

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA AMBIENTAL

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA E INGENIERO AMBIENTALES

TEMA:

**DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS, TETRACICLINAS
Y SULFAMIDAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN LOS RÍOS**

SAN PEDRO Y PITA DEL CANTÓN RUMIÑAHUI

AUTORES:

CHICAIZA RAMÍREZ SABRINA ESTEFANÍA

RAMOS LÓPEZ ALLAN DAVID

TUTOR:

LENIN JAVIER RAMÍREZ CANDO

Quito, junio del 2018

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros, Sabrina Estefanía Chicaiza Ramírez, con documento de identificación N°: 1104138449 y Allan David Ramos López, con documento de identificación N°: 1725166217; manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS, TETRACICLINAS Y SULFAMIDAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN LOS RÍOS SAN PEDRO Y PITA DEL CANTÓN RUMIÑAHUI”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERA E INGENIERO AMBIENTAL, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Chicaiza Ramírez Sabrina Estefanía
1104138449



.....
Ramos López Allan David
1725166217

Fecha: Junio, 2018.

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR/A

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS, TETRACICLINAS Y SULFAMIDAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN LOS RÍOS SAN PEDRO Y PITA DEL CANTÓN RUMIÑAHUI”, realizado por Sabrina Estefanía Chicaiza Ramírez y Allan David Ramos López, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, junio 2018.



.....

Lenin Javier Ramírez Cando

1104250426

AGRADECIMIENTO

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradezco en primer lugar a Dios por brindarme la sabiduría y su bendición para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mis padres Chicaiza Luis y Ramírez Martha, por inculcarme valores y el fortalecimiento para seguir adelante, por apoyarme, aconsejarme y por estar siempre conmigo en las buenas y malas; a mis hermanas.

A mis docentes quienes inculcaron su conocimiento y fortalecimiento de nuestra formación académica, a mis compañeros de clases quienes fueron partícipes de la formación profesional.

Finalmente, un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abrió sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Sabrina.

Yo agradezco en primer lugar a mis padres Arturo Ramos y Diyanira López, que han dado todo el esfuerzo, para que yo ahora este culminando esta etapa de mi vida, además darles las gracias por apoyarme en todos los momentos difíciles de mi vida, contando momentos felices y a la vez también momentos inevitables de tristeza, ellos siempre han estado junto a mí y gracias a ellos soy lo que ahora soy y, con el esfuerzo de ellos y mi esfuerzo ahora puedo ser un gran profesional, a mi hermano Daniel quién también estuvo pendiente de mí trabajo y se preocupó de que sea alguien mejor, gracias y seré un gran orgullo para todos los que confiaron en mí.

Agradecer a los docentes que, a lo largo de este tiempo, inculcaron su conocimiento y experiencia para fortalecer nuestra formación académica, en especial gracias a nuestro tutor Lenin Ramírez, quién en este proceso de aprendizaje, nos ayudó, escuchó y nos impulsó a salir adelante con nuestro proyecto.

A los compañeros ayudantes del laboratorio de Ingeniería Ambiental, por su colaboración y asesoría en las prácticas que realizamos, a mis compañeros y amigos que siempre estuvieron ahí cuando necesitaba apoyo y unas palabras de aliento.

A mi compañera de tesis y amiga en mi vida, por saber entenderme y trabajar conjuntamente para lograr esta meta, una pareja formidable para elaborar este proyecto, siempre dándonos ánimos y trabajando como uno mismo. Te agradezco mucho Sabri.

Finalmente, agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, en la cual me formé como profesional, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien tanto en la sociedad como en el hogar.

Allan.

DEDICATORIA

Este proyecto lo dedico a Dios, a mis Padres Chicaiza Luis y Ramírez Martha pilares fundamentales en mi vida, con mucho amor y cariño.

A Dios por haber estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome la fortaleza para superar todos los obstáculos y llegar a la meta, a mis padres por el apoyo incondicional y quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba, sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ello que soy quien soy ahora. A ellos este proyecto, que, sin ellos, no hubiese podido ser.

Les amo con mi vida

Sabrina.

Dedico este proyecto a mis padres Allan Ramos y Diyanira López, además a mi hermano Daniel Ramos, ya que, sin su apoyo y confianza en cada una de mis actividades, no hubiera logrado esta meta.

Lo dedico también a mis familiares que, aun encontrándose lejos, siempre supieron decirme las palabras correctas y precisas para alentarme a conseguir más de la vida, a los amigos que de igual manera me brindaron ánimos, risas y consejos para entender de una manera diferente las cosas.

Gracias por todo.

Allan.

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo General	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1 Contaminantes Emergentes	17
3.2 Antibióticos	19
3.3 Comportamiento ambiental de los antibióticos	20
3.4. Desarrollo caso de estudio:	22
3.4.1. Características físicas	23
UYUMBICHO	23
AMAGUAÑA	23
SANGOLQUI	23
3.4.2 Clima	24
UYUMBICHO	24
AMAGUAÑA	24
SANGOLQUI	24
3.4.3 Demografía	25
UYUMBICHO	25
AMAGUAÑA	25
SANGOLQUI	25
3.4.4 Hidrogeología	26
3.5 Elaboración de Curvas de Calibración	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Localización	29
4.2 Obtención de la muestra	29
4.3 Trabajo de campo	33
4.4 Trabajo de laboratorio	35
4.4.1 Preparación del Agar	36
4.4.2 Preparación de las muestras para siembra	37
4.5 Preparación de las Curvas de Calibración	39
4.5.1 Toma de la muestra “Blanco”	39

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1 Resultados	41
5.1.1 Detección de Antibióticos	41
5.1.2 Siembra y cultivo de microorganismos	43
5.1.2.1 Datos de la muestra “Blanco”	47
5.1.3 Curvas de Calibración	48
5.1.3.1 Cuantificación de los antibióticos	50
5.1.3.2 Elaboración de mapas ilustrativos	53
5.1.3.2.1 Condición del pH:	53
5.1.3.2.2 Condición de la conductividad:	54
5.1.3.2.3 Condición de la temperatura:	56
5.1.3.2.4 Condición de la presencia de Betalactámicos:	57
5.1.3.2.5 Condición de la presencia de Sulfamidas:	59
5.1.3.3 Relación y dependencia de la presencia de antibióticos a las diferentes condiciones	61
5.1.3.3.1 Relación Tiempo – Concentración Antibióticos betalactámicos	61
Antibióticos sulfamidas	62
Antibióticos sulfamidas	69
Análisis microbiológico unidades formadoras de colonias UFC.	75
5.1.3.3.2 Relación pH - Tiempo	82
5.1.3.3.3 Relación Temperatura - Tiempo	82
5.1.3.3.4 Dependencia de la concentración (UFC) y las demás variables en estudio	83
5.2 Discusión	89
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	94
6.1 Conclusiones	94
6.2 Recomendaciones	95
7. BIBLIOGRAFÍA	97
8. ANEXOS	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 : Clases de contaminantes emergentes	18
Tabla 2. Ubicación de los puntos de muestreo.....	30
Tabla 3: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias.....	44
Tabla 4: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias.....	44
Tabla 5: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias.....	45
Tabla 6: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias.....	46
Tabla 7: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias.....	47
Tabla 8 : Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos. Se muestran las concentraciones calculadas para cada tipo de antibiótico.....	51
Tabla 9: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos	51
Tabla 10: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos	51
Tabla 11: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos	52
Tabla 12: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos	52
Tabla 13: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1: Esquema de la secuencia de procesos LADME.	21
Ilustración 2; Unidad Hidrogeológica Quito – Machachi,	27
Ilustración 3 : Localización del proyecto desde la parroquia de Uyumbicho, Amaguaña y Sangolquí	29
Ilustración 4: Interpretación visual de resultados, dependiendo del cual se nota la presencia o ausencia de antibióticos	35
Ilustración 5 : 1era tabla de datos del mes de noviembre	41
Ilustración 6 : 2da tabla de datos del mes de noviembre	42
Ilustración 7: 1era tabla de datos del mes de diciembre,.....	42
Ilustración 8: 2da tabla de datos del mes de diciembre	42
Ilustración 9: 1era tabla de datos del mes de enero,.....	42
Ilustración 10: 2da tabla de datos del mes de enero,	43
Ilustración 11: Bandas: roja, verde y azul para betalactámicos con sus respectivas concentraciones en dg/ml.	48
Ilustración 12: Bandas: roja, verde y azul para sulfamidas con sus respectivas concentraciones en dg/ml.	48
Ilustración 13: Curva de calibración para betalactámicos con los datos analizados de las imágenes del blanco.....	49
Ilustración 14: Curva de calibración para sulfamidas con los datos analizados de las imágenes del blanco	50
Ilustración 15: .Condición del pH a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio	53
Ilustración 16: Variación del pH a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.	54

Ilustración 17: Condición de la conductividad a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	55
Ilustración 18: Variación de la conductividad a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	56
Ilustración 19. Condición de la temperatura a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	56
Ilustración 20. Variación de la temperatura (Isotermas) a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	57
Ilustración 21. Condición de la presencia de betalactámicos a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	58
Ilustración 22. Dispersión de la concentración de betalactámicos a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	59
Ilustración 23. Condición de la presencia de sulfamidas a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	60
Ilustración 24. Dispersión de la concentración de sulfamidas a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.....	61
Ilustración 25. Gráfica correspondiente al punto #1 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámico.....	62
Ilustración 26. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.....	62
Ilustración 27. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.....	63
Ilustración 28. Gráfica correspondiente al punto #5 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.....	64

Ilustración 29. Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	64
Ilustración 30. Gráfica correspondiente al punto #7 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	65
Ilustración 31. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	66
Ilustración 32. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	66
Ilustración 33. Gráfica correspondiente al punto #1 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	67
Ilustración 34. Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	68
Ilustración 35. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	68
Ilustración 36. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	69
Ilustración 37. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	70
Ilustración 38. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	70
Ilustración 39. Gráfica correspondiente al punto #4 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	71
Ilustración .40 Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	71

Ilustración 41. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	72
Ilustración 42. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	73
Ilustración.43 Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	73
Ilustración 44. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	74
Ilustración 45. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.	74
Ilustración 46. Gráfica correspondiente al punto #1 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	75
Ilustración 47. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos	76
Ilustración 48. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	76
Ilustración 49. Gráfica correspondiente al punto #4 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	77
Ilustración 50. Gráfica correspondiente al punto #5 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	77
Ilustración 51. Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	78
Ilustración 52. Gráfica correspondiente al punto #7 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	78

Ilustración 53. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	79
Ilustración 54. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	79
Ilustración 55. Gráfica correspondiente al punto #1 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	80
Ilustración 56. Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos	80
Ilustración 57. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.	81
Ilustración 58. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos	81
Ilustración 59. Gráfica correspondiente a la relación y análisis del pH y el tiempo.	82
Ilustración 60. Gráfica correspondiente a la relación y análisis de la temperatura y el tiempo.....	83
Ilustración 61. Resultados de la prueba de normalidad de los datos en R Studio. ...	84
Ilustración 62. Programación para prueba no paramétrica de los datos en R Studio	85
Ilustración 63. Resultados de la prueba no paramétrica de los datos en R Studio. ..	85
Ilustración 64. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre el tiempo y la concentración de microorganismos	86
Ilustración 65. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la localización y la concentración de microorganismos.....	86
Ilustración 66. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la presencia o no de betalactámicos y la concentración de microorganismos	87

Ilustración 67. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la presencia o no de sulfamidas y la concentración de microorganismos.....	87
--	----

RESUMEN

Detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas como contaminantes emergentes en los ríos San Pedro y Pita del cantón Rumiñahui.

Cada una de las actividades que realiza la sociedad implica que se genera alteraciones sobre nuestro entorno. Actividades tan usuales como la higiene personal o el cuidado de la salud pueden provocar efectos negativos en el ecosistema, dado que se agrega una serie de sustancias de diferente composición química, sustancias que son reconocidas como contaminantes emergentes. En este grupo de contaminantes se encuentran productos farmacéuticos, si bien, no son considerados como sustancias persistentes, su frecuente utilización y desecho los hace estar presentes en nuestro entorno, la principal fuente de ingreso al ecosistema son las descargas de agua o efluentes de las plantas de tratamiento de fábricas aledañas.

El estudio fue desarrollado en las parroquias de Uyumbicho, Amaguaña ubicadas a 1km de la orilla del río San Pedro y la parroquia de Sangolqui cerca al río Pita, se evaluó la probable existencia de residuos de antibióticos en los 13 puntos de muestreo distribuidos así: 9 en el río San Pedro y 4 en el río Pita, se tomaron 6 muestras las cuales fueron analizadas 2 veces, cada mes, por 3 meses, siendo estos el mes de noviembre y diciembre del año 2017 y enero del año 2018.

Los resultados obtenidos determinan a un total de 41 muestras positivas, del total de 78 muestras, representando el 52% de casos con presencia de residuos de antibióticos betalactámicos y sulfamidas, ubicados en los ríos San Pedro y Pita. Determinándose la curva de calibración para el cálculo de la concentración de los residuos de antibióticos.

Palabras clave: Ecuador, antibióticos, fármacos, contaminantes emergentes, ecosistema.

ABSTRACT

Beta-lactam antibiotics detection, tetracyclines and sulphonamides as emerging pollutants in San Pedro and Pita rivers of Rumiñahui canton.

Each one of the activities that the society does dairy produce alterations in our environment. Very usual activities such as personal hygiene and health care can cause negative effects in the environment, since it adds a series of substances of different chemical compositions, those substances are known like emerging pollutants. In this pollutants groups we can find pharmacists products, while it's true they're not considered as persistent substances, its frequent use and discard make them be present in our environment, the main source of income to the ecosystem are the water discharges or treatment plants effluents from surrounding factories.

The study was developed in Amaguaña and Uyumbicho parishes, located at 1km from the San Pedro river shore and in Sangolquí parish near to Pita river, it was evaluated the probable existence of antibiotics residues in 13 sampling points in the following way: 9 in San Pedro river and 4 in Pita river, there were taken 9 samples, those were analyzed twice by month for 3 months, November and December of 2017 and January of 2018.

The results obtained determine a total of 41 positive samples, out of a total of 78 samples, representing 52% of cases with the presence of residues of beta-lactam antibiotics and sulfonamides, located in the San Pedro and Pita rivers. Determining the calibration curve for the calculation of the concentration of antibiotic residues.

Keywords: Ecuador, antibiotic, pharmaceuticals, emerging pollutants, environmental.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento acelerado de la población ecuatoriana trae consigo el aumento de producción, tanto en las zonas industriales, como en actividades agrícolas, las cuales han ocasionado un lamentable deterioro en el medio ambiente, debido a que las aguas que cada actividad desecha son vertidas indirectamente a los ríos, que no poseen algún tipo de tratamiento previo, que ayude a mitigar el impacto que se está generando. Las descargas de grandes caudales, constituidos de un sin número de compuestos en las aguas superficiales, son las que alteran las características del agua y en muchas ocasiones dañando así la capacidad de autodepuración que tienen los ríos.

Desde el principio de la existencia del ser humano, su lucha por la supervivencia se estableció con otros seres vivos de muy diversos tamaños. Algunos tan pequeños que no se veían ni se tocaban, sin embargo, estos microorganismos, en la batalla por su propia supervivencia infligieron a la especie humana grandes pérdidas. Se las llamaron plagas (como las de Egipto), o pestes (como la Peste bubónica) o, más modernamente epidemias como la gripe, el cólera, etc. (Peña, 2006). Para estas epidemias existen sustancias químicas para poder combatir las cuales son los antibióticos, son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos (Patiño, 2013).

El anuncio del primer antibiótico sulfamídico en 1935 inició la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una enorme disminución de la morbilidad y de la mortalidad para muchas enfermedades infecciosas (Gimeno, 2001; Reig & Toldrá, 2008). Por consiguiente, los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos empleados de forma reiterativa, y en algunos casos usados

sin ningún control, como suplemento alimenticio o para tratar enfermedades en animales y favorecer su crecimiento, siendo administrados en numerosas ocasiones de forma insensata y en dosis inadecuadas (Talero, Medina, & Rozo, 2014). En consecuencia, el mal uso de estas sustancias puede producir alteraciones como: reacciones alérgicas, carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, anemia aplásica, súper-infecciones y retrasos en la identificación del germen causal (Talero et al., 2014). Esta problemática es uno de los factores que incide en la aparición de gérmenes antibiótico-resistentes, creando la necesidad cada vez mayor de nuevos fármacos (Doyle, 2006; Le Bizec, Pinel, & Antignac, 2009; Lozano, María. Arias, 2008; Márquez, 2008; Reig & Toldrá, 2008; Reig Riera, 2010). Por ello se hace necesaria la existencia de una regulación y vigilancia estricta en el manejo de residuos que pudieran contener estos genes que hacen a las bacterias más resistentes (Talero et al., 2014).

El derecho de todo ciudadano a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, libre de contaminación (CIJUL, 2013), es la base para realizar el proyecto de detección de antibióticos y derivados de los mismos, como contaminantes emergentes en la cuenca de los ríos Pita y San Pedro, para de esta manera generar ideas para el tratamiento posterior necesario para la descontaminación de los ríos.

La contaminación biológica y química de los sistemas de abastecimiento de agua superficial, se va incrementando frecuentemente, por el aumento de las poblaciones aledañas, siendo así, de gran importancia el estudio de una fuente de agua dulce superficial en el Ecuador, constituida por los ríos en que se basará el estudio como son los ríos Pita y San Pedro del Cantón Rumiñahui.

El río Pita atraviesa el barrio Selva Alegre y varias zonas agrícolas, recibiendo así las descargas de aguas provenientes del sector urbano, sector agrícola, y el sector industrial, el notable incremento de la contaminación en el río se debe por el crecimiento de la población del barrio Selva Alegre, esto indica el deterioro de sus aguas, la degradación genética de su flora y fauna, en el peor de los casos su extinción. Conociendo estos contaminantes se puede establecer los debidos tratamientos físicos, químicos y microbiológicos necesarios para mitigar los impactos que perjudican a la fuente natural el río Pita y sus alrededores.

Restos de fármacos, plaguicidas y otras sustancias contaminantes se están encontrando en aguas residuales, ríos y otras corrientes superficiales. Son los llamados contaminantes emergentes, compuestos que se vierten en el agua y que no están regulados. Debido a su impacto en el medio, se están estudiando nuevos procesos de degradación o de eliminación de estos contaminantes en aguas de distintas fuentes, ¿qué tipos de contaminantes se han detectado?, ¿cuál es su origen o foco de contaminación?, ¿cuáles son sus efectos?, ¿cómo eliminarlos o degradarlos? (A.I.N.I.A, 2016b).

