el aumento de la RAM como respuesta adaptativa de los microorganismos a estos agentes extrínsecos y por tanto desencadenando problemáticas de salud pública humana y deterioro del medioambiente.

Es fundamental destacar la resistencia que se evidenció en bacterias heterotróficas totales al antibiótico ciprofloxacina, esto pudiendo explicarse por su alta frecuencia de ocurrencia y altas concentraciones encontradas por diferentes autores en plantas de tratamiento hospitalarias. (Serna-Galvis et al., 2022),(Hughes et al., 2013).

9.2.2. Agar selectivo *Chromocult*, Coliformes.

Para la tipificación de *E. coli*, coliformes totales y fecales presentes en aguas se empleó el agar Chromocult, evidenciando porcentajes de resistencia muy altos en la MIC y las concentraciones 1,5 1 y 0,5 correspondientes al β -lactámico ceftriaxona. También se destaca resistencia a la

ciprofloxacina en la MIC y en una de las concentraciones por debajo de esta. Para los dos antibióticos, gentamicina y ampicilina no se observó crecimiento ni en la MIC tampoco en las concentraciones por debajo de esta.

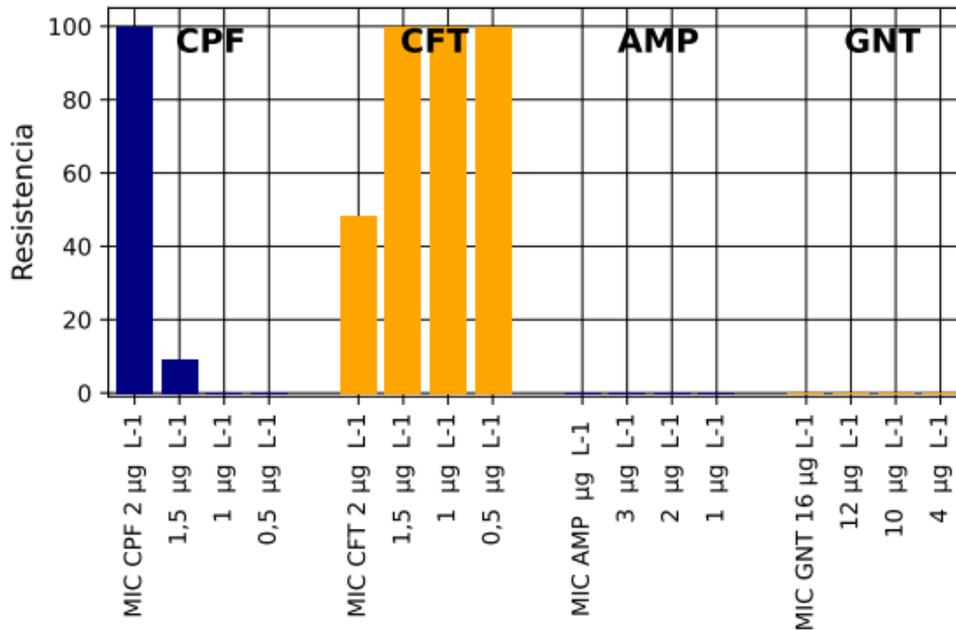


Ilustración 22. Porcentaje coliformes resistentes tipificados, agar Chromocult.
Fuente: Elaboración Propia

En agar Chromocult fueron tipificadas, *E. coli*, coliformes totales, fecales, enterococos y otro tipo de bacterias no coliformes, mostrando un elevado porcentaje de resistencia para la MIC y todas las concentraciones por debajo de Ciprofloxacina. Pudiéndose explicar, según reportes hechos por (Serna-Galvis et al., 2022). Esta quinolona tiene mucha presencia en este tipo de matrices, generando así alto grado de presión selectiva a este tipo de organismos.

También se encontraron resultados de resistencia para una cefalosporina de tercera generación, ceftriaxona, de 48% para la MIC, ilustración 22, indicando una creciente resistencia a este tipo de antibióticos, lo cual genera preocupación por el agravamiento de infecciones causadas por

este tipo de bacterias pudiendo desencadenar infecciones difíciles de tratar, y agravamiento en los tratamientos existentes según (G Martin N, 2002).

Especies de *Streptococos* y *Enterococos* al presentar proteínas fijadoras de penicilina, PBP'S que son partícipes en la formación de la membrana bacteriana donde tienen su blanco, los β -lactámicos al sufrir cambios en su estructura inhiben la acción del fármaco haciendo inútil el tratamiento y desencadenando resistencia.

Según estos autores se puede relacionar el aumento de resistencia de los enterococos tipificados a la ceftriaxona por presentar enzimas que inhiben este tipo de antibióticos, de ahí, la necesidad de implementar programas para el uso prudente de los antibióticos en los hospitales del país, y la importancia de seguir haciendo ensayos analíticos para la determinación de fármacos contrastados con ensayos biológicos, para verificar como en este caso, la incidencia de la presencia antibióticos en este tipo de medios, y así tener control y evidencia sobre epidemiología de las aguas residuales para hacer seguimiento estricto en las ciudades y controlar la creciente diseminación de organismos multiresistentes en ambientes hospitalarios (Rada et al., 2019).

En consecuencia, es de importancia considerar que las bacterias farmacorresistentes causan un impacto negativo a los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres (Acevedo Barrios et al., 2015). Según la Organización Mundial de la Salud, (2018) la farmacorresistencia bacteriana es uno de los mayores problemas para la salud pública a nivel mundial. Por otro lado, las aguas residuales hospitalarias y municipales son un punto crítico de farmacorresistencia bacteriana al presentar mezclas complejas de diversos antimicrobianos, siendo las PTAR un sitio adecuado para su proliferación (Tzoc et al., 2004).