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis, ha permitido alertar de la presencia de contaminantes emergentes en aguas. Los contaminantes emergentes son compuestos cuyo vertido puede suponer un problema sanitario y ambiental, que aún no está suficientemente investigado ni regulado. Son contaminantes no necesariamente persistentes, pero solubles en agua, por lo que son capaces de penetrar en todas las etapas del ciclo del agua (A.I.N.I.A, 2016a).

Respecto a los contaminantes emergentes, existe un desconocimiento sobre los riesgos que suponen para la salud humana y el medio ambiente asociado con su

presencia y su frecuencia de aparición. Por ello, existen líneas de investigación prioritaria, de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental: OMS, EPA, Comisión Europea (A.I.N.I.A, 2016b).

El fin de este trabajo experimental es identificar, analizar, detectar y cuantificar que tipos de antibióticos y sus derivados se encuentran presentes en los cuerpos de agua en estudio, de donde provienen o surgen en su mayor parte, para así, de esta manera, poder generar datos que nos faciliten el aprendizaje del comportamiento de estos antibióticos en los diferentes ambientes y determinar además niveles de afección tanto a la salud humana como al entorno en sí, analizaremos este proceso mediante muestreos in situ y procesos controlados en un laboratorio para la detección de dichos antibióticos y derivados, para un análisis posterior a los resultados y tener una idea clara del efecto de los antibióticos en el medio ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Detectar la presencia de antibióticos, tanto, betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, como contaminantes emergentes en los ríos san pedro y pita del cantón Rumiñahui.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de antibióticos de uso humano y animal en los ríos del cantón Rumiñahui.
- Cuantificar los antibióticos de uso humano y animal en los ríos del cantón Rumiñahui.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Contaminantes Emergentes

Se consideran a los contaminantes emergentes como una serie de productos, más o menos recientes en lo concerniente a su identificación y cada vez más abundantes debido a su uso continuo, cuyas formulaciones químicas o las interacciones que causan con otras sustancias o compuestos, provocan deterioros sobre el medio ambiente y la salud del ser humano, que no se habían tenido en cuenta hasta ahora (Fernández, 2017). Sobre dichos daños se sabe relativamente muy poco, incluyendo temas referentes a los impactos y el comportamiento que genera la presencia de los contaminantes en los distintos entornos, tanto ambientales como en el ser humano (Henríquez-Villa, 2012).

Una de las características importantes que posee este grupo de contaminantes para causar un efecto negativo en la naturaleza, es que no requieren ser persistentes, ya que, si bien existen sistemas que los pueden remover o transformar en compuestos más simples o subcompuesto, su continuo consumo y por ende el desecho que genera conlleva a la presencia permanente en el medio ambiente. (D. Barceló, 2003). La Tabla 1 indica las diferentes clases de contaminantes emergentes, que fueron analizados a nivel internacional, también encontramos los ejemplos de sustancias específicas para cada una de las clases definidas (Henríquez-Villa, 2012).

Dado que los contaminantes emergentes poseen una amplia distribución de compuestos, como se observa en la tabla 1, en este estudio nos enfocaremos en la presencia o ausencia de contaminantes emergentes determinados, en los cauces de los ríos San Pedro y Pita.

Sin embargo, hay muchos de estos compuestos que sobreviven a la biodegradación, y finalmente se descargan en aguas receptoras; los conjugados metabólicos pueden

incluso convertirse o regresar a sus estados iniciales, aumentando así su peligrosidad (Daughton et al., 2014).

En la parte teórica de esta tesis, se estudian y analizan específicamente los siguientes contaminantes emergentes (antibióticos):

- Betalactámicos
- Tetraciclinas
- Sulfamidas

De acuerdo a la quimioterapia de las enfermedades microbianas, se clasifican en antimicrobianos, sulfonamidas, antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, fenoles, macrólidos, nitrofuranos, bacitracina, quinolonas, fluoroquinolonas, rifamicinas y antimicóticos (Sumano & Ocampo, 2006).

Tabla 1 :Clases de contaminantes emergentes

Clase de contaminante	Ejemplo
Productos farmacéuticos	
Antibióticos de uso veterinario y médico	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazola
Medicamentos analgésicos y anti-inflamatorios	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenoprofeno
Medicamentos psiquiátricos	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina
Reguladores de lípidos	Bezafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico, atorvastatina
Betabloqueadores	Metoprolol, propanolol, timolol, atenolol
Medios de contraste de Rayos X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilelbestrol
Productos de cuidado personal	
Perfumes	Fragancias, policíclicos y macrocíclicos
Agentes de protección solar	Benzofenona, metilbenzilidene cambor
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluamida
Antisépticos	Triclosan, clorofeno
Detergentes tensioactivos y sus metabolitos	Alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), alquilfenol carboxilados
Retardadores de llama	Difenil éteres polibromados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, tris(2-cloroetil)fosfato
Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonados aromáticos
Aditivos de la gasolina	Dialquil éteres. Metil-t-bitil éter (MTBE)
Subproductos de desinfección	Yodo-THMs, bromoácidos, bromoacetnitrilos, bromoaldehidos, cianoformaldehido, bromato, NDMA

Representación de cada clase de contaminante con sus ejemplos para mejor entendimiento. Recuperado de (D. Barceló, 2003).

3.2 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias procedentes de distintos tipos de especies de microorganismos, como bacterias, hongos o actinomicetos, inclusive ciertas especies de insectos y plantas; los cuales logran suprimir el desarrollo de otros microorganismos y que incluso pueden llegar a eliminarlos (Volfredo, 2010). En el caso de los insectos himenópteros, entre los que se encuentran las hormigas, abejas y avispas, estos son muy susceptibles a infecciones causadas por hongos, por lo que han debido crear mecanismos de defensa efectivos contra patógenos. Como parte de esos mecanismos se ha demostrado la existencia de asociaciones simbióticas entre estos insectos y unas bacterias denominadas actinomicetes, los cuales producen antibióticos naturalmente (Parral, 2017). De igual manera existen también distintos grupos de sustancias antibióticas generadas por especies vegetales. El origen de estos fármacos, con poderosa acción antibacteriana, se encuentra en el hallazgo de la penicilina en 1929 por el científico británico Fleming. La penicilina es una sustancia producida por el hongo *Penicillium notatum*. Con la penicilina nacen los antibióticos, que revolucionan el control de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias (Sánchez, 2004).

Una función de los antibióticos betalactámicos, es que estos inhiben la síntesis de la pared bacteriana, constituida por peptidoglucanos. Así puede incluso constituirse en un regulador del crecimiento de microorganismos, tanto para mantener su crecimiento o eliminar el aumento de los microorganismos. Además, permiten combatir infecciones provocadas por bacterias, en la actualidad algunos de los antibióticos se utilizan para la medicina veterinaria, también en la crianza de los animales. De esta forma este mecanismo de utilización, juega uno de los papeles más importantes en la entrada de antibióticos en la naturaleza, ya que en su mayoría de

procesos tienen como efluente los cuerpos de agua dulce enfocándonos de manera primordial el cauce de los ríos (Henríquez-Villa, 2012). El aumento amplio y progresivo de actividades humanas, en algunos casos indiscriminadas debido al uso de antibióticos, junto con su posterior liberación al ambiente, la causa más aceptada es sobre la resistencia acelerada y extensa que presentan diferentes organismos bacterianos y patógenos. Concentraciones lo suficientemente altas, podrían provocar efectos agudos en las bacterias y dicha exposición ocasionaría la alteración de las estructuras de la comunidad microbiana en la naturaleza y, por lo tanto, afectar la cadena alimentaria.

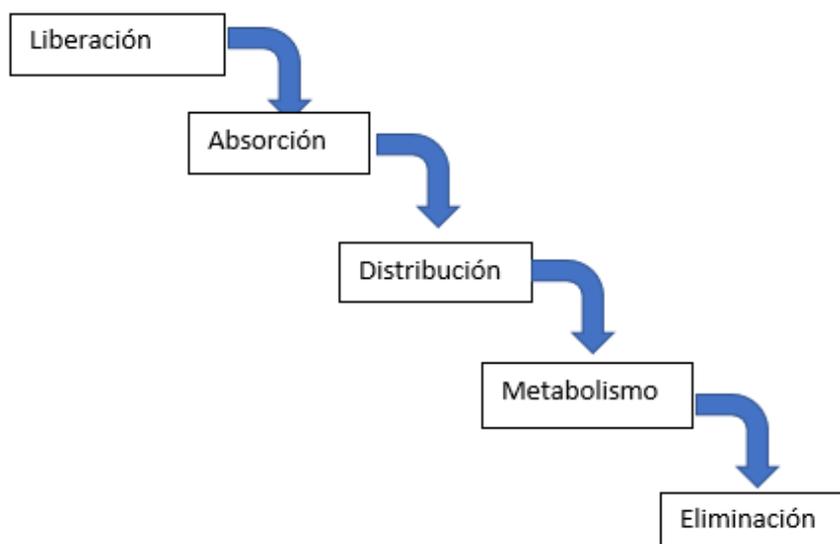
3.3 Comportamiento ambiental de los antibióticos

La presencia de los antibióticos en los ecosistemas es un tema que debe analizarse, si bien, estas sustancias tienen la finalidad de tratar en su mayoría los problemas de salud de toda la población, lo que ayuda a que mejore el estilo de vida de dicha población, de esta manera lo que se quiere dejar en claro, es la calidad de vida del ecosistema (Henríquez-Villa, 2012).

Para poder entender como los antibióticos llegan al medio ambiente, al ser emitidos por el ser humano, es primordial conocer los mecanismos que regulan el comportamiento dentro del organismo (Henríquez-Villa, 2012).

El mecanismo por el cual pasan los antibióticos desde su absorción hasta su eliminación se basa en la ilustración 1:

Ilustración 1: Esquema de la secuencia de procesos LADME.



Elaboración por los autores, 2018.

Al encontrarse los antibióticos en el medio ambiente, estos sufren diversas biotransformaciones conocidas como biodegradación, debido a una variedad de agentes que implican la alteración de los mismos. Los antibióticos están constituidos por moléculas orgánicas, lo que nos indica que sus mecanismos de degradación a los que se ven expuestos en el medio ambiente son iguales a los de cualquier compuesto orgánico, pero con la diferencia que todas las reacciones que se llevan a cabo se realizan aun cuando las concentraciones de estos compuestos estén muy diluidas (Henríquez-Villa, 2012). Considerando también la bioactividad de estos compuestos, se considera un ejemplo de principio activo a la amoxicilina, que es un derivado semisintético de la penicilina, y es usado como antibiótico. Actúa sobre un amplio espectro de microorganismos. Debido a su buena absorción gastrointestinal, la amoxicilina genera unos niveles mayores de antibiótico en sangre y unos menores efectos gastrointestinales. La amoxicilina tiene un espectro de actividad antibacteriana superior al de la penicilina, si bien no es estable frente a las β -lactamasas. Los antibióticos β -lactámicos como la amoxicilina son bactericidas (Martín, 2010).

El descubrimiento del cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina y otros antibióticos provocó que la industria desarrolle más investigación y programas para el descubrimiento de productos naturales activos (Águila Ramirez, 2012; Jackson, Reyes, & Cordiés, 1998).

Los antibióticos (moléculas puras o metabolitos) llegan al suelo por diferentes vías. Su persistencia en este medio favorece el desarrollo de especies bacterianas resistentes, lo que supone una pérdida de eficacia en los tratamientos farmacológicos de infecciones causadas por microorganismos no sensibles. Por la misma razón por la que el suelo actúa como “caldo de cultivo” de resistencias bacterianas, también se ha constituido como principal fuente potencial para la obtención de nuevos antibióticos, precisamente por la amplia diversidad de microorganismos que habitan en sus estratos (Muñoz, 2017).

En general se tiene que el tiempo estimado para la biodegradación de los antibióticos en el medio ambiente es de meses o años, todo depende de las condiciones en las que se encuentre: cantidad de oxígeno, la disponibilidad de luz, el suministro de agua. Cada vez aparecen más estudios que describen la detección de residuos de antibióticos en el agua, se estudian los efectos negativos que pueden aparecer a mediano y a largo plazo en los organismos y microorganismos que habitan en los distintos ecosistemas (Ferrer & Thurman, 2012).

3.4. Desarrollo caso de estudio:

Detección de antibióticos en aguas de los ríos san pedro y pita.

3.4.1. Características físicas

UYUMBICHO

La parroquia de Uyumbicho ubicada al norte del cantón Mejía a 23 Km del centro de la ciudad de Quito, y a 1 Km de la orilla izquierda del río San Pedro. Sus límites son al norte con el Distrito Metropolitano de Quito, al sur con la parroquia de Tambillo, al oeste con la parroquia de Cutuglagua, ambas son parroquias del Cantón Mejía, y al este limita con la parroquia de Amaguaña del cantón Rumiñahui (GAD Provincia de Pichincha, 2012) (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial rural de Uyumbicho 2014 - 2019, 2015).

AMAGUAÑA

La parroquia de Amaguaña pertenece al Distrito Metropolitano de Quito ubicada al norte del Cantón Mejía, y el río San Pedro atraviesa la parroquia. Sus límites son al norte con la parroquia de Conocoto, al sur con la parroquia de Uyumbicho del cantón Mejía, al este se encuentra el Cantón Rumiñahui, al oeste limita con las parroquias de Uyumbicho, Cutuglagua y Quito (Amaguaña, 2013).

SANGOLQUI

La parroquia de Sangolquí está ubicada en el valle de los chillos, es la capital del cantón Rumiñahui y forma parte de la hoya de Guayllabamba y se encuentra a 1 Km de la orilla derecha del Río Pita. Sus límites son al norte con la parroquia La Armenia, al sur con el cantón Mejía, al este con las parroquias de Alangasí y Pintag que pertenecen al Distrito Metropolitano de Quito, al oeste limita con Amaguaña y Conocoto, ambas parroquias del Distrito Metropolitano de Quito (Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Rumiñahui, 2014).

3.4.2 Clima

UYUMBICHO

La parroquia de Uyumbicho se encuentra ubicada entre los 2600 y los 4600 m.s.n.m., posee un clima templado húmedo, con una temperatura promedio de 12 °C a 27 °C, cuenta con una precipitación anual de 1000-2000 mm³ (GAD Parroquial de Uyumbicho, 2012). La Parroquia Uyumbicho está formada por la microcuenca del río San Pedro perteneciente a la subcuenca del río Guayllabamba la cual es alimentada por vertientes de los volcanes: Rucu Pichincha, Atacazo, Corazón, Ilinizas, Rumiñahui, Sincholagua, Pasochoa, Ilaló, Cotopaxi, con patrones de drenaje rectangular (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial rural de Uyumbicho 2014 - 2019, 2015).

AMAGUAÑA

La parroquia de Amaguaña se encuentra ubicada entre los 1740 y los 4120 m.s.n.m., posee un clima templado con una temperatura promedio de 17 °C y 18 °C, cuenta con una precipitación anual de 2069 mm³. La superficie aproximada de la parroquia es de 62,20 km² (Amaguaña, 2013).

SANGOLQUI

La parroquia de Sangolquí se encuentra ubicada entre los 2415 y los 2512 m.s.n.m., posee un clima templado, con una temperatura promedio de 16 °C y 23 °C, cuenta con una precipitación media mensual de 1804 mm³, siendo los meses de abril y octubre los de mayor precipitación. La superficie aproximada de la parroquia es de 55 km² (Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Rumiñahui, 2014).

3.4.3 Demografía

UYUMBICHO

La parroquia de Uyumbicho en el año 2001 tenía una población de 3679 habitantes según las cifras que refleja el VI Censo de la Población y Vivienda. Para el año 2010, la población ascendió a los 4607 habitantes según el VII Censo de Población y VI de Vivienda, realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Para estos dos censos se ha observado un incremento de 928 habitantes, es decir, un 25,22% de la población, tomando en cuenta que se tiene una tasa de crecimiento del 3,1%, para el año 2018 sería de 5881 habitantes en la parroquia de Uyumbicho (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial rural de Uyumbicho 2014 - 2019, 2015).

AMAGUAÑA

La parroquia de Amaguaña en el año 2001 tenía una población de 23584 habitantes según las cifras que refleja el VI Censo de la Población y Vivienda. Para el año 2010, la población ascendió a los 31106 habitantes, según el VII Censo de la Población y VI de Vivienda, realizado por el instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Para estos censos se ha observado un incremento de 7522 habitantes, es decir, un 31,89% de la población, para el año 2018 aproximadamente existiría un total de 9602 habitantes en la parroquia de Amaguaña (Amaguaña, 2013).

SANGOLQUI

La parroquia de Sangolquí en el año 2001 tenía una población de 61646 habitantes según las cifras que refleja el VI Censo de la Población y Vivienda. Para el año 2010, la población ascendió a los 81140 habitantes, según el VII Censo de la Población y VI de la Vivienda, realizado por el instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Para estos censos se ha observado un incremento de 19494 habitantes, es

decir, un 31,62% de la población, para el año 2018 aproximadamente existiría un total de 103586 habitantes en la parroquia de Sangolqui (Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Rumiñahui, 2014).

3.4.4 Hidrogeología

Tomando en cuenta las características litológicas de las diferentes formaciones geológicas, se ha definido a los sistemas de acuíferos, con rocas piroclásticas y sedimentos clásticos consolidados y no consolidados, mismos que se encuentran localizados en el valle de Machachi, Los Chillos, Quito y Cayambe (Burbano, Becerra, & Pasquel, 2015). Como se detalla en la Ilustración 2.