9.2.3. Agar MacConkey Bacilos Gram negativos y Enterobacterias

Se tipificó a los bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa, mediante la diferenciación de coloración provocada por una caída en el pH del medio, detectándose por la aparición de colonias de tonalidades rosa brillante a rojas, correspondientes a Coliformes, que pueden incluir halos que corresponden a fermentadoras de lactosa (Lactosa positiva).

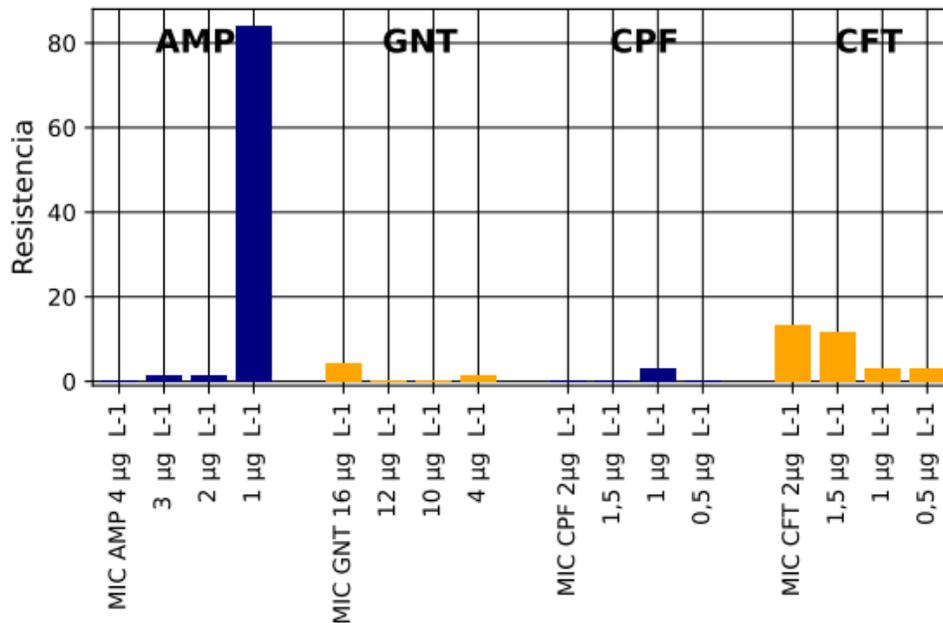


Ilustración 23. Porcentaje bacilos Gram negativos, entero bacterias resistentes (ciprofloxacina, ceftriaxona, ampicilina gentamicina) tipificadas agar MacConkey.
Fuente: Elaboración Propia

Se encontraron bacterias Gram negativas, lactosa positiva, negativa y entero bacterias tipificadas por agar MacConkey resistentes a la ceftriaxona, tal como lo evidencian (Maroneze et al., 2014c). En el medio selectivo se observó para bacilos Gram negativos, Lac +, Lac - y enterobacterias, se notó mayor porcentaje de resistencia a la Ceftriaxona, ilustración 23, obteniendo valores de 13% en la MIC (2 µg L⁻¹). Un 12 % en la concentración inmediatamente menor (1,5 µg L⁻¹) de esto se deduce que los bacilos Gram negativos y enterobacterias fueron resistentes, pudiendo estos ser *E. coli* u otro tipo de coliformes como lo manifiestan (Bolaños et al., 2015).

También se encontró para ciprofloxacina y gentamicina porcentajes 4% y 3% respectivamente, siendo importante el indicio de inhibición a estos antimicrobianos y generando una alerta en el medio hospitalario, ecosistema urbano y ambiental, puesto que los bacilos Gram negativos son responsables en gran medida de infecciones nosocomiales y adquisición de resistencia a diferentes antibióticos, como quinolonas y aminoglucósidos, (Ciprofloxacina y Gentamicina respectivamente). (G Martin N, 2002).