3.5 Elaboración de Curvas de Calibración

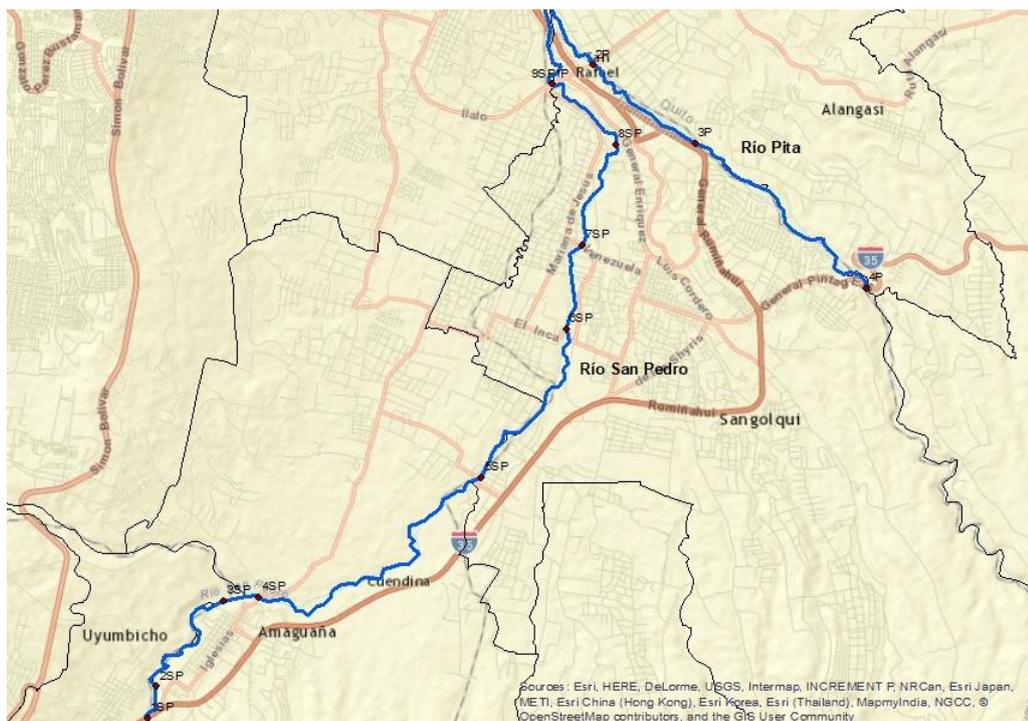
Este tipo de procedimiento conlleva a una serie de análisis sistemáticos, contando primero con un procedimiento analítico muy utilizado en análisis cuantitativo, llamado de calibración, que implica la construcción de una “curva de calibración”. Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal, que se mide en función de la concentración de un analito. La calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de esa curva y, en consecuencia, la capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo. En el procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito (o de algún otro con propiedades muy similares a éste) (Dosal & Villanueva, 2008). La etapa de calibración analítica se realiza mediante un modelo de línea recta, que consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor ajuste a una serie de “n” puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable “x” (variable independiente, generalmente concentración del analito de interés) y una variable “y” (variable dependiente, generalmente respuesta instrumental). La recta de calibrado se encuentra definida por una ordenada al origen (b) y una pendiente (m), mediante la ecuación $y = mx + b$ (Dosal & Villanueva, 2008).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

Para este proyecto e investigación se escogió la provincia de Pichincha, en parroquias como Uyumbicho en el cantón Mejía y Amaguaña y Sangolquí en el cantón Rumiñahui, por las cuales atraviesan los ríos en estudio, el río San Pedro y el río Pita como se ve en la ilustración 3.

Ilustración 3 :Localización del proyecto desde la parroquia de Uyumbicho, Amaguaña y Sangolquí



Elaboración por los autores (ArcGIS, 2016)

4.2 Obtención de la muestra

En este proceso utilizamos un equipo especializado para georreferenciar los puntos de muestreo, este equipo se denomina GPS, llamado también “sistema de posicionamiento global” (GPS por sus siglas en inglés), nos sirve para poder ubicar de una manera precisa, en un mapa, los puntos de referencia para cada uno de los ríos, se consideró esta herramienta por su capacidad de operatividad para cualquier

condición climática y de relieve, considerando que la presencia de árboles, edificios pueden interferir con la recepción de la señal.

Es así que se pudo obtener las coordenadas y mapas de ubicación para los puntos de muestreo del río Pita y San Pedro:

Tabla 2. Ubicación de los puntos de muestreo

N° de Punto	Río (Ubicación), coordenadas UTM y altura	Imagen del sitio
1	San Pedro (Uyumbicho) X 776320,179 Y 9957033,03 2627,302 msnm.	
2	San Pedro (Uyumbicho) X 776459,837 Y 9957513,84 2605,568 msnm.	
3	San Pedro (Uyumbicho) X 777471,527 Y 9958809,98 2549,607 msnm.	

4	<p>San Pedro (Amaguaña)</p> <p>X 777999,499 Y 9958872,19</p> <p>2553,502 msnm.</p>	
5	<p>San Pedro (Amaguaña)</p> <p>X 781362,462 Y 9960688,91</p> <p>2514,216 msnm.</p>	
6	<p>San Pedro (Sangolquí)</p> <p>X 782648,687 Y 9962947,40</p> <p>2483,715 msnm.</p>	
7	<p>San Pedro (Sangolquí)</p> <p>X 782899,269 Y 9964211,34</p> <p>2475,047 msnm.</p>	
8	<p>San Pedro (Sangolquí)</p> <p>X 783390,9 Y 9965736,50</p> <p>2461,872 msnm.</p>	

9	<p>San Pedro (Sangolquí)</p> <p>X 782436,11 Y 9966660,17</p> <p>2453,934 msnm.</p>	
1	<p>Pita (Sangolquí)</p> <p>X 782436,11 Y 9966660,17</p> <p>2453,934 msnm.</p>	
2	<p>Pita (Sangolquí)</p> <p>X 783049,537 Y 9966952,44</p> <p>2461,708 msnm.</p>	
3	<p>Pita (Sangolquí)</p> <p>X 784595,582 Y 9965756,80</p> <p>2488,425 msnm.</p>	
4	<p>Pita (Sangolquí)</p> <p>X 787187,462 Y 9963561,92</p> <p>2543,915 msnm.</p>	

Se elaboró esta tabla para detallar las coordenadas de los puntos de muestreo, para poder tener una ubicación exacta de los puntos en caso de estudios posteriores. Elaboración por los autores, 2018.

Para este proceso se seleccionaron puntos específicos a lo largo de los ríos en estudio, se tomaron un total de 13 muestras, 9 muestras en el río San Pedro y 4 muestras en el río Pita, tomando 1 litro de cada una de las muestras para su posterior uso y análisis, esto realizado con la ayuda de equipos como el pH-metro (FiveGo™, Metter Toledo) y un kit (AuroFlow™ BTS Combo Strip Test Kit” de marca BIOO Scientific) para la detección de antibióticos aplicado en la leche, cada uno de estos con sus respectivos manuales para su uso adecuado. Para así posteriormente llevar las muestras al laboratorio para análisis diferentes. El transporte de las muestras al laboratorio fue por medio de un cooler, totalmente sellado y cada una de las botellas con su respectivo etiquetado. Una vez ingresadas las muestras se las identificó y transporto al laboratorio del campus sur de la Universidad Politécnica Salesiana para su posterior análisis.

4.3 Trabajo de campo

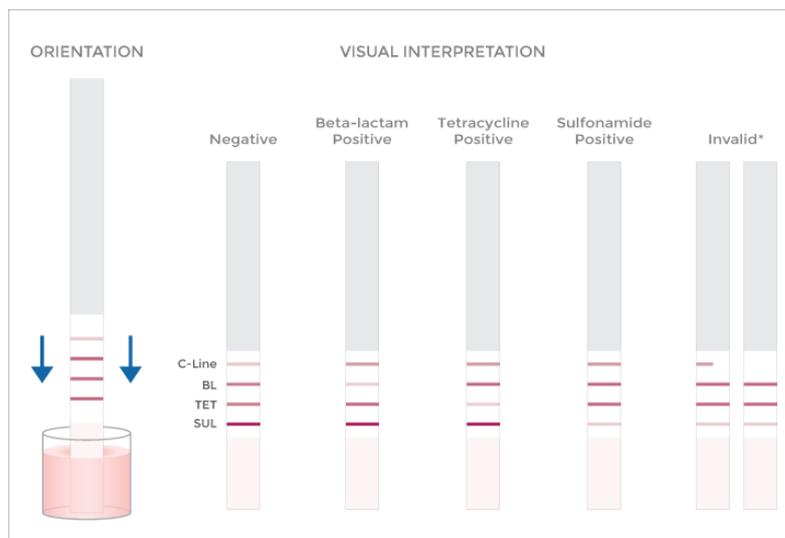
El trabajo de campo fue sistemático, siguiendo pasos tanto para la recolección de las muestras según la NTE INEN 2117:2013 sobre el agua, calidad del agua, muestreo manejo y conservación de muestras (NTE INEM 2117, 2013); como para el análisis de dichas muestras a través del kit “AuroFlow™ BTS Combo Strip Test Kit” de marca BIOO Scientific (Scientific, 2018), que es un kit de análisis e identificación de antibióticos que ocupamos para el estudio, proporcionado por un agente de una casa química que se encarga de la distribución de este tipo de equipos.

Para cada punto se realizó la medición de pH, conductividad y temperatura con el pH-metro y la identificación de antibióticos con las tiras de lectura y medición para la comparación de resultados con la guía del kit AuroFlow™ (Anexo A), para luego realizar las lecturas y curvas de calibración para cuantificar los antibióticos presentes en el agua de cada río.

El uso del kit, nos ayuda mediante las tiras de prueba de flujo lateral AuroFlow™, ya que están diseñadas para la detección de una amplia gama de antibióticos en leche de vaca cruda y mezclada, a su vez, también nos funciona óptimamente en agua, después de realizar pruebas adecuadas en la misma. Estas pruebas rápidas detectan 14 antibióticos beta-lactámicos, tetraciclinas principales y 11 sulfonamidas principales en la leche y agua a los límites máximos de residuos (LMR) de la UE y por debajo del límite máximo de CODEX. Los kits combinados permiten la detección simultánea de diferentes clases de residuos de antibióticos. El AuroFlow™ BTS Combo Kit puede detectar más antibióticos en el LMR o por debajo de él, en comparación con cualquier otro kit de la competencia. Estas pruebas de vanguardia también usan nuevas proteínas de unión que eliminan la necesidad de un bloque de calentamiento. Los informes de validación están disponibles y muestran la eficacia de las pruebas tanto a temperatura ambiente como en otras condiciones (Scientific, 2018). El protocolo o proceso rápido y simplificado del uso del kit se puede ver a continuación:

- Agregue 200 uL de agua fría al recipiente de reacción y mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
- Incubar la mezcla durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Agregue la varilla o tira medidora al recipiente de reacción.
- Incubar la mezcla durante 4 minutos a temperatura ambiente.
- Interpretar visualmente el resultado usando el diagrama, o usa el lector (Ilustración 4).

Ilustración 4: Interpretación visual de resultados, dependiendo del cual se nota la presencia o ausencia de antibióticos



Copyright 2018 Bioo Scientific Corporation.

Además de este proceso del kit de detección de antibióticos se definió la temperatura, pH y conductividad de cada una de las muestras mediante el pH-metro.

El instrumento portátil pH-metro FiveGo™ sirve para la medición de pH, conductividad (mS) y temperatura (°C), este equipo cumple con las normativas de seguridad reconocidas (Toledo, 2017).

El pH-metro se utilizó para medir la acidez o la alcalinidad de las muestras de agua, mide también la temperatura a la cual se encontraban, además de la conductividad que posee cada una de las muestras analizadas de los ríos Pita y San Pedro.

4.4 Trabajo de laboratorio

Las muestras fueron almacenadas y refrigeradas de forma adecuada durante una semana, ya que de este período se toman dos días para refrigerar, deben estar a una temperatura recomendada de 4°C para su posterior uso y, por precaución se guarda los demás días para tener como respaldo en caso de que algún método errara en su proceso. Para la utilización de las muestras estas se acondicionan al ambiente para

evitar problemas de crecimiento debido a la temperatura, como primer paso se preparan los materiales para la elaboración del medio de cultivo, para nuestro proyecto ocupamos Agar nutritivo, tanto el MacConkey como el PCA (ambos de marca DIFCO BBL Microbiology, en presentación de 500 gramos), que son medios universales para la determinación de microorganismos y bastante útiles para la identificación de UFC (Unidades formadoras de colonias), que después serían necesarias para la cuantificación de microorganismos. Para esto se preparó 500 ml de cada tipo de agar mediante los procedimientos adecuados de preparación de los mismos, se esterilizaron todos los materiales en el equipo autoclave.

4.4.1 Preparación del Agar

La mayoría de los medios de cultivo a ocupar proporcionados por la universidad se encuentran de manera comercial, normalmente bajo la forma de liofilizados (deshidratados) a los que es puntual rehidratar. Para esto la preparación del medio de cultivo consiste primero en pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante según la etiqueta proporcionada en el envase del producto. Esta mezcla después de preparada se esteriliza en el autoclave y se añaden al resto de los materiales a esterilizar, después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente a 50-60°C se puede trabajar tranquilamente con los materiales para la siguiente etapa del proceso. (Anexo D).

Antes de su esterilización los dos tipos de agar preparados se reparten en los recipientes adecuados (Frascos huecos). Una vez finalizada la esterilización, los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente, evitando que se solidifiquen, ya que estos medios deben verterse en las cajas Petri para la siembra de las muestras, para que arrojen los resultados correspondientes para cada una de las mismas.

4.4.2 Preparación de las muestras para siembra

Una vez esterilizados todos los materiales: cajas Petri, pipetas y tubos de ensayo; se toman las cajas Petri, estas se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico (lo recomendable es que esté en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen, aproximadamente en un radio de 20 a 30 cm dependiendo la intensidad y el color de la flama, con un máximo de radio de 50 cm).

Se sacan las muestras de la refrigeración y se las mantiene en condiciones ambientales para que se acondicionen a la temperatura normal, para que así no modifiquen o alteren las mediciones debido a la temperatura, una vez acondicionadas estas muestras se llevan al espacio de trabajo de laboratorio, donde tomamos 1 mL de cada una de las botellas para la siembra respectiva, una vez colocada la alícuota se vierte el agar en cada una de las cajas Petri, considerando que para este proceso realizamos diluciones que nos ayudaran a reducir la concentración de microorganismos, preparadas con 9 mL de solución salina preparadas en el laboratorio bajo condiciones adecuadas y 1 mL de la muestra en estudio elaborando así diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y además se encuentran separados en los distintos tipos de agar que ocupamos, tanto el Agar MacConkey y el Agar Métodos Estándar (APHA, 1970) o Agar PCA.

El Agar MacConkey se basa en la fórmula original a base de sales biliares, rojo neutro y lactosa para el aislamiento de bacilos entéricos Gram-negativos (Anexo E). El medio ha sufrido múltiples variaciones en el transcurso del tiempo, ya sea por la adición de otros ingredientes o por la modificación de las proporciones entre ellos. Actualmente corresponde a las recomendaciones de la USP y la Ph. Eur (CultiMed, 2010).

Por la presencia de las sales biliares y el cristal violeta, se inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar. Las bacterias lactosa-negativas dan colonias incoloras (CultiMed, 2010).

El Agar de Métodos Estándar (APHA, 1970) o Agar PCA, este medio se lo utiliza para el recuento en placa de leches y sus derivados u otros líquidos, para una mayor transparencia y eficacia en la determinación de resultados microbiológicos, desarrollado también para el método clásico con leche desnatada. Ello facilita las lecturas tempranas, al tiempo que el crecimiento de las colonias es mayor con lo que se facilita el recuento. Como reconocimiento a su buena aptitud, este medio se ha convertido en oficial para APHA (APHA, 1970).

La composición del medio está basada en la peptona de caseína, como aportación nutritiva, el extracto de levadura como sustrato vitamínico y la glucosa como fuente energética, además favorece el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, sin precisar de otros aditivos (CultiMed, 2010) (Anexo E).

Después de colocada la determinada cantidad de muestra seleccionamos el agar MacConkey y PCA para cada dilución y se la vierte en cada caja Petri, ocupando una técnica de siembra de cultivos denominada “caja pobre”, en la cual se coloca un mililitro de la cada una de las diluciones previamente preparadas en cada una de las cajas Petri etiquetadas de igual manera para evitar confusiones, este mililitro se lo esparce en toda la caja y después de esto, en un ambiente estéril, se vierte el agar con una temperatura máxima de 40°C. Para comenzar realizamos el proceso utilizando

26 cajas Petri; 13 cajas para las muestras en agar MacConkey y 13 cajas para PCA, para comprobar la funcionalidad del proceso con cada uno de los medios y a partir de eso usamos 28 cajas Petri, considerando tanto los dos tipos de agar y el valor de las diluciones que se realizaron para cada muestra, contando con un blanco para diferenciar las demás muestras. Se vierte el agar y al hacerlo es conveniente homogenizar el medio en la duración del proceso para impedir que el agar se sedimente en el fondo del recipiente y no se distribuya por igual en toda la placa, homogenizando de igual manera el mililitro de muestra.

Las cajas Petri una vez preparadas y finalizado el proceso de siembra, se las ingresa a una incubadora la cual se mantiene en una temperatura definida de 37 °C, se las conserva en un tiempo aproximado de 48 horas para que el crecimiento sea óptimo en ambos tipos de agar.

4.5 Preparación de las Curvas de Calibración

Para la preparación de las curvas de calibración necesarias para el cálculo de las concentraciones, comenzamos nuestro análisis considerando la muestra “blanco”.

4.5.1 Toma de la muestra “Blanco”

La muestra “blanco” nos servirá para comparar con los demás resultados y para esto se necesitó muestras puras tanto para β -lactámicos como para sulfamidas, ocupando una pastilla de Amoxipen-T (Amoxicilina) y una pastilla de Bactrim Forte (Sulfametoxazol y trimetoprima) respectivamente.

Para su análisis se tomó una muestra de un gramo de cada pastilla, esta se trituro con ayuda de un mortero y para este proceso se formaron 6 muestras de cada pastilla, un blanco y 5 diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , llevadas posteriormente a evaluarse

con el kit AuroFlow™ para determinar la presencia y la concentración de antibióticos que posee cada muestra.

Empleamos una técnica de análisis de imágenes raster que nos proporciona el programa informático R Studio (RStudio, 2016), mediante el cual se puede especificar por bandas que cantidad de antibiótico existe o qué valor es el que tiene dicha banda, las bandas usadas son: Roja, Verde y Azul, en inglés RGB (Red-Green-Blue).

Es necesario para dicha evaluación tomar imágenes precisas de las tiras de medición del kit, a una misma distancia, a una exposición de luz igual para todas las tiras y evitando las sombras en las mismas, ya que cualquier tipo de error o falla dentro de este paso, altera significativamente el valor de las bandas al pasar por el análisis informático.

Una vez tomadas las imágenes correspondientes al blanco, es decir, imágenes de las 12 tiras, estas se recortan para que mediante códigos en la programación del R Studio se analicen ingresando una serie de códigos, para que del procesamiento de la información se pueda conocer el valor de las bandas que necesitamos para comparar con las demás tiras de información, que son 78 tiras de todas las muestras.

A partir de la curva de calibración (conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se deberá cuantificar el compuesto por analizar) y a fin de asegurar que la recta encontrada con los puntos experimentales se ajuste correctamente al modelo matemático de la ecuación, se calculan los valores de la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2) (Dosal & Villanueva, 2008).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados

Una vez realizados todos los procedimientos prácticos de este proyecto se detectaron residuos positivos, con la presencia de residuos de antibióticos β -lactámicos y sulfamidas, dependiendo del día de muestreo variaba la concentración y presencia de los mismos, pese a que el estudio también incluía la detección de tetraciclinas, de estas no hubo presencia, ya que el kit que fue ocupado no arrojó ningún tipo de señal de residuo de antibiótico con estructura de tetraciclina.

5.1.1 Detección de Antibióticos

Primero se presentan los resultados obtenidos de la fase de campo, obtenidos por medio del kit AuroFlow™ y del pH-metro, resultados de las condiciones y presencia o no de antibióticos de cada uno de los muestreos realizados a lo largo de 3 meses, cada 15 días, dando un total de 6 muestreos de 13 muestras cada una, se evidencia en las siguientes tablas los resultados obtenidos, tomando en cuenta que los puntos en los que los resultados fueron negativos se los elimino del análisis:

7 de noviembre del 2017:

Ilustración 5 :1era tabla de datos del mes de noviembre, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos. Para reconocer abreviaturas: pH = valor del pH 1, 2, 3 dependiendo del número de muestra; PrompH = promedio de los valores de pH; cond = valor de conductividad 1, 2, 3 dependiendo del número de muestra; Promcond = promedio de los valores de conductividad; TpH = temperatura pH-metro; Tox = temperatura oxidímetro; PROT = promedio de las temperaturas; Betalactámicos = Presencia o no de este antibiótico; Sulfamidas = Presencia o no de este antibiótico; UFC = Unidades Formadoras de Colonias. Así designado para cada cuadro de estudio.

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prompH	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos	Sulfamidas
2	SAN PEDRO	8,41	8,44	8,44	8,43	76	77	77	76,67	17,4	20	18,70	1	1
3	SAN PEDRO	8,49	8,5	8,5	8,50	80	80	80	80,00	17,2	19,7	18,45	0	1
4	SAN PEDRO	8,45	8,47	8,48	8,47	78	79	79	78,67	18,1	22	20,05	0	1
6	SAN PEDRO	7,99	8,01	8,01	8,00	53	53	53	53,00	23,6	24,4	24,00	1	1
7	SAN PEDRO	8,27	8,42	8,43	8,37	69	77	77	74,33	23	16,77	19,89	1	0
8	SAN PEDRO	8,35	8,37	8,37	8,36	73	73	73	73,00	22,1	25	23,55	0	1
9	SAN PEDRO	8,18	8,35	8,33	8,29	64	73	72	69,67	24,5	20,5	22,50	0	1
3	PITA	8,36	8,58	8,58	8,51	74	86	86	82,00	20,9	26,1	23,50	1	1

Elaboración por los autores, 2018.

22 de noviembre del 2017:

Ilustración 6 :2da tabla de datos del mes de noviembre, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos, no se evidencio la presencia de sulfamidas en esta fecha.

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prompH	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos
3	SAN PEDRO	8,17	8,35	8,38	8,30	69	79	81	76,33	18,1	17	17,55	1
8	SAN PEDRO	7,97	8,21	8,22	8,13	58	71	72	67,00	16,6	16,9	16,75	1
2	PITA	7,41	7,45	7,47	7,44	27	29	30	28,67	19,9	19,7	19,80	1
3	PITA	7,88	8,16	8,25	8,10	53	69	74	65,33	18,2	16,3	17,25	1
4	PITA	8,02	8,33	8,39	8,25	61	78	81	73,33	17,5	16,2	16,85	1

Elaboración por los autores, 2018.

4 de diciembre del 2017:

Ilustración 7:1era tabla de datos del mes de diciembre, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prom	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos	Sulfamidas
1	SAN PEDRO	7,73	7,99	8	7,91	55	69	70	64,67	17	14,9	15,95	1	0
2	SAN PEDRO	7,63	7,92	7,99	7,85	49	66	70	61,67	17,6	17,6	17,60	1	0
6	SAN PEDRO	7,52	7,58	7,59	7,56	43	47	47	45,67	21,7	20,5	21,10	0	1
2	PITA	7,12	7,14	7,16	7,14	20	21	23	21,33	24,2	23,7	23,95	1	1
4	PITA	7,9	7,72	7,88	7,83	65	54	63	60,67	19,2	18,2	18,70	1	1

Elaboración por los autores, 2018.

18 de diciembre del 2017:

Ilustración 8: 2da tabla de datos del mes de diciembre, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos, no se evidencio la presencia de sulfamidas en esta fecha.

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prom	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos
1	SAN PEDRO	7,54	7,97	8	7,84	44	68	70	60,67	16,7	16,9	16,80	1
5	SAN PEDRO	7,86	8,02	8	7,96	62	71	70	67,67	18,5	17,4	17,95	1
6	SAN PEDRO	7,54	7,8	7,8	7,71	44	59	60	54,33	21,6	21	21,30	1
7	SAN PEDRO	7,34	7,9	7,95	7,73	32	65	67	54,67	20,6	19,2	19,90	1
8	SAN PEDRO	7,32	7,88	7,93	7,71	32	64	67	54,33	21	19,7	20,35	1
2	PITA	7,08	7,22	7,25	7,18	18	26	28	24,00	24,9	24,1	24,50	1
4	PITA	7,3	7,69	7,84	7,61	30	53	61	48,00	21,6	20,3	20,95	1

Elaboración por los autores, 2018

02 de enero del 2018:

Ilustración 9: 1era tabla de datos del mes de enero, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos, no se evidencio la presencia de sulfamidas en esta fecha.

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prom	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos
4	SAN PEDRO	7,32	7,91	7,93	7,72	32	65	66	54,33	16,8	15,9	16,35	1
6	SAN PEDRO	7,45	7,32	7,48	7,42	39	31	41	37,00	21,1	21,1	21,10	1
9	SAN PEDRO	7,49	7,44	7,52	7,48	41	38	43	40,67	18,5	17,1	17,80	1
1	PITA	7,45	7,5	7,47	7,47	39	41	40	40,00	16,9	17	16,95	1
2	PITA	7,24	7,31	7,42	7,32	27	31	37	31,67	17,6	16,7	17,15	1
3	PITA	7,49	7,26	7,32	7,36	41	28	31	33,33	16,8	16,2	16,50	1
4	PITA	7,42	7,39	7,26	7,36	37	35	28	33,33	17,2	16,8	17,00	1

Elaboración por los autores, 2018.

17 de enero del 2018:

Ilustración 10: 2da tabla de datos del mes de enero, se presenta únicamente las muestras que dieron lecturas positivas en presencia de antibióticos

Puntos	Río	pH1	pH2	pH3	prom	cond1	cond2	cond3	promcond	TpH	Tox	PROT	Betalactámicos	Sulfamidas
2	SAN PEDRO	7,96	8	8,01	7,99	68	70	71	69,67	16,6	16,3	16,45	1	0
3	SAN PEDRO	7,8	8,08	8,08	7,99	59	75	74	69,33	21,4	17,2	19,30	1	0
5	SAN PEDRO	7,9	7,96	7,97	7,94	65	68	68	67,00	17,9	16,5	17,20	1	0
6	SAN PEDRO	7,55	7,56	7,56	7,56	45	45	45	45,00	19,5	18,7	19,10	1	1
7	SAN PEDRO	7,93	7,92	7,92	7,92	65	65	65	65,00	15,4	15,6	15,50	1	0
9	SAN PEDRO	7,87	7,87	7,87	7,87	62	62	62	62,00	15	15	15,00	1	1
2	PITA	7,12	7,47	7,61	7,40	20	40	47	35,67	15,7	15,4	15,55	1	0
3	PITA	7,64	7,6	7,83	7,69	49	47	60	52,00	14,8	14	14,40	1	1
4	PITA	7,14	7,3	7,57	7,34	21	30	45	32,00	14,5	13,8	14,15	1	0

Elaboración por los autores, 2018.

5.1.2 Siembra y cultivo de microorganismos

Al realizar el análisis microbiano de las muestras de agua de los ríos San Pedro y Pita, las cuales fueron receptadas 2 veces cada mes, por 3 meses se evidenció lo siguiente:

Para el primer mes, en la fecha de 7 de noviembre del 2017, el crecimiento que se obtuvo de las 13 muestras de los ríos, fue descartado, debido a que su crecimiento fue considerado como incontable, ya que en el momento de la siembra se lo realizó con las muestras puras, no se hizo las diluciones correspondientes y además se trabajó con un método de siembra inadecuado (Método por Estriado).

En la fecha 22 de noviembre del 2017, se cambió el método de siembra, para el cual se utilizó el método conocido como “Caja Pobre”, utilizando el asa de Drigalsky, este método ayudo a distribuir de mejor manera el crecimiento de los microorganismos como se puede observar en los resultados posteriores. Para esta siembra se consideró únicamente los casos que dieron positivos en residuos de antibióticos. Los cuales fueron; para el río San Pedro las muestras número 3 y 8, para el río Pita las muestras a considerar fueron la 2, 3 y 4. Se realizó además 2 diluciones 10^{-1} y 10^{-2} para cada una de las muestras para los dos medios, el agar MacConkey y agar PCA. Los resultados gráficos de este proceso se presentan en el Anexo B1.

Tabla 3: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias

22 de noviembre 2017		UFC		
Puntos	Río	10 ⁻¹	10 ⁻²	TOTAL (UFC/ml)
1	SAN PEDRO	0	0	0
2	SAN PEDRO	0	0	0
3	SAN PEDRO	48	54	29400
4	SAN PEDRO	0	0	0
5	SAN PEDRO	0	0	0
6	SAN PEDRO	0	0	0
7	SAN PEDRO	0	0	0
8	SAN PEDRO	112	77	44100
9	SAN PEDRO	0	0	0
1	PITA	0	0	0
2	PITA	159	106	60950
3	PITA	129	64	38450
4	PITA	116	37	24300

Se detalla los puntos de muestreo y sus correspondientes valores de concentración con su factor de dilución de los antibióticos si la muestra fuera positiva.

Para el cálculo del total de los microorganismos se consideró el factor de conversión, para la dilución 10⁻¹ un valor de 10 y para la segunda dilución 10⁻² un valor de 100.

Para el análisis del crecimiento de microorganismos en el segundo mes, para la primera fecha que fue el 04 de diciembre del 2017, se lo realizó con el mismo método de siembra (Caja Pobre) y el mismo número de diluciones, los resultados gráficos de este proceso se presentan en el Anexo B2.

Tabla 4: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias

4 de diciembre 2017		UFC		
Puntos	Río	10 ⁻¹	10 ⁻²	TOTAL (UFC/ml)
1	SAN PEDRO	0	0	0
2	SAN PEDRO	34	0	1700
3	SAN PEDRO	8	0	400
4	SAN PEDRO	10	0	500
5	SAN PEDRO	5	0	250
6	SAN PEDRO	10	0	500
7	SAN PEDRO	7	0	350

8	SAN PEDRO	2	0	100
9	SAN PEDRO	6	0	300
1	PITA	0	0	0
2	PITA	65	0	3250
3	PITA	4	0	200
4	PITA	6	0	300

Se detalla los puntos de muestreo y sus correspondientes valores de concentración con su factor de dilución de los antibióticos si la muestra fuera positiva.

Para el cálculo del total de los microorganismos se consideró el factor de conversión para la dilución 10^{-1} un valor de 10 y para la segunda dilución 10^{-2} un valor de 100.

Para la segunda fecha del mes de diciembre, que fue el 18 de diciembre del 2017, se utilizó el mismo método de siembra (Caja Pobre) y el mismo número de diluciones.

Los resultados gráficos de este proceso se presentan en el Anexo B2.

Tabla 5: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias

18 de diciembre 2017		UFC		
Puntos	Río	10^{-1}	10^{-2}	TOTAL (UFC/ml)
1	SAN PEDRO	57	23	14350
2	SAN PEDRO	0	33	16500
3	SAN PEDRO	0	14	7000
4	SAN PEDRO	49	29	16950
5	SAN PEDRO	59	19	12450
6	SAN PEDRO	45	49	26750
7	SAN PEDRO	112	24	17600
8	SAN PEDRO	90	35	22000
9	SAN PEDRO	112	64	37600
1	PITA	114	18	14700
2	PITA	0	29	14500
3	PITA	60	26	16000
4	PITA	0	24	12000

Se detalla los puntos de muestreo y sus correspondientes valores de concentración con su factor de dilución de los antibióticos si la muestra fuera positiva.

Para el cálculo del total de los microorganismos se consideró el factor de conversión para la dilución 10^{-1} un valor de 10 y para la segunda dilución 10^{-2} un valor de 100.

Para el análisis del crecimiento de microorganismos en el tercer y último mes, para la primera fecha que fue el 2 de enero del 2018, utilizando para la siembra el mismo método (Caja Pobre) y el mismo número de diluciones. Los resultados gráficos de este proceso se presentan en el Anexo B3.

Tabla 6: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias

2 de enero 2018		UFC		
Puntos	Río	10 ⁻¹	10 ⁻²	TOTAL (UFC/ml)
1	SAN PEDRO	0	14	14000
2	SAN PEDRO	43	25	29300
3	SAN PEDRO	20	23	25000
4	SAN PEDRO	25	22	24500
5	SAN PEDRO	10	24	25000
6	SAN PEDRO	19	33	34900
7	SAN PEDRO	10	71	72000
8	SAN PEDRO	17	24	25700
9	SAN PEDRO	11	23	24100
1	PITA	0	27	27000
2	PITA	0	33	33000
3	PITA	0	12	12000
4	PITA	4	2	2400

Se detalla los puntos de muestreo y sus correspondientes valores de concentración con su factor de dilución de los antibióticos si la muestra fuera positiva.

Para el cálculo del total de los microorganismos se consideró el factor de conversión para la dilución 10⁻¹ un valor de 10 y para la segunda dilución 10⁻² un valor de 100.

Para el análisis del crecimiento de microorganismos en el tercer y último mes, para la segunda fecha que fue el 17 de enero del 2018, utilizando para la siembra el mismo método (Caja Pobre) y el mismo número de diluciones. Los resultados gráficos de este proceso se presentan en el Anexo B3.

Tabla 7: Crecimiento y conteo de la unidad formadora de colonias

17 de enero 2018		UFC		
Puntos	Río	10 ⁻¹	10 ⁻²	TOTAL (UFC/ml)
1	SAN PEDRO	0	2	1000
2	SAN PEDRO	0	6	3000
3	SAN PEDRO	0	10	5000
4	SAN PEDRO	24	15	8700
5	SAN PEDRO	28	9	5900
6	SAN PEDRO	46	32	18300
7	SAN PEDRO	79	20	13950
8	SAN PEDRO	170	20	18500
9	SAN PEDRO	70	12	9500
1	PITA	33	26	14650
2	PITA	150	42	28500
3	PITA	89	0	4450
4	PITA	40	4	4000

Se detalla los puntos de muestreo y sus correspondientes valores de concentración con su factor de dilución de los antibióticos si la muestra fuera positiva.

Para el cálculo del total de los microorganismos se consideró el factor de conversión para la dilución 10⁻¹ un valor de 10 y para la segunda dilución 10⁻² un valor de 100.

5.1.2.1 Datos de la muestra “Blanco”

Es esencial determinar los datos de la muestra “blanco”, ya que a partir de estos datos se definirán las curvas de calibración y las concentraciones para cada uno de los valores de banda, de cada uno de los puntos de muestreo. Para así poder presentar resultados de la muestra “blanco”, por medio de la programación necesaria en R Studio. Ejecutamos dicha programación y, en la parte de “console” detallamos la opción “Summary” y colocamos el nombre de la banda que deseamos los detalles (Anexo F1).

En el valor de “R0” se lo reemplaza por los demás valores de “R” (Red) y posteriormente con los valores de “G” y “B” (Green/Blue) y generamos la siguiente tabla, ocupando únicamente el valor “Median” que es la media de los valores registrados:

Para Betalactámicos:

Ilustración 11: Bandas: roja, verde y azul para betalactámicos con sus respectivas concentraciones en dg/ml.

Rojo		Verde		Azul	
Media	Concentración	Media	Concentración	Media	Concentración
94	10	160	10	191	10
123	1	147	1	181	1
129	0,1	182	0,1	202	0,1
139	0,01	123	0,01	164	0,01
166	0,001	151	0,001	181	0,001
178	0,0001	164	0,0001	158	0,0001

Elaboración por los autores, 2018.

Para Sulfamidas:

Ilustración 12: Bandas: roja, verde y azul para sulfamidas con sus respectivas concentraciones en dg/ml.

Rojo		Verde		Azul	
Media	Concentración	Media	Concentración	Media	Concentración
124	10	107	10	169	10
136	1	132	1	174	1
117	0,1	141	0,1	160	0,1
148	0,01	151	0,01	172	0,01
170	0,001	157	0,001	165	0,001
103	0,0001	170	0,0001	118	0,0001

Elaboración por los autores, 2018.

Dado esto se observa que, para calcular la concentración de microorganismos en relación a los betalactámicos, ocuparemos la Banda Roja ya que esta presenta un orden adecuado para realizar dicho proceso, mientras que, para analizar la concentración de microorganismos en relación a las sulfamidas, se analizará la Banda Verde, por los mismos motivos que en el caso de betalactámicos.