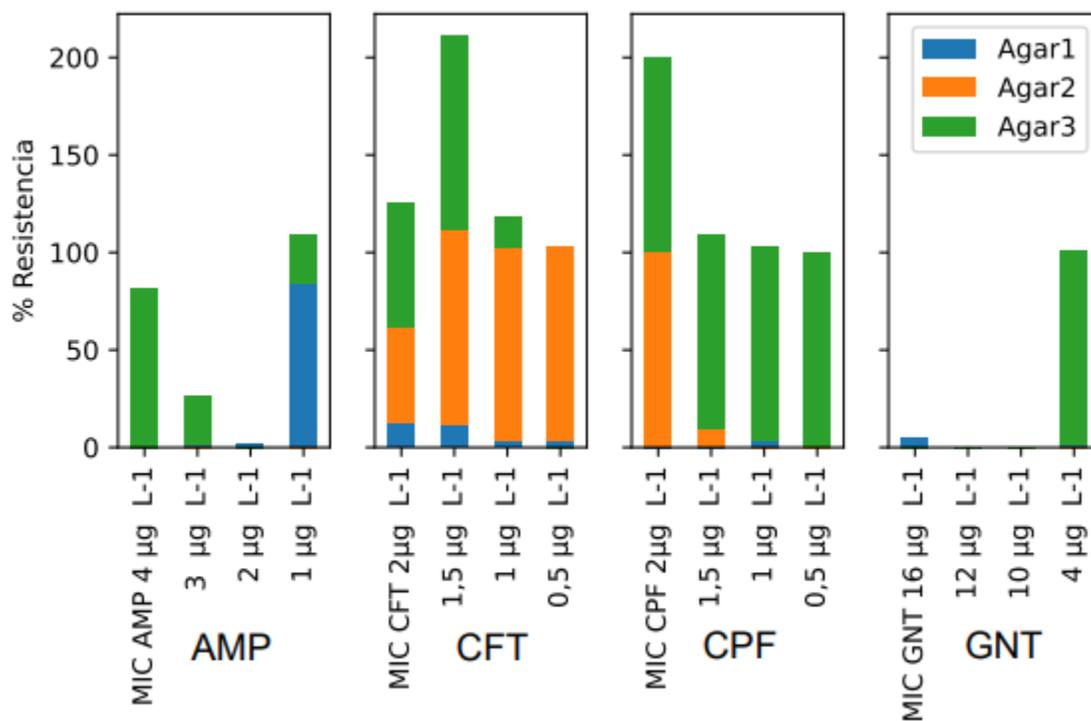


Ilustración 24. Bacterias heterotróficas totales (agar 3), grupo de los coliformes (agar 2), bacilos Gram negativos y enterobacterias (agar 1) resistentes a tratamientos con 4 antibióticos AMP (ampicilina); GNT (gentamicina); CPF (ciprofloxacina); CFT (ceftriaxona).
Fuente: Elaboración Propia.

Se observa una alta resistencia a los antibióticos ciprofloxacina y ceftriaxona en bacterias heterotróficas totales, agar Mueller Hinton (Ilustración 24, agar 3), la misma tendencia de resistencia se presentó en coliformes tipificados en agar Chromocult. También se observó resistencia a la ceftriaxona, esto se puede corroborar en estudios realizados en plantas de

tratamiento hospitalario que reportan la diseminación de adquisición de resistencia de bacterias de la familia de los coliformes. (Martínez-Orgániz et al., 2020).

En agar MacConkey se observó poco porcentaje de resistencia de bacilos Gram negativos para ciprofloxacina utilizando las cuatro concentraciones descritas en la metodología. En cuanto a la ampicilina se puede ver inhibición creciente lo que indica indicios de adquisición de resistencia en agar MacConkey, (Ilustración 23) que tipifica bacilos Gram negativos y enterobacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Respecto a la ceftriaxona se evidenció un incremento en la resistencia en el grupo de los coliformes en agar Chromocult, presentando crecimiento en las cuatro concentraciones empleadas. (Ilustración 22).

El análisis de susceptibilidad mostró perfiles de resistencia altos ante ciprofloxacina y ceftriaxona, una quinolona y β -lactámico respectivamente, en la tipificación se mostró que el grupo de los coliformes presentaban la misma tendencia de resistencia que en el agar Mueller Hinton para heterotróficas totales, como también en la tipificación en agar MacConkey para bacilos Gram negativos y entero bacterias. Al comparar los perfiles de resistencia encontrados en bacilos Gram negativos se observa un indicio en el desarrollo de resistencia a la ampicilina, la cual no se observó en la tipificación en agar Chromocult, (grupo de los coliformes), pero al hacer la comparación con agar Mueller Hinton (heterotróficas totales), Ilustración 21, se notó perfiles similares, esto pudo deberse a la repuesta de otro grupo de microorganismos como Gram +, u otro tipo de microorganismos que pueden ser analizados en estudios posteriores, y así obtener un análisis cada vez más amplio de la RAM.

9.3. Presencia de amoxicilina y cefalexina en la PTAR Hospital Santa Sofía

Se hizo calibración por estándar externo, usando antibióticos de uso comercial, se evaluaron seis puntos de calibración de 10 hasta 600 mg/L para Amoxicilina y Cefalexina, obteniendo así una

relación entre concentraciones versus absorbancia, dando como resultado las curvas para cada análisis. Se calcularon las incertidumbres, la pendiente y el intercepto empleando análisis de estimación lineal para estos valores, como también LOD, LOQ y sensibilidad del calibrado. Reportados en la Tablas 5 y 6.

9.3.1. Curva de Calibración: LOQ, LOD, sensibilidad

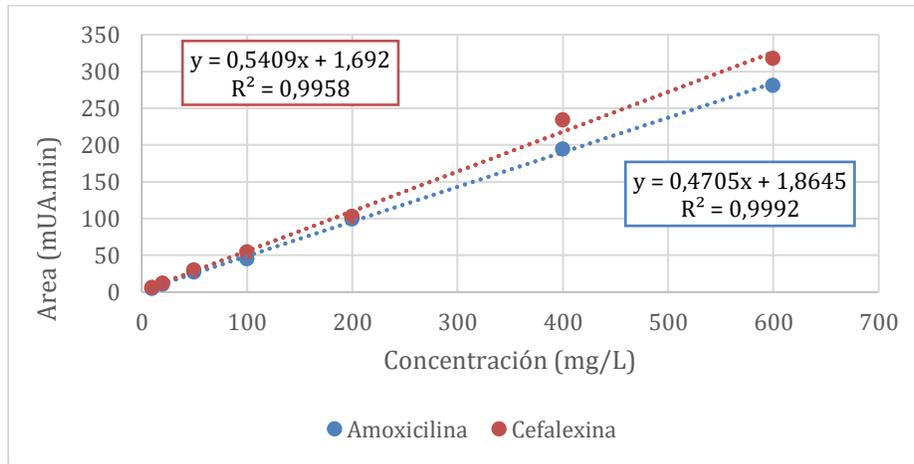


Ilustración 25. Curva calibración estándares amoxicilina, cefalexina, seis puntos de calibración de 10 hasta 600 mg/L. Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 5. Estimación lineal, calibración amoxicilina. Fuente: Elaboración Propia.

Amoxicilina			
<i>m</i>	0,4705	1,8645	<i>b</i>
<i>Sm</i>	0,0060	1,7119	<i>Sb</i>
<i>R2</i>	0,9992	3,2825	<i>Sy/x</i>
Sensibilidad de calibrado	0,470	mUA.min/(mg/L)	
Límite de detección (LOD)	0,038	mg/L	
Límite de cuantificación (LOQ)	0,127	mg/L	

Tabla 6. Estimación lineal, calibración cefalexina.
Fuente: Elaboración Propia.

Cefalexina			
<i>M</i>	0,540882393	1,69204244	<i>B</i>
<i>Sm</i>	0,015736448	4,50230602	<i>Sb</i>
<i>R2</i>	0,995785524	8,63274155	<i>sy/x</i>
Sensibilidad de calibrado		0,54088239	mUA.min/(mg/L)
Límite de detección (LOD)		0,08728209	mg/L
Límite de cuantificación (LOQ)		0,29094029	mg/L

La sensibilidad del calibrado, corresponde a la pendiente (*m*) de la curva de calibración obtenida, la cual muestra la variación de la señal por unidad de cambio de la concentración. El límite de detención (LOD) fue calculado usando la expresión:

$$LOD = 3sm/m$$

El LOD corresponde a la mínima concentración detectable de manera confiable por esta técnica. Por lo tanto, es posible detectar concentraciones de antibióticos dentro del rango 0,04 mg/L para amoxicilina y 0,09 mg/L para cefalexina. El LOQ es la mínima concentración cuantificable en condiciones confiables, se calculó el parámetro utilizando la siguiente ecuación:

$$LOQ = 10sm/m$$

Donde *m* es la pendiente y *s_b* la incertidumbre del intercepto del calibrado, es decir, los antibióticos se vuelven cuantificables cuando se encuentran en concentraciones 0,13 mg/L y 0,3 mg/L para amoxicilina y cefalexina respectivamente.

9.3.2. Detección y cuantificación.

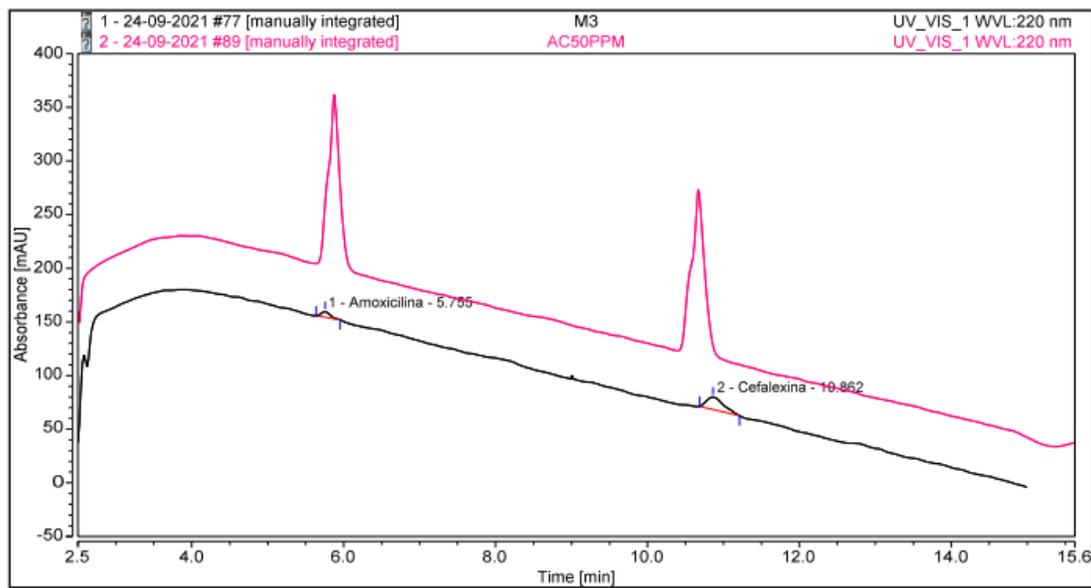
Utilizando cromatografía líquida de alto desempeño HPLC (high performance liquid chromatography) en cuatro muestreos realizados durante el año 2021-2022 se pudo corroborar, analizando y comparando los cromatogramas de las muestras reales y los estándares de calibración, dentro del total de 17 muestras obtenidas del efluente de la PTAR Hospital Santa Sofía de Manizales, se encontró presencia de antibióticos, en cinco muestras correspondientes

a amoxicilina y cefalexina, obteniendo cuatro muestras en donde se detectó la presencia de amoxicilina las cuales se encontraban en un rango inferior al detectable, se pudo también encontrar y cuantificar cefalexina en una muestra, como lo indica la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de antibióticos PTAR Santa Sofía.
Fuente: Elaboración Propia.

Muestra real Área	Antibiótico	Concentración real mg/L
1,083	amoxicilina	<LOD
0,7825	amoxicilina	<LOD
0,7726	amoxicilina	<LOD
0,6946	amoxicilina	<LOD
2,7744	cefalexina	2,00

Ilustración 26. Comparación estándares de calibración y muestra real amoxicilina cefalexina.
Fuente: Elaboración Propia.



Siendo la resistencia bacteriana una preocupación a nivel mundial que compromete seriamente la capacidad de tratar infecciones y aumenta el tiempo de tratamientos convencionales, causando también degradación de los ecosistemas acuáticos y terrestres, se ha venido generando alarma en el ámbito hospitalario como en la comunidad, esto ha impulsado el inicio

de estudios sobre este asunto, en Colombia estudios a finales de los años 90 trajeron a la luz esta problemática. (Instituto Nacional de Salud, 2018).