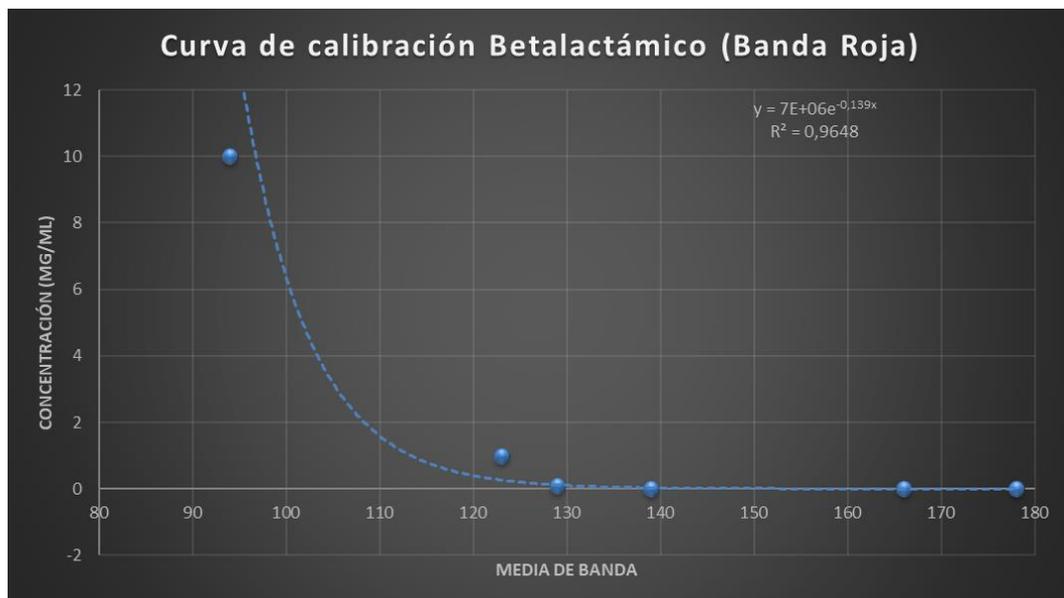
5.1.3 Curvas de Calibración

Para la elaboración de las curvas de calibración se tomaron los datos anteriormente calculados de los blancos para cada antibiótico, las lecturas de las tiras de medición del kit AuroFlow™ y, se procedió a elaborar las curvas bajo los estándares Mc. Farland del modo que se describe: en los primeros dos tubos se colocaron 9 ml de agua destilada y 1 ml de la muestra pura en cada uno, tanto de betalactámico como de sulfamida respectivamente, considerados como “blancos”. Los siguientes tubos

contienen de igual manera 9 ml de agua destilada y 1 ml de cada uno de los “blancos” homogenizados, considerados como la dilución 10^{-1} , así se procede con los siguientes tubos preparando 9 ml de agua destilada para cada uno y tomando 1 ml de muestra de su predecesor en concentración, hasta tener tanto el “blanco” como las diluciones hasta la dilución 10^{-5} .

En el caso de los betalactámicos se tomó para el análisis la banda Roja ya que esta presenta un orden proporcionado entre la media de valores y la concentración de microorganismos, con esos datos se ingresó en Excel para poder realizar la gráfica que predice la ecuación para posteriormente calcular la concentración, así se obtuvo la siguiente curva:

Ilustración 13: Curva de calibración para betalactámicos con los datos analizados de las imágenes del blanco.



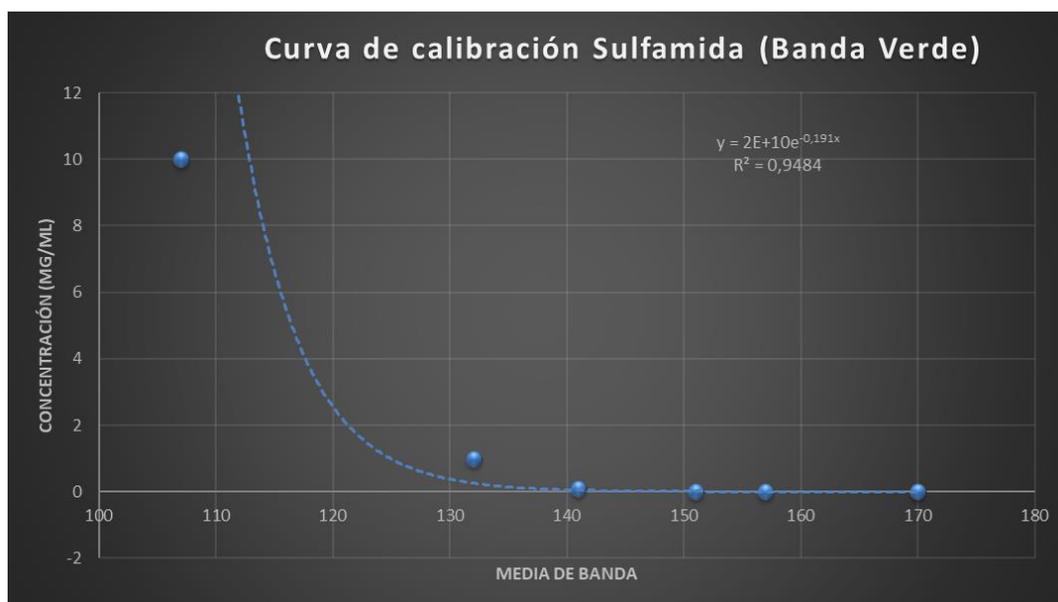
Elaborado por los autores, 2018.

Con su respectiva ecuación: $y = 7E + 06e^{-0,139x}$, y su $R^2 = 0,9648$

Considerando que valores de “ R^2 ” mayores a 0,9 o lo más cercano a 1, son valores acogidos como válidos.

En el caso de las sulfamidas se tomó para el análisis la banda Verde ya que esta presenta un orden proporcionado entre la media de valores y la concentración de microorganismos, con esos datos se ingresó en Excel para poder realizar la gráfica que predice la ecuación para posteriormente calcular la concentración, así se obtuvo la siguiente curva:

Ilustración 14: Curva de calibración para sulfamidas con los datos analizados de las imágenes del blanco



Elaborado por los autores, 2018.

Con su respectiva ecuación: $y = 2E + 10e^{-0,191x}$, y su $R^2 = 0,9484$.

Una vez realizadas las curvas se procede a calcular las concentraciones de antibióticos para cada muestra.

5.1.3.1 Cuantificación de los antibióticos

Una vez calculadas las ecuaciones correspondientes de cada una de las curvas de calibración, se procede a calcular la concentración de cada una de las muestras positivas tanto de betalactámicos como de sulfamidas. Para esto, se sigue el mismo procedimiento que se hizo en el blanco, tomando imágenes de las tiras de las muestras (Anexo C) y de ahí ingresando esos datos al programa R Studio para su

análisis de bandas, para así poder identificar la cantidad de antibióticos presentes en cada muestra, obteniendo los siguientes resultados, ya una vez calculados con las ecuaciones correspondientes, eliminando de igual manera los resultados negativos:

Tabla 8 : Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos.

06/11/2017					Concentración	
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta	Sulfa
2	174	175	184	B,S	2,19E-04	6,09E-05
3	173	174	185	S	-	7,37E-05
4	175	176	185	S	-	5,03E-05
6	170	172	182	B,S	3,83E-04	-
7	172	174	183	B	2,90E-04	-
8	165	170	170	S	-	1,58E-04
9	157	164	176	S	-	1,66E-04
12	145	149	156	B,S	1,24E-02	8,74E-03

Se muestran las concentraciones calculadas para cada tipo de antibiótico.

Tabla 9:Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos

20/11/2017					Concentración
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta
3	176	176	186	B	1,66E-04
8	159	162	176	B	1,77E-03
11	160	162	170	B	1,54E-03
12	158	158	169	B	2,03E-03
13	159	160	170	B	1,77E-03

En las muestras no existe la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas.

Tabla 10: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos

04/12/2017					Concentración	
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta	Sulfa
1	170	171	183	B	3,83E-04	-
2	172	170	182	B	2,90E-04	-
6	172	168	180	S	-	2,32E-04
11	173	171	184	B,S	2,52E-04	1,31E-04
13	172	171	183	B,S	2,90E-04	1,31E-04

En las muestras sin presencia de antibióticos se las desprecia después de los análisis siguientes. Elaboración por los autores, 2018.

Tabla 11: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos

18/12/2017					Concentración
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta
1	154	159	173	B	3,54E-03
5	166	167	181	B	6,67E-04
6	167	168	181	B	5,81E-04
7	162	162	179	B	1,16E-03
8	170	170	182	B	3,83E-04
11	169	170	185	B	4,40E-04
13	168	170	184	B	5,05E-04

En las muestras no existe la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas.

Tabla 12: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos

10/01/2018					Concentración
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta
6	176	177	191	B	1,66E-04
9	170	176	188	B	3,83E-04
10	163	168	180	B	1,01E-03
11	161	167	179	B	1,34E-03
12	154	162	176	B	3,54E-03
13	147	156	171	B	9,36E-03

En las muestras no existe la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas.

Tabla 13: Concentración de cada muestreo de las muestras positivas de antibióticos

17/01/2018					Concentración	
N° de muestras	R	G	B	Presencia	Beta	Sulfa
2	171	171	182	B	3,33E-04	-
3	172	172	183	B	2,90E-04	-
5	169	171	183	B	4,40E-04	-
6	167	170	182	B,S	5,81E-04	1,58E-04
7	160	165	178	B	1,54E-03	-
9	153	160	174	B,S	4,06E-03	1,07E-03
11	170	175	186	B	3,83E-04	-
12	175	177	188	B,S	1,91E-04	4,16E-05
13	175	177	188	B	1,91E-04	-

En las muestras sin presencia de antibióticos se las desprecia después de los análisis siguientes. Elaboración por los autores, 2018.

Tomar en cuenta que son 13 muestras en total a lo largo de los ríos en estudio, estos resultados servirán de gran ayuda para su análisis posterior en mapas ilustrativos de

la situación de los antibióticos y la relación de estas concentraciones con otras variables consideradas dentro del estudio.

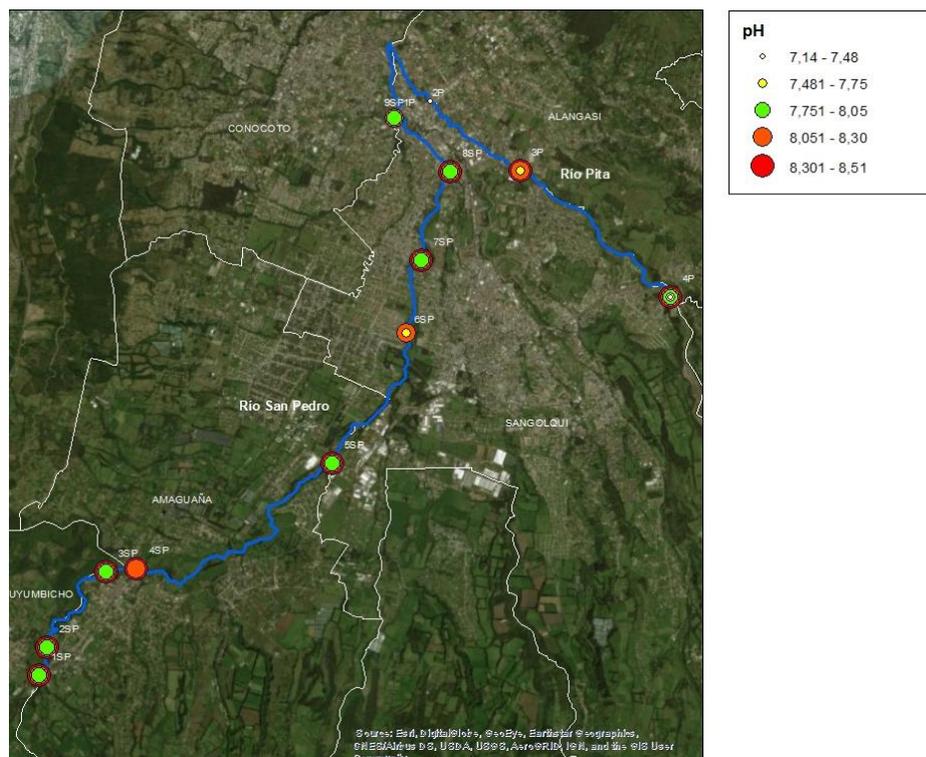
5.1.3.2 Elaboración de mapas ilustrativos

En esta sección se han desarrollado mapas que expresan varias condiciones en las que se encuentran los antibióticos en los ríos San Pedro y Pita, condiciones como temperatura, pH, conductividad, presencia o no de antibióticos y demás situaciones en las que se puede detallar un proceso de dispersión de los contaminantes a lo largo del trayecto de toma de muestras.

5.1.3.2.1 Condición del pH:

En esta condición se observó que la variación de pH fue en un rango de 7,14 a 8,51 manteniéndose en un pH básico.

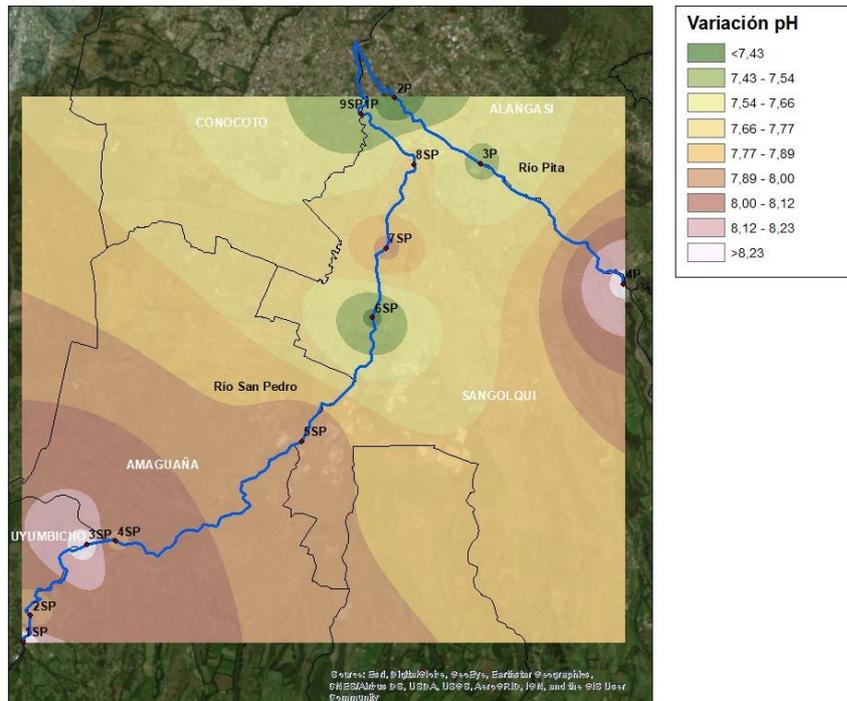
Ilustración 15: Condición del pH a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

Siguiendo la descripción de la condición de pH, se observa que en los puntos 3 del río de San Pedro y el punto 4 del río Pita tienen valores de pH mayores a 8,23, mientras que los registros más bajos de pH se registraron en los puntos 6, 9 del río San Pedro y el punto 1, 2 y 3 del río Pita, con valores menores a 7,54.

Ilustración 16: Variación del pH a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.

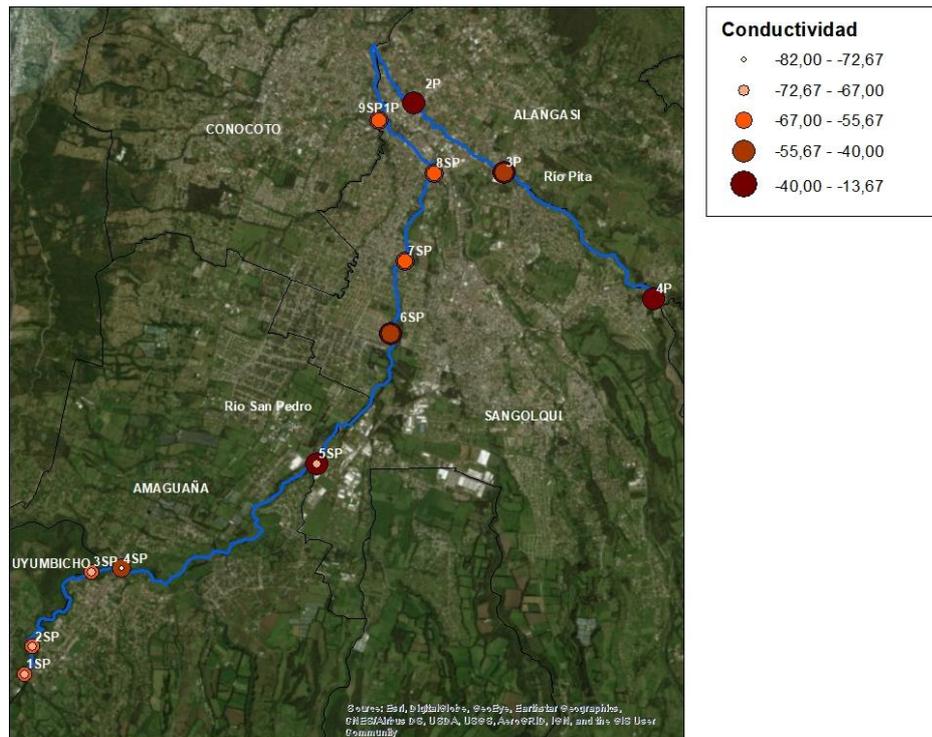


Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

5.1.3.2.2 Condición de la conductividad:

En esta condición se observó que la variación de conductividad fue en un rango de 82,00 mS a 13,67 mS.

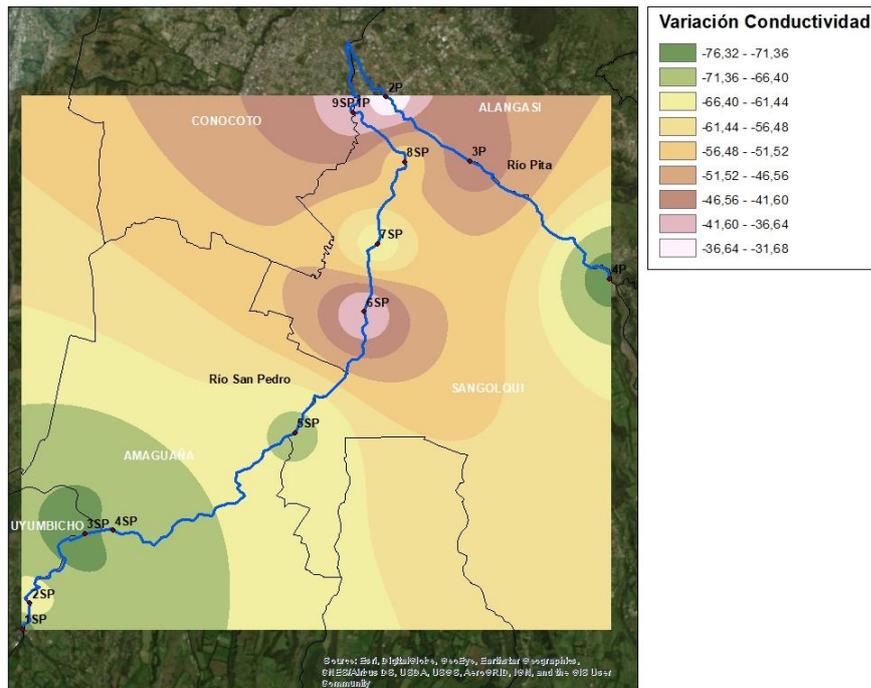
Ilustración 17: Condición de la conductividad a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

Siguiendo la descripción de la condición de conductividad, se observa que en los puntos 6 y 9 del río de San Pedro y los puntos 2 y 3 del río Pita tienen valores de conductividad altos que van entre 41,60 mS a 31,68mS, mientras que los registros más bajos de conductividad se registraron en los puntos 3, 4 y 5 del río San Pedro y el punto 4 del río Pita, con valores entre 76,32 mS a 66,40 mS.