En esta investigación se identificó la presencia de amoxicilina y cefalexina en 5 muestras PTAR Hospital Santa Sofia, cuantificando en una de estas la concentración correspondiente a cefalexina de 2 mg/ L y la presencia amoxicilina en 4 muestras más. Según (Teshome et al., 2020). bacterias aisladas de plantas de tratamiento, muestran que *E. coli* presenta porcentajes de resistencia más alta para antibióticos del grupo de los β -lactámicos y cefalosporinas probados en concentraciones de (20) $\mu\text{g/L}$, esto es de especial cuidado, ya que como se menciona antes se encontró una concentración alrededor de los 2 mg/L en esta PTAR para los antibióticos cefalexina y amoxicilina, lo cual estaría generando presión selectiva en los microorganismos presentes en este tipo de lugares, según estudios anteriores muestran un porcentaje de resistencia de alrededor del 48% en plantas de tratamiento Hospitalario para *E. coli*. (Teshome et al., 2020).

9.4. Identificación de antibióticos presentes

En un total de 17 muestras tomadas en el hospital Santa Sofia en Manizales se encontró la presencia de amoxicilina y cefalexina en cinco muestras en total, comparando los tiempos de retención con los de los estándares preparados ilustración 26, se pudo identificar estos dos antibióticos β -lactámicos en el efluente de la PTAR de este hospital, (Tabla 7).

Se puedo observar que, para las cuatro concentraciones de amoxicilina y cefalexina calculadas con la curva de calibración, se corroboró la presencia de amoxicilina y cefalexina en el efluente de la PTAR del Hospital Santa Sofia en concentraciones menores a 1 ppm para amoxicilina y de 2 ppm para cefalexina. Teniendo en cuenta estos hallazgos existe una alerta al presentarse este tipo de fármacos en esta matriz, pudiendo generar presión selectiva y resistencia bacteriana a estos fármacos, ya que como lo indica (Martínez-Orgániz et al., 2020). En estudios de resistencia

bacteriana en una PTAR para Coliformes, se obtuvo resistencia ante concentraciones del orden de los 30 µg/L, siendo esta una concentración con tres órdenes de magnitud menor a la que se encontró en este estudio. Según (Chiriboga Sisalema, 2019). Se puede evidenciar que la presencia de antibióticos en plantas de tratamiento hospitalarias genera inminidad bacteriana a estos como se pudo corroborar en la planta de tratamiento del hospital Santa Sofia se observó una resistencia a la ciprofloxacina, según la literatura fármaco reincidente en este tipo de ambientes (Petrie et al., 2015).

9.5. Perspectivas

Con el estudio de la RAM actualmente se ha venido evidenciando el surgimiento de microorganismos cada vez más resistentes a los tratamientos actuales con antibióticos, esto ha significado el deterioro en la salud humana y degradación del medioambiente, todo esto enlazado con el surgimiento de contaminantes emergentes provenientes de productos usados en las industria, sector salud, veterinario, farmacéutico, agroindustrial, entre los que se encuentran: pesticidas, antibióticos, hormonas, desinfectantes que llegan a medios acuáticos y terrestres (Fernández et al., 2003).

Estos productos remanentes y cada vez más persistentes en el ambiente, están causando fenómenos adaptativos en bacterias patógenas que, mediante presión selectiva, transferencia horizontal de genes, enzimas que actúan en los fármacos, adquieren resistencia a estos (Acevedo Barrios et al., 2015). Mediante técnicas analíticas como: cromatografía de líquidos de alto rendimiento HPLC y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas LC-MS, se ha podido identificar residuos remanentes de antibióticos afluentes hídricos en plantas de tratamiento PTAR como también en diferentes fuentes hídricas como ríos, bahías, lagos. (Zambrano et al., 2018).

De acuerdo técnicas de análisis de determinación de compuestos químicos y microbiológicos en las muestras recolectadas en las PTAR hospital Santa Sofia, se identificó la presencia de dos β -lactámicos amoxicilina y cefalexina, todo esto haciendo correlación por ensayos biológicos (técnica dilución en agar) encontrando bacterias con distintos porcentajes de resistencia a diferentes grupos de fármacos antimicrobianos entre estos, β -lactámicos, quinolonas, y aminoglucósidos también se encontraron distintos grupos de bacterias resistente entre estas: Bacilos Gram negativos, Entero bacterias, Coliformes, E. coli. Mediante el uso de agares selectivos (MacCokey, Chomocult).

Diversos estudios han demostrado que los residuos de fármacos son difíciles de remover con tratamientos biológicos convencionales como los que se llevan a cabo en plantas de tratamiento por lo que requieren tratamientos adicionales para su eliminación.(Chiriboga Sisalema, 2019). tratamiento fotoquímicos como la fotocatalisis heterogénea parecen ser efectivos en el tratamiento de este tipo de matrices que contienen diversidad de contaminantes complejos, pues esta técnica no es selectiva y puede utilizarse para estos fines, por ejemplo, en aguas contaminadas con amoxicilina empleando este método se logró la eliminación del 100% de este fármaco. (Blanco Gálvez et al., n.d.). Se han utilizado también métodos como la oxidación catalítica fenton y sonólisis o ultrasonido. (Blanco Gálvez et al., n.d.).

Por lo que se debe implementar programas de correcto uso de los antibióticos, como también su disposición final, también evitar antibióticos que están siendo recalcitrantes en este tipo de ambientes como la ciprofloxacina, amoxicilina, cefalexina están generando elevados porcentajes de resistencia en bacterias asiladas del efluente de plantas de tratamiento y así evitar por la presencia de remanentes de antibióticos la generación de presión selectiva en microorganismos. Se debe seguir con estudios descriptivos y determinantes en medios acuáticos y sitios de alta contaminación como plantas de tratamiento hospitalario y municipal. Elaborar métodos rápidos, eficaces y versátiles biosensores para la detección de contaminantes emergentes, del tipo antibióticos, plaguicidas, hidrocarburos, parabenos, como también sensores para la detección de

cepas resistentes y enzimas bacterianas como β -lactamasas, carbapenemasas en ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos. Y así generar alternativas eficaces y rápidas para disminuir o evitar la degradación del medioambiente y por ende evitar problemas de salud pública y ambiental.

Los resultados de la identificación de los dos β -lactámicos se correlacionan con el aumento de la resistencia antibacteriana, puesto que al encontrarse aún en pequeñas concentraciones se ha descrito según autores son suficientes como para ocasionar que los organismos tiendan a adaptarse por presión selectiva y así generan diversas estrategias para proliferarse en el medio en el que está presente el antibiótico, esto generando un fenómeno de resistencia a los antibióticos. (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016a).

Teniendo en cuenta este estudio se deben hacer ensayos y tipificaciones a más grupos de microorganismos como gram positivos, y anaerobios estrictos los cuales brindarían información valiosa y complementaria para poder tener conocimiento cada vez más amplio sobre los distintos grupos de bacterias resistentes.

Mediante estudios en hospitales e identificación de fármacos más remanentes y más habituales en PTAR y hospitales se debe hacer censos sobre el uso de antimicrobianos teniendo en cuenta los más usados y los que están siendo más remanentes en estos sitios para establecer protocolos de control de los mismos y disminuir su uso para así no generar problemas graves como la RAM, esto acompañado de técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia, líquidos masas, desarrollando métodos eficaces, amigables con el medio ambiente y rápidos para la determinación de más grupos de antibióticos presentes en matrices acuosas.

10. Conclusiones

- Se puede evidenciar que las aguas residuales hospitalarias son una matriz compleja (química y biológicamente) en donde se encuentra gran cantidad de bacterias heterotróficas totales, bacterias del grupo de los coliformes, bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa, como también residuos de antibióticos remanentes provenientes de tratamientos y excretas humanas, pudiendo este tipo de lugares servir como reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos y al tiempo generar resistencia de las bacterias nativas a los fármacos normalmente usados y que están presentes en estas aguas.
- Las bacterias tipificadas mediante el uso de agares selectivos mostraron porcentajes de resistencia a los cuatro antibióticos usados en la investigación, mostrando el aumento de bacterias resistentes presentes en estos sitios y dando una alerta ante el aumento de este tipo de patógenos que pueden ser diseminados valiéndose de fuentes hídricas o valiéndose de la cadena alimentaria, constituyendo las PTAR lugares idóneos para la proliferación de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos.
- Se determinó el porcentaje de resistencia para cuatro tipos de antibióticos (gentamicina, ceftriaxona, ampicilina, ciprofloxacina) mostrando resistencia creciente en la PTAR hospitalaria, ocasionando que las bacterias del medio por presión selectiva desarrollen mecanismos inhibitorios como producción de enzimas, diseminación de plásmidos de resistencia y por ende adaptación a este tipo de matriz compleja y proliferación al ambiente
- Según la tipificación realizada con agares selectivos para Coliformes, bacilos Gram negativos y enterobacterias se observó resistencia bacteriana de estos microorganismos

a fármacos. Dinámica que genera preocupación frente a microorganismos del tipo enterobacterias y coliformes especialmente, asociados a la generación de resistencia y causa de infecciones, cada vez más complejas en su tratamiento y control.

- La presencia de amoxicilina y cefalexina en este tipo de matriz acuosa, determinando la concentración de cefalexina 2 mg/L en una de las muestras, mostrándonos que este tipo de ambientes pueden contener residuos de antibióticos no metabolizados provenientes de excretas humanas, desechos y mostrando que este tipo de lugares está causando la diseminación, surgimiento de cepas de bacterias resistentes que están afectando tanto la salud humana como degradando el equilibrio e inocuidad del ecosistema acuático y terrestre.
- En el agar Mueller Hinton se presentó alto porcentaje de resistencia, mayor al 50% en bacterias heterotróficas totales a la ciprofloxacina, siendo este uno de los antibióticos con mayor presencia en estudios anteriormente realizados dentro de plantas de tratamiento en hospitales en Colombia y el mundo.
- Se encontró resistencia persistente a la ciprofloxacina, y ceftriaxona mayor al 80 % en bacterias heterotróficas totales, al hacer la tipificación en agar selectivo Chromocult para el grupo de los coliformes mostraron la misma tendencia de resistencia a la ceftriaxona obteniendo porcentajes de resistencia de 48 % en la MIC y mayores al 90 % en las tres concentraciones inferiores; para la ciprofloxacina se encontró resistencia en la MIC usada con valores superiores al 90 %
- Se pudo observar una tendencia a la adquisición de resistencia a la ampicilina, mostrando porcentajes de resistencia mayores al 90 % en la concentración menor. (1 $\mu\text{g L}^{-1}$), para

el grupo de los bacilos gran negativos y las entero bacterias, (fermentadores y no fermentadores de lactosa) tipificados en agar MacConkey, se logró corroborar la misma tendencia observada en Agar Mueller Hinton (heterotróficas totales), pero además se observó una resistencia a la gentamicina (4 % MIC) que podría atribuírsele a otro tipo de bacterias no tipificadas en el estudio como bacilos Gram positivos o anaerobios.