Ilustración 18: Variación de la conductividad a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio

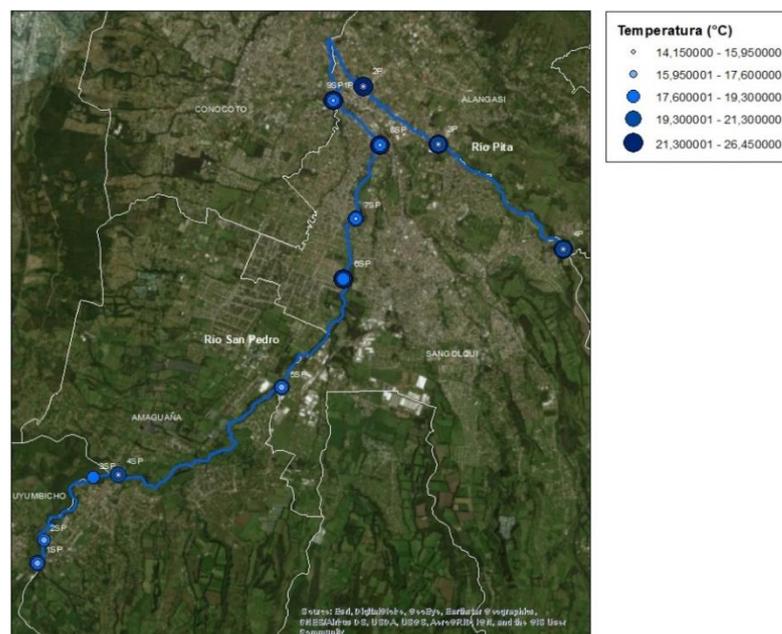


Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

5.1.3.2.3 Condición de la temperatura:

En esta condición se observó que la variación de temperatura fue en un rango de 14,15 °C a 26,45 °C.

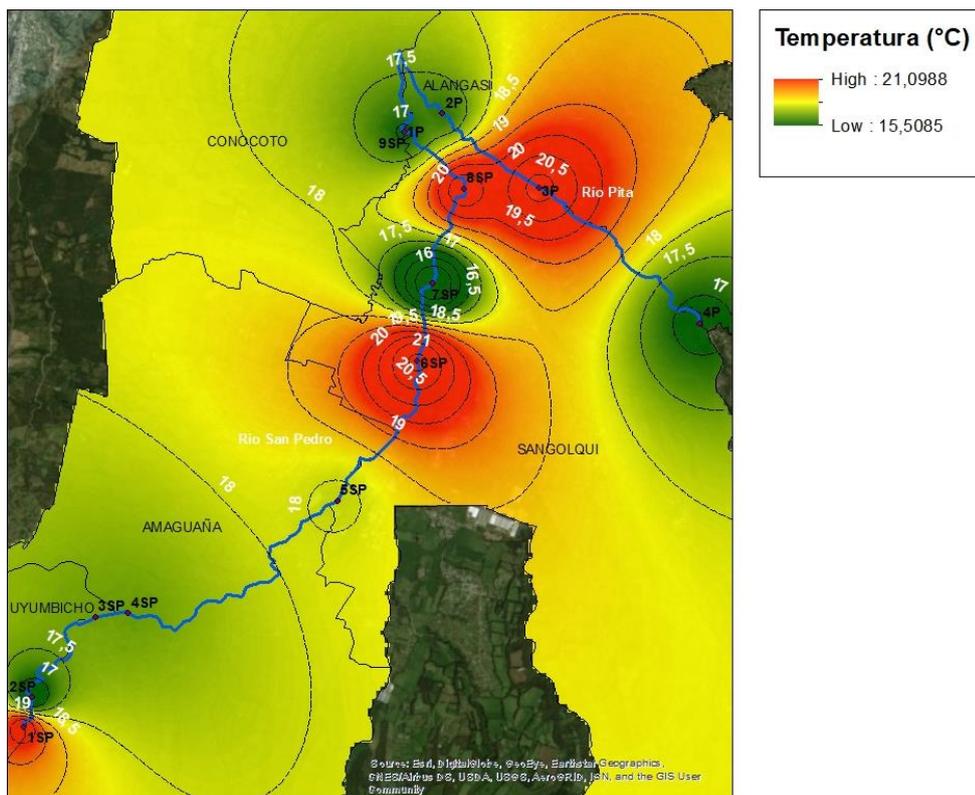
Ilustración 19. Condición de la temperatura a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

Siguiendo la descripción de la condición de temperatura se pudo realizar un mapa de isotermas y se observa que en los puntos 1, 6 y 8 del río de San Pedro y el punto 3 del río Pita tienen registros de temperatura altos mayores a 21,09 °C, mientras que los registros más bajos de temperatura se registraron en los puntos 2, 7 y 9 del río San Pedro y el punto 1, 2 y 4 del río Pita, con valores de temperatura menores a 15,50 °C.

Ilustración 20. Variación de la temperatura (Isotermas) a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio

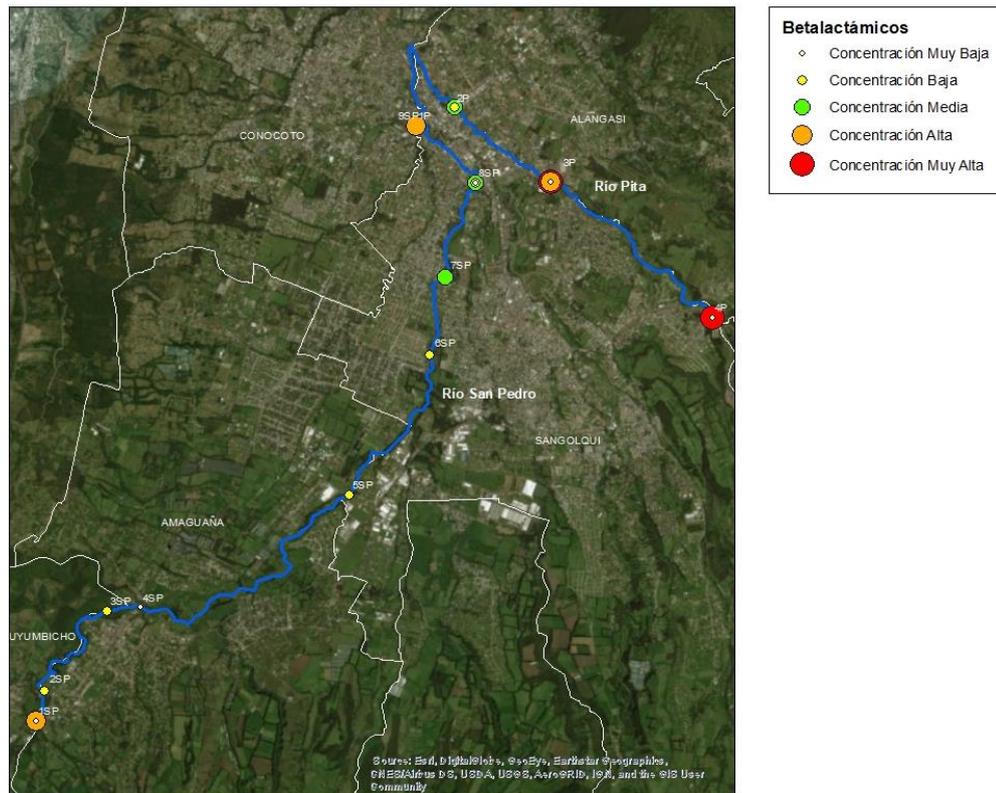


Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

5.1.3.2.4 Condición de la presencia de Betalactámicos:

En el primer gráfico se indica el nivel de concentración calculado para cada punto, dando como resultado concentraciones altas en los puntos 1 y 9 del río San Pedro y los puntos 3 y 4 del río Pita y, los valores de menor concentración fueron los puntos 2, 3, 4 y 5 del río San Pedro y el punto 2 del río Pita.

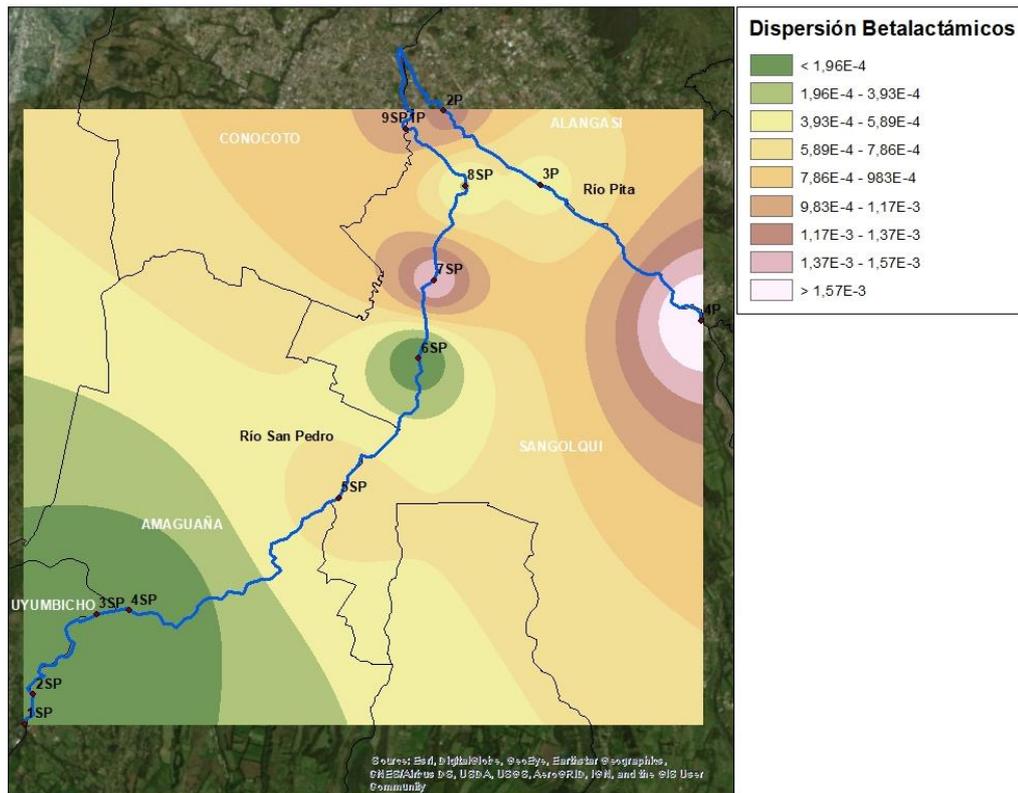
Ilustración 21. Condición de la presencia de betalactámicos a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

En la siguiente imagen se estima como sería la dispersión del antibiótico a base de betalactámicos a través de los lugares en estudio, sabiendo que Uyumbicho presenta una concentración menor de betalactámicos, mientras que la mayor concentración se presentó en el punto 7 y 9 del río San Pedro y los puntos 2 y 4 del río Pita correspondientes a la parroquia de Sangolquí, cuya dispersión se extiende alrededor de 1 km de distancia. En Amaguaña la concentración de betalactámicos se encuentra en un valor medio conforme a los resultados, sin embargo, la dispersión de este antibiótico en esta zona se extiende a lo largo de la dirección NO-SE.

Ilustración 22. Dispersión de la concentración de betalactámicos a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.

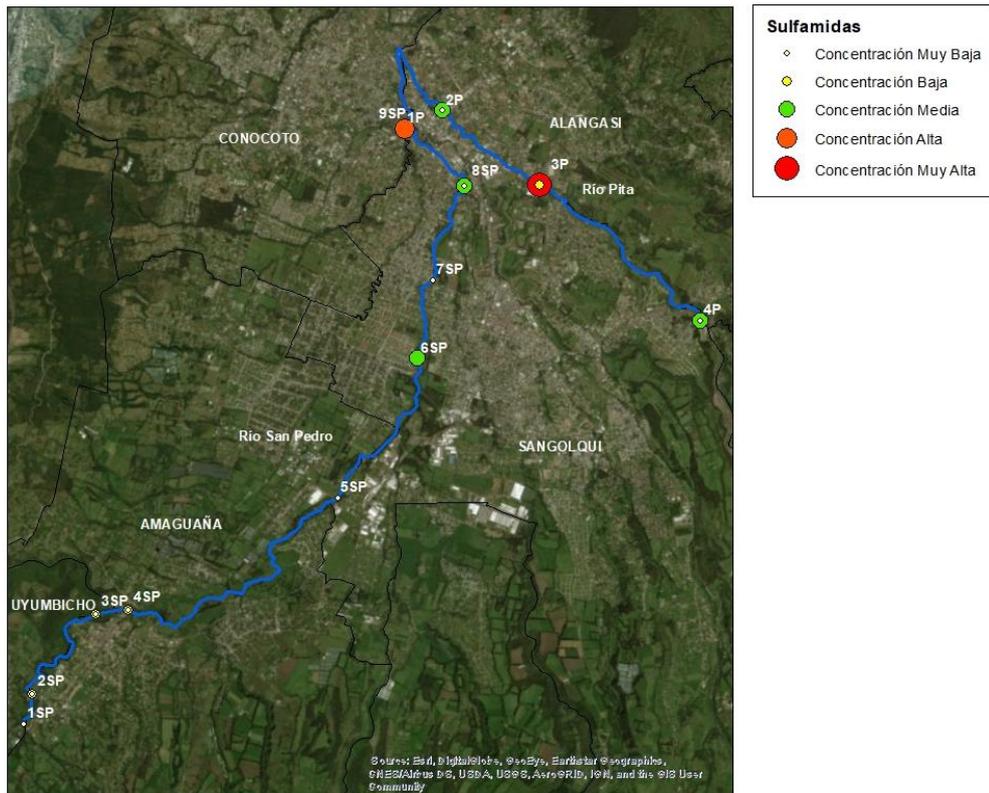


Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

5.1.3.2.5 Condición de la presencia de Sulfamidas:

En el primer gráfico se indica el nivel de concentración calculado para cada punto, dando como resultado concentraciones altas en el punto 9 del río San Pedro y el punto 3 del río Pita y, los valores de menor concentración fueron los puntos 1, 2, 3, 4, 5 y 7 del río San Pedro y como valores medios el punto 6 del río San Pedro y los puntos 2 y 4 del río Pita.

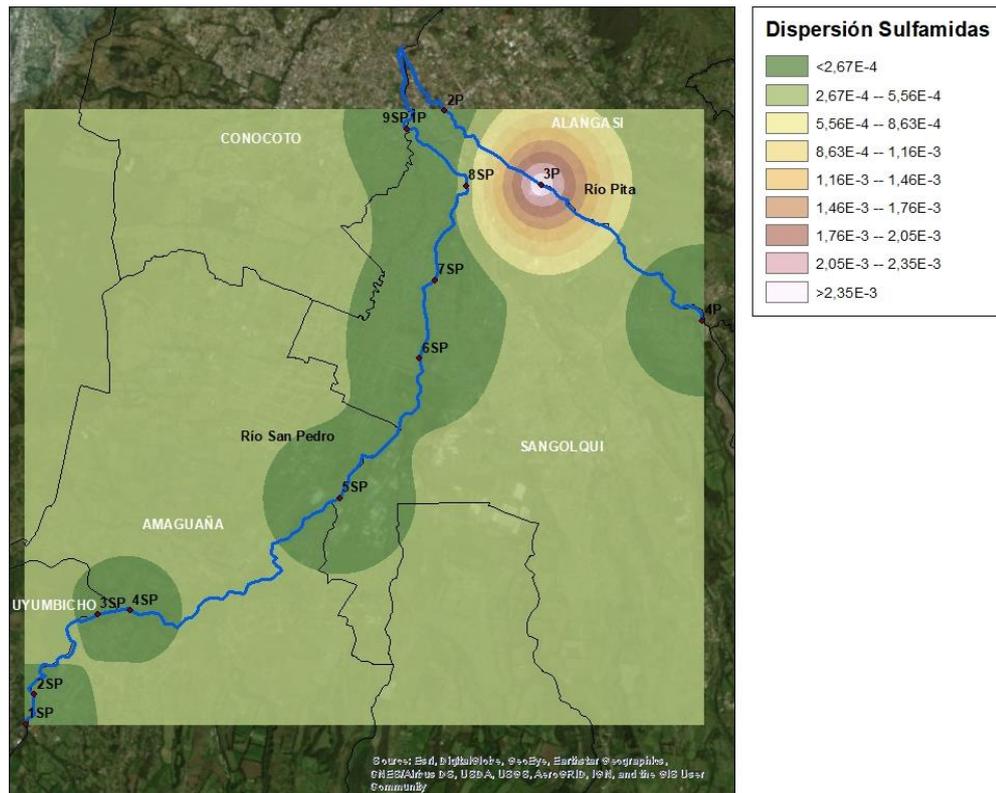
Ilustración 23. Condición de la presencia de sulfamidas a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

En la siguiente imagen se estima como sería la dispersión del antibiótico a base de sulfamidas a través de los lugares en estudio, sabiendo que Uyumbicho y Amaguaña presentan una concentración menor de sulfamidas, mientras que la mayor concentración se presentó en el punto 3 del río Pita correspondiente a la parroquia de Sangolquí, cuya dispersión se extiende alrededor de 1,5 km de distancia, concentrándose solamente en esa zona.

Ilustración 24. Dispersión de la concentración de sulfamidas a lo largo de los puntos de muestreo de los ríos en estudio.



Elaboración por los autores, (ArcGIS, 2016).