- Se encontró una alta concentración de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa, pudiéndose deber a que en este tipo de matrices confluyen gran cantidad de contaminantes fecales y fluidos de origen humano, y por lo tanto significando la presencia de bacterias patógenas peligrosas, como pueden ser del genero *Klebsiela*, *Pseudonomas* y enterobacterias.

Bibliografía

- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 33, Issue 10, pp. 692–699). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, Fla.
- Beltrán Dávalos, A., Escudero Vilema, M., Córdova Morales, S., & Rosero Erazo, C. R. (2019). Monitoreo microbiológico para la gestión ambiental de Aguas Residuales Hospitalarias. *Ciencia Digital*, 3(3.4.), 342–353. <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v3i3.4..882>
- Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. J. (2016a). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. J. (2016b). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Biddlecome, S., Haas, M., Davies, J., Miller, G. H., Rane, D. F., & Daniels, P. J. L. (1976). Enzymatic Modification of Aminoglycoside Antibiotics: a new 3-N-Acetylating Enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. <https://journals.asm.org/journal/aac>
- Blanco Gálvez, J., Malato Rodríguez, S., Estrada Gasca, C. A., Bandala, E. R., Gelover, S., & Leal, T. (n.d.). *3 PURIFICACIÓN DE AGUAS POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA: ESTADO DEL ARTE*.
- Bolaños, K., Sebastián, L., & Guzmán, M. (2015). *Evaluación de la resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina [Tesis pregrado, Universidad Santo Tomás]*. <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2898/2016dianabolanos.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Cavaliere, S. J. . . . [et al.]. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.

- Chiriboga Sisalema, I. J. (2019). *Bacterias resistentes a antibióticos en estaciones depuradoras de agua residual*.
<https://ebuah.uah.es/xmlui/handle/10017/41790#.YJBjp3Insu8.mendeley>
- Daniel C. Harris. (2003). *Ce 58*.
- Durand, J., & Garcinuño, R. (2016). *Estudio, desarrollo y aplicación de polímeros molecularmente impresos para la determinación de antibióticos en leche por cromatografía líquida de alta presión con detección en el ultravioleta (HPLC-UV)*. 258. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=72116>
- Espinosa, C. J., Cortés, J. A., Castillo, J. S., & Leal, A. L. (2011). Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. In *Biomédica* (Vol. 31).
- Fernández, R., Jorge López Hernández, M., Laida, D., Ponce Martínez, M., Caridad, D., & Betarte, M. (2003). RESISTENCIA BACTERIANA. In *Rev Cubana Med Milit* (Vol. 32, Issue 1).
- FLOREZ DUQUE, & SANCHEZ CORTES. (2017). *Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en tres microorganismos en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá*. [Tesis pregrado, Universidad Santo Tomás].
<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/4316/2017navibethflorez.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Fresco Merino. (2016). *Diseño y mecanismos de acción molecular de nuevos inhibidores de β -lactamasa*. [Tesis pregrado, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/49194/>
- G Martin N. (2002). *Resistencia Bacteriana a β -lactámicos: Evolución y Mecanismos*. G Martin N.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100016
- García Borges. (2016). *Evaluación del desempeño del método materia prima de cefalexina , cefaclor . 50(3), 1–12*.
<https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/36/40>
- García Castellanos, T., Castillo Marshal, A., & Daniel Salazar Rodríguez, L. (2014). Mechanisms of resistance to beta-lactams in Gram-negative bacteria. In *Revista Cubana de Salud Pública* (Vol. 40, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
- Guevara, D. J., Tannia, L., & Ramos, P. R. (2018). *Evaluación del funcionamiento de la planta de tratamiento de aguas residuales de la universidad estatal amazónica*. [Tesis pregrado, Universidad Estatal Amazónica Ecuador].
<https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/381>
- Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D. L., McDonald, J. E., & Malham, S. K. (2016). Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments-

A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>

- Hernández Rodríguez, Á. (2006). *Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona].
<https://www.tdx.cat/handle/10803/3898#page=1>
- Hernández-Gómez, C., Blanco, V. M., Mota, G., Correa, A., Maya, J. J., de la Cadena, E., Perengüez, M., Rojas, L., Hernández, A., Vallejo, M., Villegas, M. V., Martínez, E., Pallares, C., Rosso, F., Vélez, J. D., Castañeda, C., Muñoz, M., Vanegas, B., Matta, L., ... Torres, A. M. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomedica*, 34(SUPPL.1), 91–100.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
- https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a051.htm#google_vignette. (2015, May 28). *Amoxicilina Vademecum*.
https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a051.htm#google_vignette
- Hughes, S. R., Kay, P., & Brown, L. E. (2013). Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 47, Issue 2, pp. 661–677). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es3030148>
- Ministerio de Salud, Dirección de medicamentos y tecnologías en salud. (2018). *Plan nacional de respuesta a la resistencia a los antimicrobianos*.
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>
- Kanj, S. S., & Kanafani, Z. A. (2011). Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: Extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(3), 250–259. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0674>
- Katouli, M., Thompson, J. M., Gündoğdu, A., & Stratton, H. M. (2009). Antibiotic resistant bacteria in hospital wastewaters and sewage treatment plants. *Science Forum and Stakeholder Engagement: Building Linkages, Collaboration and Science Quality*, 225–229.
- Acevedo, L., Severiche, C., Jaimes, J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos *. *Producción + Limpia*, 10(2), 160–172.
<http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>
- Ramos, L Ortega, L. Vidal, Vilardyq, S., Saavedra, L. (2008). Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en analysis of the microbiological contamination (total and fecales coliforms) in the bay of santa marta, colombian caribbean. In *colomb* (vol. 13, issue 3).

- Luis, J., & Lisboa, C. (2011). Estado de los sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas de la cuenca del Lago de Maracaibo, Venezuela. *MULTICIENCIAS*, 11, 345–352.
- Maroneze, M. M., Zepka, L. Q., Vieira, J. G., Queiroz, M. I., & Jacob-Lopes, E. (2014a). A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Maroneze, M. M., Zepka, L. Q., Vieira, J. G., Queiroz, M. I., & Jacob-Lopes, E. (2014b). A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Maroneze, M. M., Zepka, L. Q., Vieira, J. G., Queiroz, M. I., & Jacob-Lopes, E. (2014c). A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Martínez, B, Cristhian Hernández, Cristhian Pallares, Robinson Pacheco, Kelly Hurtado, & Mónica Recalde. (2013). 4 E. *Martínez Buitrago et al Frequency and antibiotics resistance profiles of microbiological isolates at 13 clinics and referral hospitals in Santiago de Cali-Colombia*. <http://zl.elsevier.es>
- Martínez-Orgániz, Á., Garza-Ramos, U., Sampedro-Rosas, M. L., González-González, J., Nava-Faustino, G., & Toribio-Jiménez, J. (2020). Pathotypes and antibiotic resistance of escherichia coli in residual water. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 36(4), 957–966. <https://doi.org/10.20937/RICA.53711>
- Mella, S. M., Sepúlveda, M. A., González, G. R., Bello, H. T., Domínguez, M. Y., & Zemelman César Ramírez G, R. Z. (2004). Aminoglicósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia Aminoglycosides-aminocyclitols: Structural characteristics and new aspects on resistance. In *Rev Chil Infect* (Vol. 21, Issue 4).
- Ministerio de salud Chile. (2017). *Plan Nacional contra la resistencia a los antimicrobianos*. https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2017/08/Plan-Nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos.pdf
- Muñoz, N., Agudelo, C. I., Ovalle, M. V., & Realpe, H. (2012). *ARTICULO ORIGINAL*.
- Nikolaou, A., Meric, S., & Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>
- Pallares-Vega, R., Blaak, H., van der Plaats, R., de Roda Husman, A. M., Hernandez Leal, L., van Loosdrecht, M. C. M., Weissbrodt, D. G., & Schmitt, H. (2019). Determinants of presence and removal of antibiotic resistance

- genes during WWTP treatment: A cross-sectional study. *Water Research*, 161, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.100>
- Paredes, A. (2014). Implementación del protocolo para la determinación de Coliformes Totales y e. Coli en Agar Chromocult para la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC. [Tesis pregrado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://repositorio.utp.edu.co/items/abfab5ec-542f-4eee-b535-39adc65568c1>
- Peñate, I. Q., Javier, U., Haza, J., Wilhelm, A., & Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmaceuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 40(3), 173–179.
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram negative bacteria in Colombia (2001-2016). *Biomedica*, 39, 199–220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Ramos, C. (2008). Aguas residuales generadas en hospitales. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, vol. XXIX (2), 56–60. <https://riha.cujae.edu.cu/riha/article/view/130/129>
- Sarret, M. G., Perrodin, M. Y., & Prado, M. B. (2006). *Spécialité : Sciences de l'environnement DENISSE ARCHUNDIA PERALTA Mme. Sylvie Nazaret Mr. Pierre Benoit.*
- Serna-Galvis, E. A., Botero-Coy, A. M., Rosero-Moreano, M., Lee, J., Hernández, F., & Torres-Palma, R. A. (2022). An Initial Approach to the Presence of Pharmaceuticals in Wastewater from Hospitals in Colombia and Their Environmental Risk. *Water (Switzerland)*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/w14060950>
- Serra, H. (2008). *sepQuinolonasFarmacologiaM.*
- Teshome, A., Alemayehu, T., Deriba, W., & Ayele, Y. (2020). Antibiotic Resistance Profile of Bacteria Isolated from Wastewater Systems in Eastern Ethiopia. *Journal of Environmental and Public Health*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2796365>
- Tzoc, E., Laura Arias, M., & Valiente, C. (2004). *Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de Escherichia coli y Aeromonas sp* (Vol. 15, Issue 3). <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb041534.pdf>
- Universidad Mayor. (2019). *Antibióticos y Antimicrobianos.*
- Vacca, C. P., Niño, C. Y., & Reveiz, L. (2011). Investigación original / Original research. In *Rev Panam Salud Pública* (Vol. 30, Issue 6).

VALTEK S.A. (n.d.). COMBI-PLATE. <http://www.valtekdiagnostics.com>

Vanegas, M. L., Correa, N. C., Morales, A. M., Martínez, A. L., Rúgeles, L. G., & Jiménez, F. I. (2009). Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos In *Rev.MVZ Córdoba* (Vol. 14, Issue 2).

Wang, Q., Wang, P., & Yang, Q. (2018). Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Science of the Total Environment*, 621, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128>

Yamile Adriana Celis Bustos, Vivian Vanesa Rubio, & Maria Marcela Camacho Navarro. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo. *Evolutionary Origin of Antibiotic Resistance, a Historical Perspective*.

Yolanda Fuchs, L., Chihu, L., Conde, C., en, M. C., Manuel González, V., Humberto Noguez, A., Calderón, E., Avonce, N., Ovando, C., & en, M. (1993). *MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA BACTERIANA*.

Zambrano, P. E. L. R., Espinoza, J. A., Conte-Junior, C. A., & de la Torre, C. A. L. (2018). Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida. *Vigilância Sanitária Em Debate*, 6(2), 122. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00970>