5.1.3.3 Relación y dependencia de la presencia de antibióticos a las diferentes condiciones

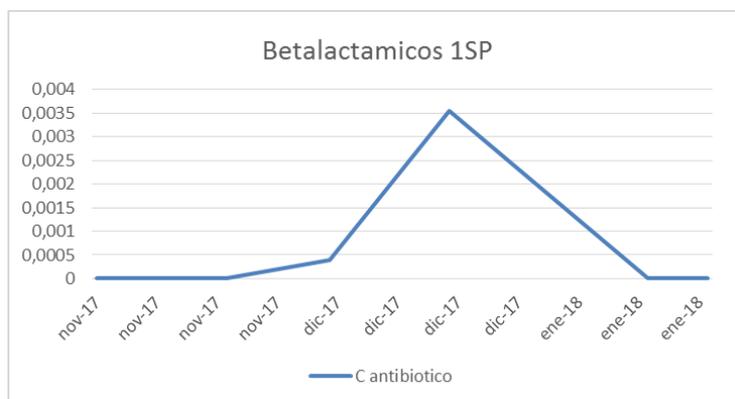
5.1.3.3.1 Relación Tiempo – Concentración

Una vez analizadas las concentraciones de los residuos de antibióticos de betalactámicos y sulfamidas durante los 3 meses que fueron recolectadas las muestras de agua de los ríos Pita y San Pedro se obtiene lo siguiente:

Antibióticos betalactámicos.

PUNTO #1 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 25. Gráfica correspondiente al punto #1 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámico.

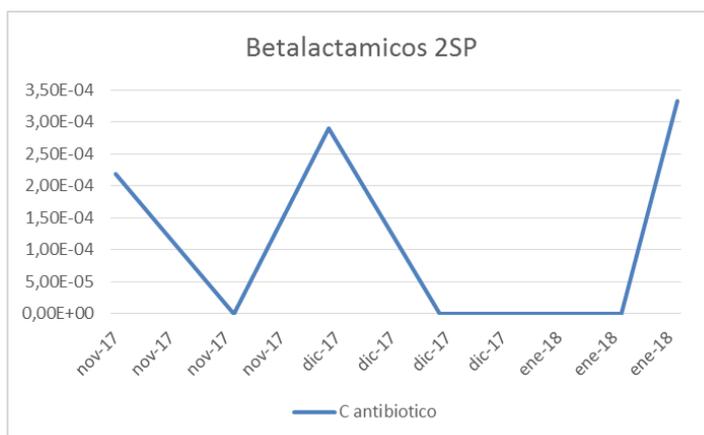


Elaboración por los autores.

En el presente cuadro de datos se puede observar que para el mes de diciembre con fecha 04 del año 2017, tiene una mayor concentración de residuos de antibióticos betalactámicos para el mes de noviembre y en cambio en el mes de enero no existe presencia de residuos de antibióticos betalactámicos, esto considerando el primer punto de muestreo para el río San Pedro.

PUNTO #2 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 26. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

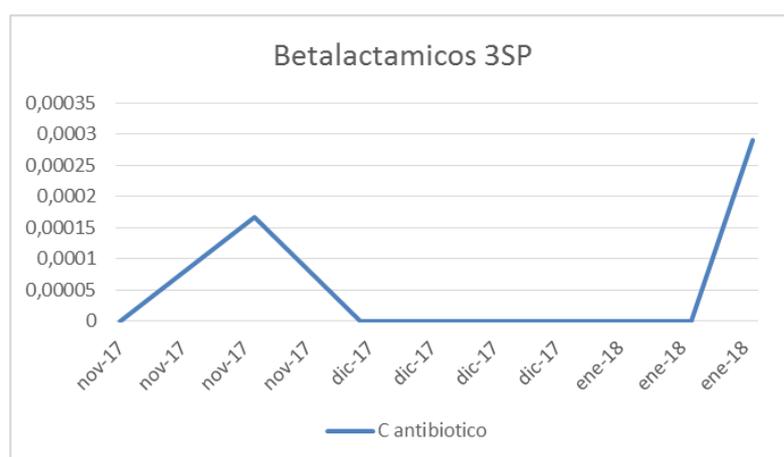


Elaboración por los autores

Para el punto número 2 del río San Pedro presenta que en el mes de enero con fecha 17 del año 2018, tiene una mayor concentración de residuos de antibióticos betalactámicos y para las fechas: 22 de noviembre, 18 de diciembre del año 2017 y para el 2 de enero del año 2018, no existe presencia de residuos de antibióticos betalactámicos.

PUNTO #3 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 27. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

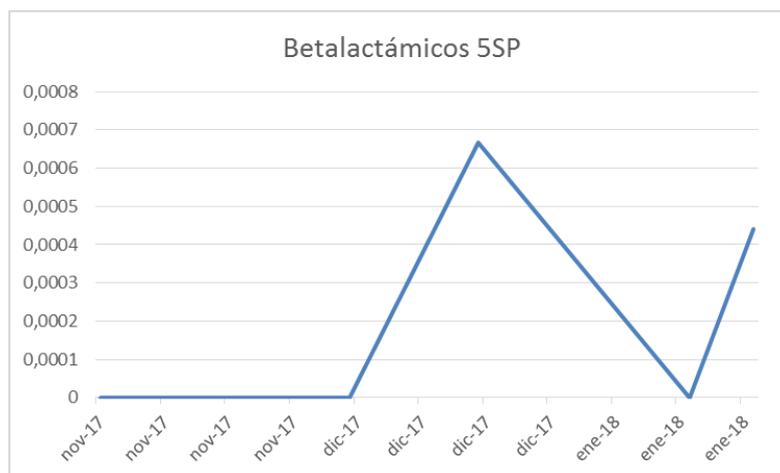
Para el punto 3 en la toma de muestra se evidenció que en el mes de enero con fecha 17 del año 2018, existe una mayor concentración de residuos de antibióticos betalactámicos.

PUNTO #4 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Para el punto 4 no se evidenció la presencia de residuos de antibióticos en ninguna de las fechas establecidas para tomas de muestras, o las muestras poseían concentraciones extremadamente bajas que el kit no pudo detectar.

PUNTO #5 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 28. Gráfica correspondiente al punto #5 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

En el punto de muestreo número 5 del río San Pedro, se puede observar un valor de concentración de residuos de betalactámicos mayor en el mes de diciembre con fecha 18 del año 2017, para el mes de noviembre no existió presencia la presencia de residuos betalactámicos así también el 4 de diciembre del 2017 y 2 de enero del 2018.

PUNTO #6 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 29. Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

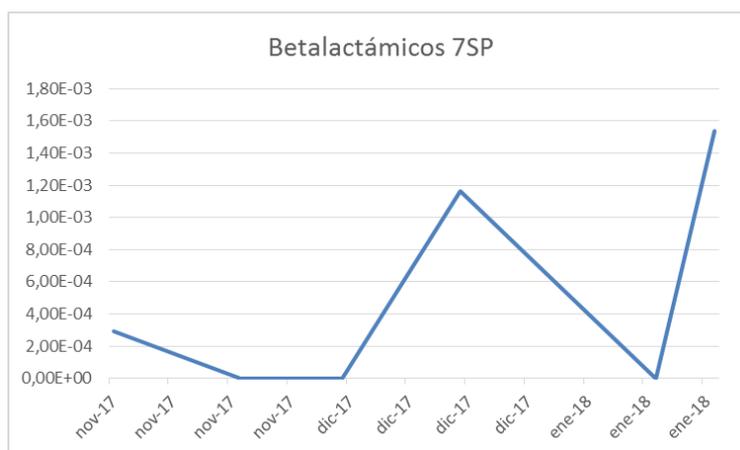


Elaboración por los autores

Para la muestra número 6 del río San Pedro, se observan valores de concentración de residuos de antibióticos betalactámicos altos en las fechas 18 de diciembre del 2017 y el 17 de enero del 2018, para las fechas 22 de noviembre, 4 de diciembre del 2017 la concentración de residuos de antibióticos no existió.

PUNTO #7 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 30. Gráfica correspondiente al punto #7 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

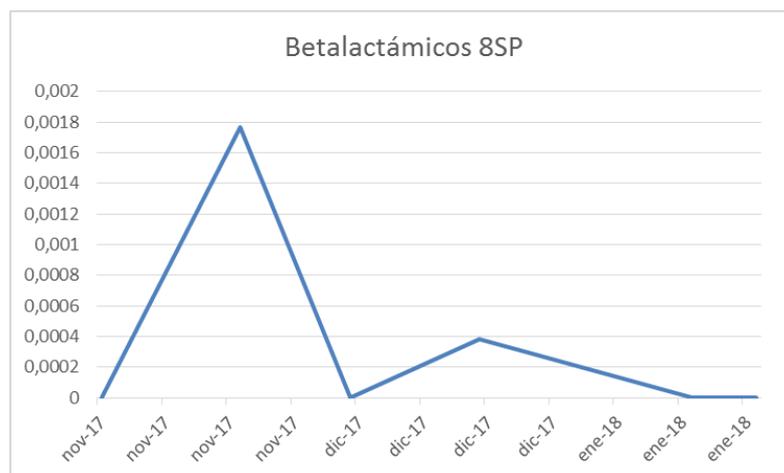


Elaboración por los autores

Como se observa en el cuadro de datos para punto de muestreo 7, el valor de concentración mayor aparece en la fecha 7 de noviembre del 2017, y sin presencia de residuos de antibióticos en las fechas: 22 de noviembre, 4 de diciembre del 2017 y 2 de enero del 2018.

PUNTO #8 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 31. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

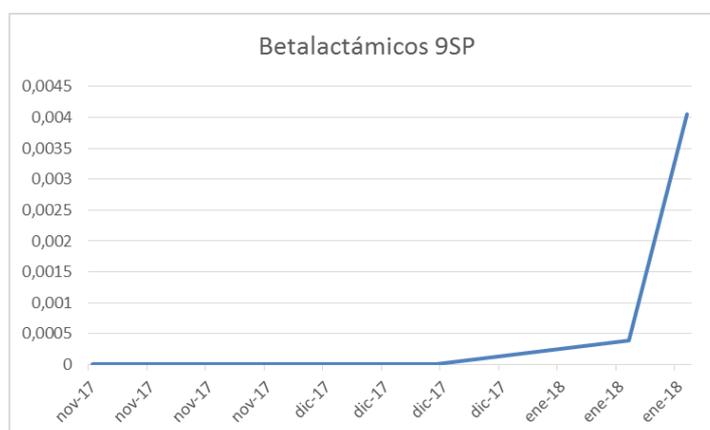


Elaboración por los autores

Para el punto 8 de muestreo del río San Pedro, el 18 de diciembre del 2017, se encuentra la concentración más alta de residuos de antibióticos betalactámicos y sin presencia de residuos de antibióticos en las fechas 7 de noviembre, 4 de diciembre del 2017 y las muestras del mes de enero del 2018.

PUNTO #9 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 32. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

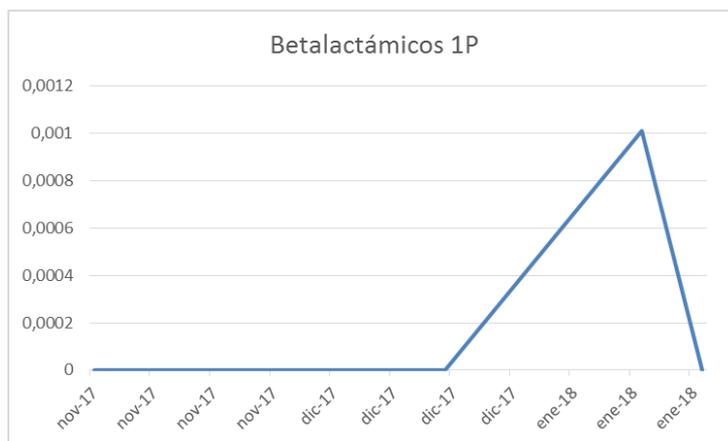


Elaboración por los autores

Para el punto 9 de muestreo se encontró que en la fecha 17 de enero del 2018, tiene una concentración de residuos de betalactámicos mayor que en las otras fechas, para los meses de noviembre y diciembre no existe presencia de residuos de antibióticos.

PUNTO #1 DEL RÍO PITA

Ilustración 33. Gráfica correspondiente al punto #1 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

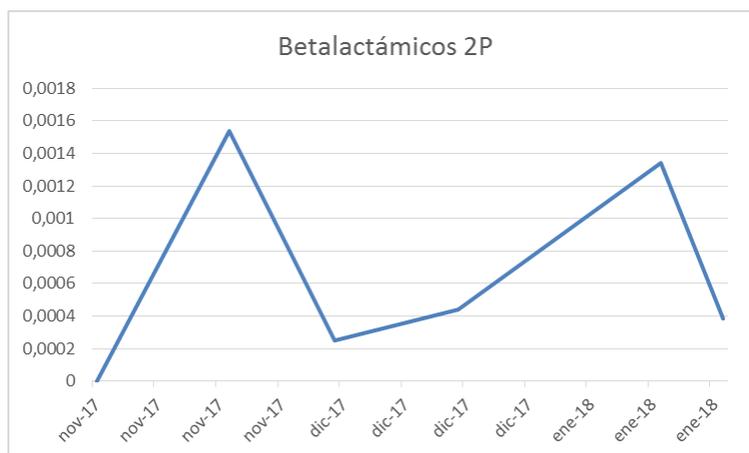


Elaboración por los autores

En el primer punto de muestreo del río Pita solo se evidencio casos positivos de residuos de antibióticos betalactámicos para la fecha del 2 de enero del 2018, considerando que en los meses de noviembre y diciembre del 2017 no existió presencia de betalactámicos, así como también en la fecha del 17 de enero del 2018.

PUNTO #2 DEL RÍO PITA

Ilustración 34. Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

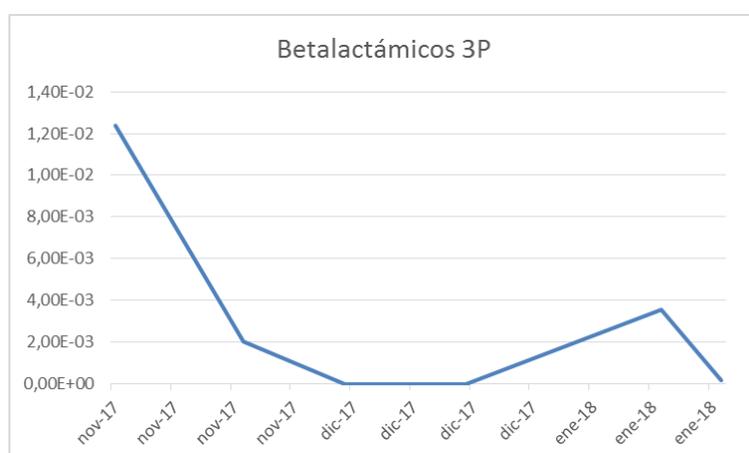


Elaboración por los autores

En el segundo punto de muestra del río Pita, 5 de 6 datos fueron casos positivos, con presencia de residuos de antibióticos, en la fecha 22 de noviembre del 2017 existió la mayor concentración de betalactámicos.

PUNTO #3 DEL RÍO PITA

Ilustración 35. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

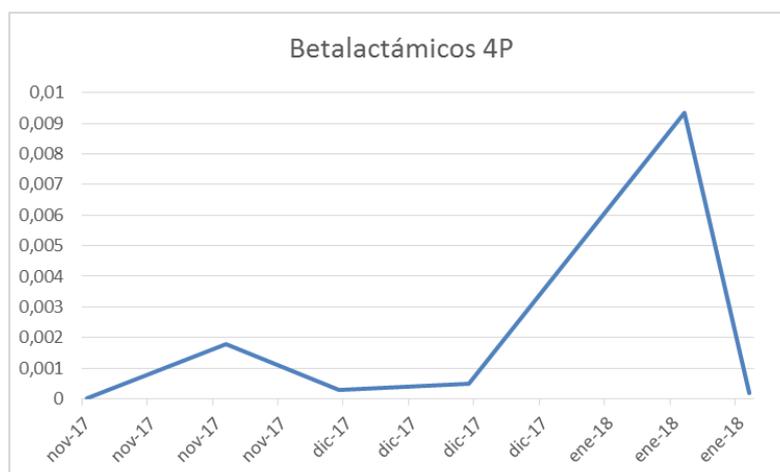


Elaboración por los autores

Para el 3 punto de muestreo del río Pita se observa que el 07 de noviembre del 2018, existió la mayor concentración de residuos de antibióticos betalactámicos, y en el mes de diciembre no se evidenció presencia de residuos de antibióticos.

PUNTO #4 DEL RÍO PITA

Ilustración 36. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos



Elaboración por los autores

Para el último punto de muestra del río el 2 de enero del 2018, se evidenció la mayor concentración de residuos de antibióticos betalactámicos, la única muestra que dio como negativo en la presencia de residuos de antibióticos fue en la fecha del 7 de noviembre del 2017.

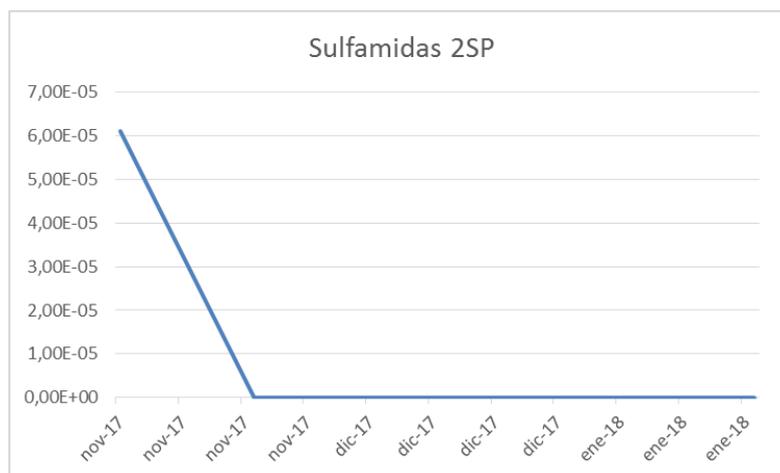
Antibióticos sulfamidas

PUNTO #1 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

No se evidenció la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas en ninguna de las fechas que se realizó la recolección de las muestras.

PUNTO #2 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 37. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

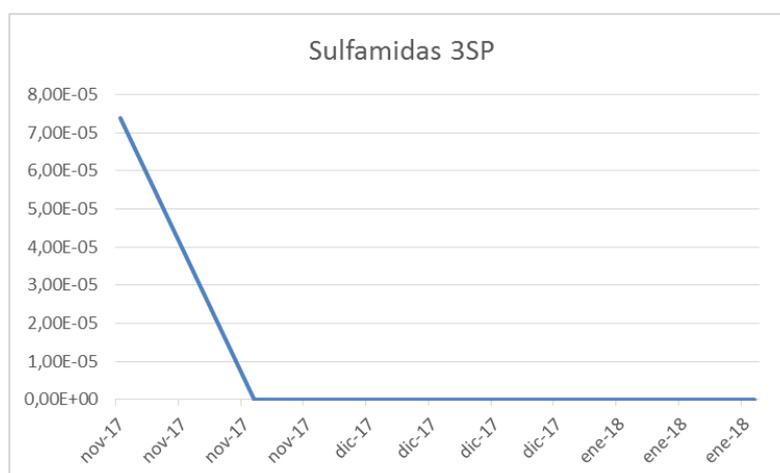


Elaboración por los autores

En la fecha 7 de noviembre del 2017, se evidenció la concentración más alta de residuos de antibióticos con sulfamidas, en las otras fechas no existió la presencia de sulfamidas en las muestras de agua.

PUNTO #3 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 38. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos

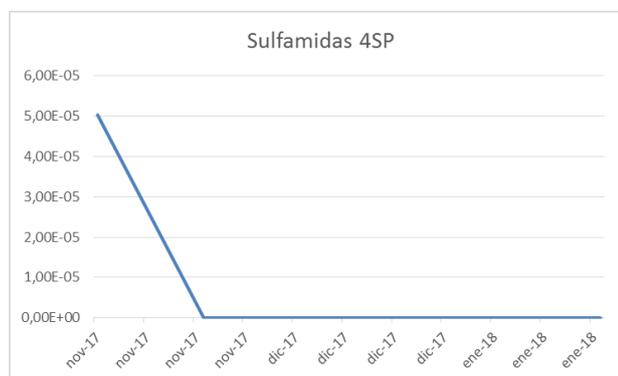


Elaboración por los autores

En el punto 3 de muestreo, el 7 de noviembre del 2017, solo se dio un caso positivo de residuos de antibióticos con sulfamidas.

PUNTO #4 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 39. Gráfica correspondiente al punto #4 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

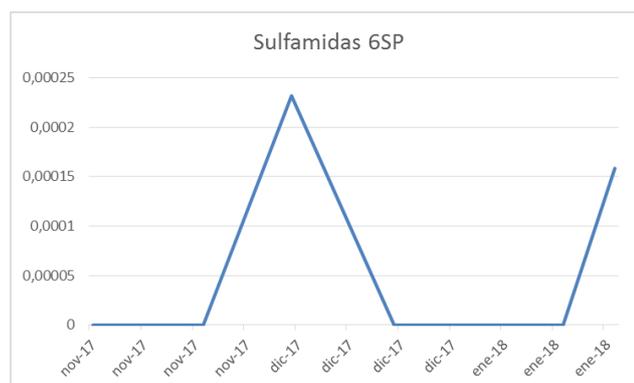
En el punto 4 de muestreo, el 7 de noviembre del 2017, solo apareció un caso positivo de residuos de antibióticos con sulfamidas.

PUNTO #5 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

No existió la presencia de residuos de antibióticos con sulfamidas en ninguna de las fechas que se recolectaron las muestras de agua.

PUNTO #6 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración .40 Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

En fecha 4 de diciembre del 2017, se tiene una mayor concentración de residuos de antibióticos con sulfamidas a comparación con las otras fechas de muestreo de agua.

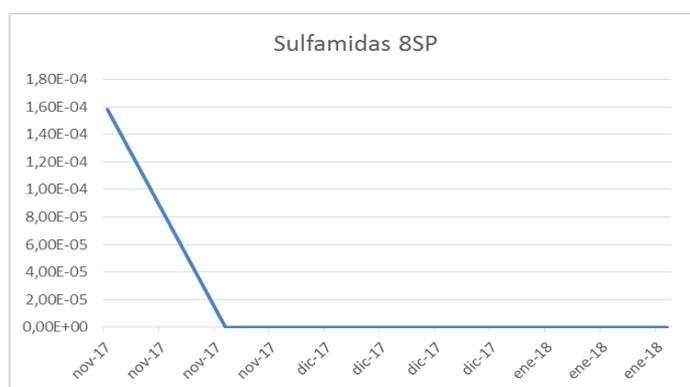
En el mes de noviembre y en las fechas 18 de diciembre del 2017 y 2 de enero del 2018 no se evidenció presencia de residuos de antibióticos.

PUNTO #7 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

No se evidencio la presencia de casos positivos en residuos de antibióticos con sulfamidas.

PUNTO #8 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 41. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

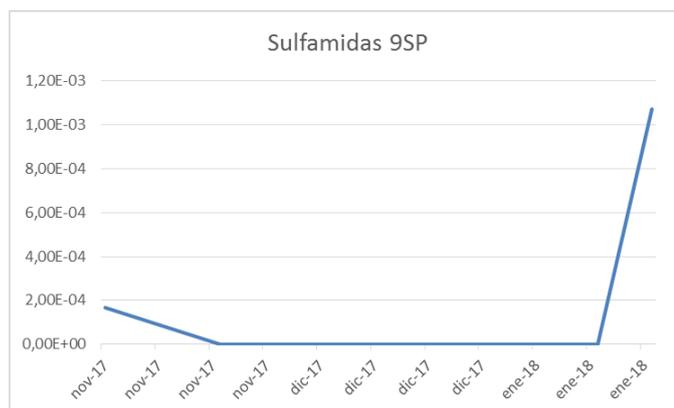


Elaboración por los autores

Existió un solo caso positivo para la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas en la fecha 7 de noviembre del 2017.

PUNTO #9 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 42. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

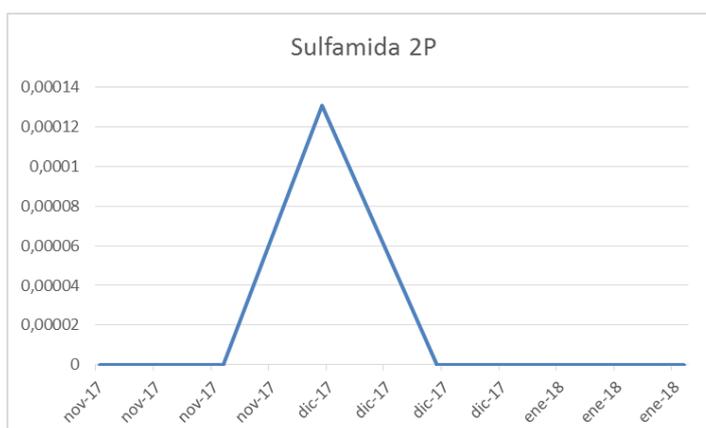
En la fecha 17 de enero del 2018 se evidenció la mayor concentración de residuos de antibióticos. En el mes de diciembre y en las fechas: 22 de noviembre del 2017 y 2 de enero del 2018 no se evidenció presencia de residuos de antibióticos.

PUNTO #1 DEL RÍO PITA

No existe la presencia de residuos de antibióticos en el primer punto del río Pita.

PUNTO #2 DEL RÍO PITA

Ilustración.43 Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

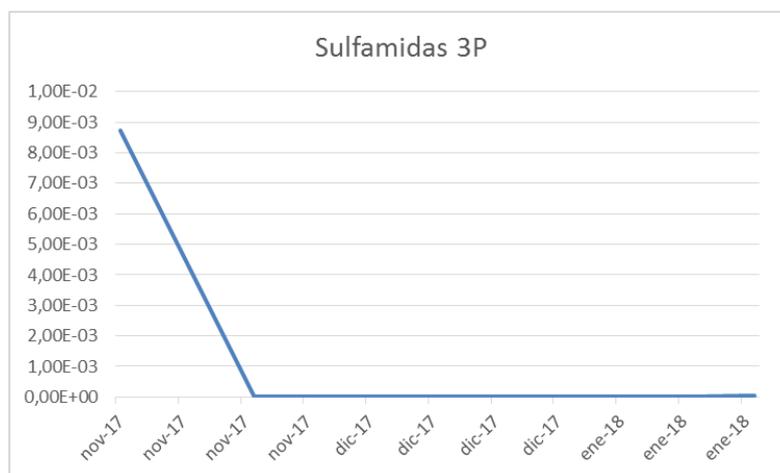


Elaboración por los autores

Para el segundo punto de muestreo del río pita se encontró que solo en la fecha del 4 de diciembre del 2017 hubo la presencia de residuos de antibióticos sulfamidas.

PUNTO #3 DEL RÍO PITA

Ilustración 44. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.

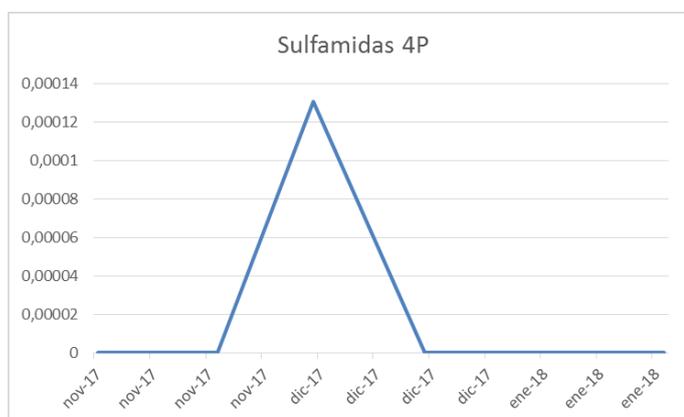


Elaboración por los autores

Para el punto 3 de muestreo del río Pita, dieron 2 casos positivos teniendo una concentración mayor el día 7 de noviembre del 2017.

PUNTO #4 DEL RÍO PITA

Ilustración 45. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y concentración de betalactámicos.



Elaboración por los autores

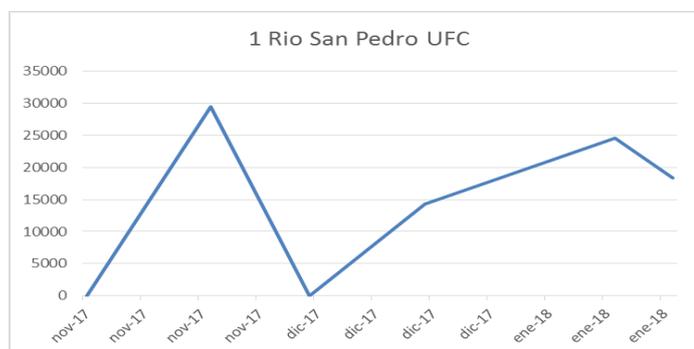
Para el último punto del río Pita, existió un solo caso positivo en residuos de antibióticos con sulfamidas el día 4 de diciembre del 2017.

Análisis microbiológico unidades formadoras de colonias UFC.

Para todos los puntos en los que fue muestreado tanto el río Pita como el San Pedro, se realizó análisis microbiológico y podemos observar los resultados, en todos los puntos de muestreo en la fecha 7 de noviembre del 2017 no existen datos definidos por que su crecimiento fue considerado incontable.

PUNTO #1 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 46. Gráfica correspondiente al punto #1 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

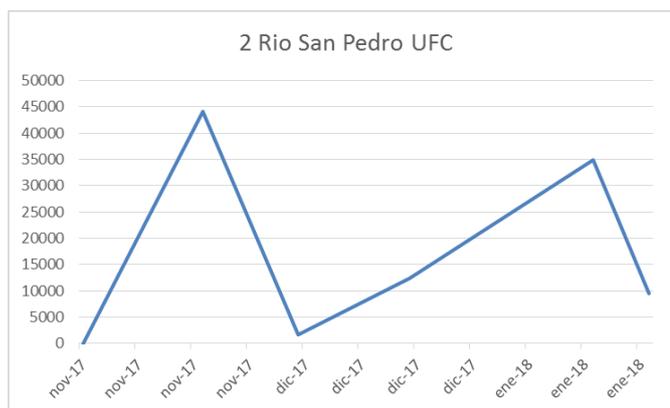


Elaboración por los autores

Con un mayor crecimiento bacteriano el día 22 de noviembre del 2017, las unidades con las que se analiza son como UFC (unidad formadora de colonia), estas fueron incontables en las fechas del 7 de noviembre y el 4 de diciembre del 2017.

PUNTO #2 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 47. Gráfica correspondiente al punto #2 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos

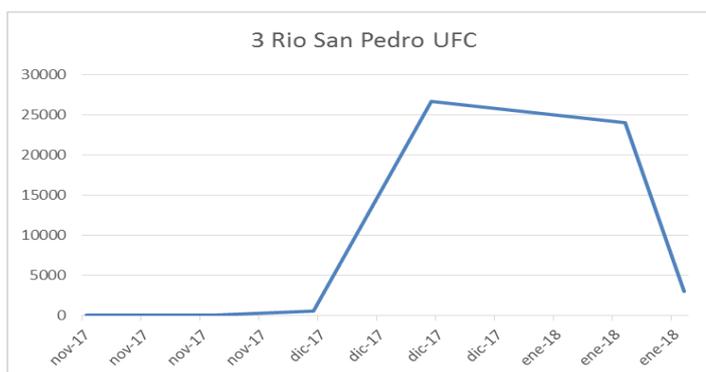


Elaboración por los autores

El día 22 de noviembre del 2017 existió un mayor crecimiento microbiológico y el día 7 de noviembre del 2017 el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #3 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 48. Gráfica correspondiente al punto #3 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

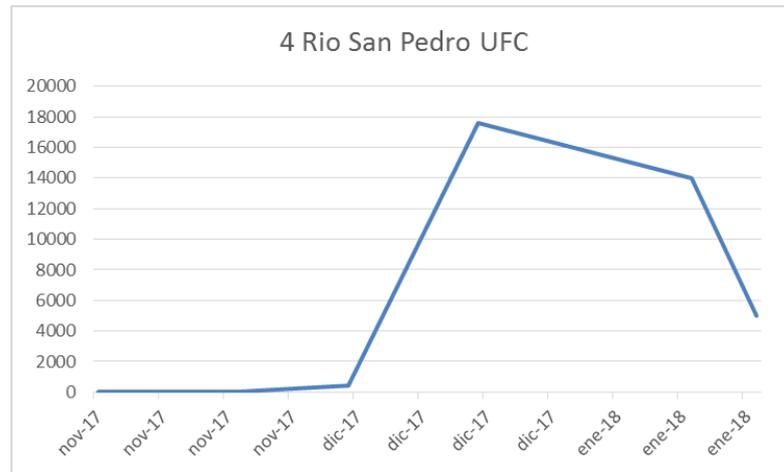


Elaboración por los autores

Se evidenció un mayor crecimiento el 18 de diciembre del 2017, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #4 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 49. Gráfica correspondiente al punto #4 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

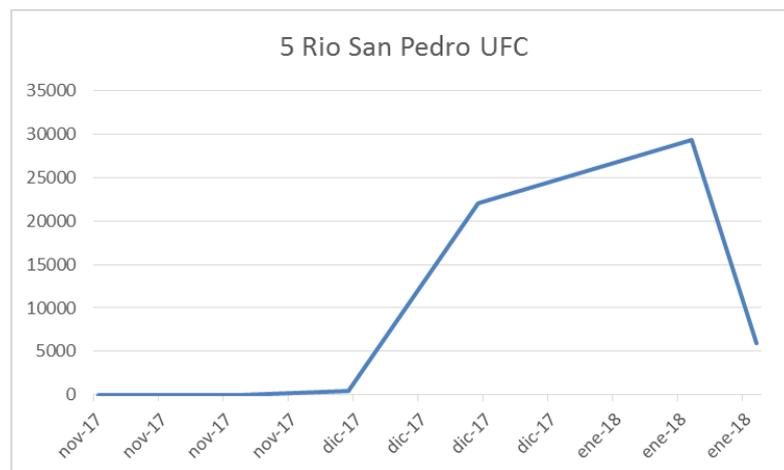


Elaboración por los autores

Se evidenció un mayor crecimiento el 18 de diciembre del 2017, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #5 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 50. Gráfica correspondiente al punto #5 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

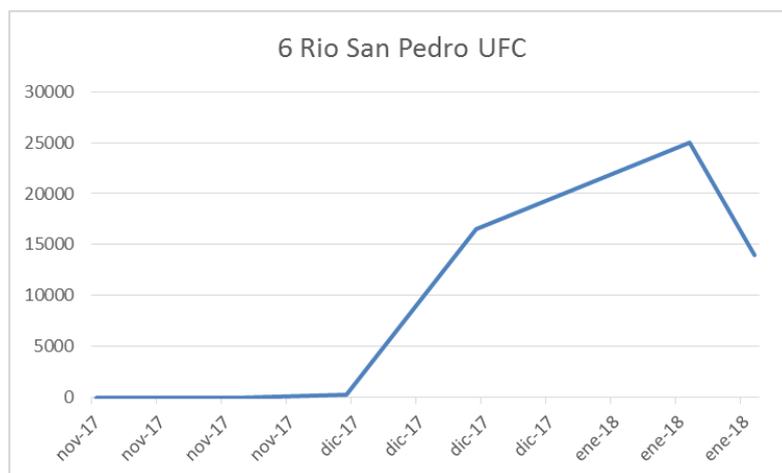


Elaboración por los autores

Se evidenció un mayor crecimiento el 2 de enero del 2018, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #6 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 51. Gráfica correspondiente al punto #6 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

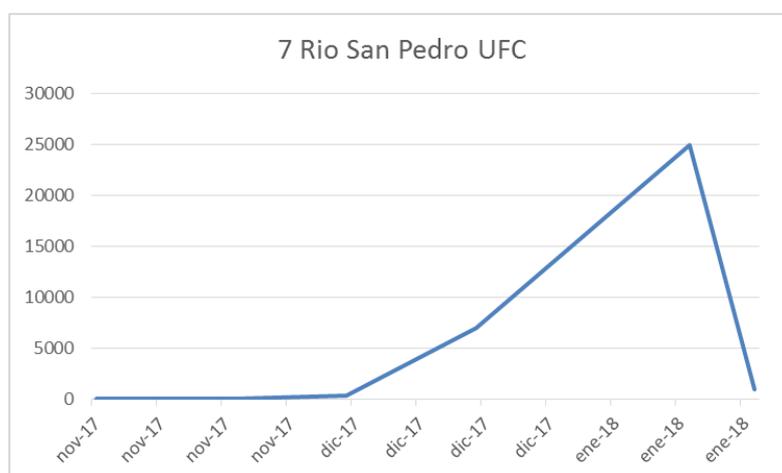


Elaboración por los autores

En este punto de muestreo 6 se observa un mayor crecimiento microbiano el 2 de enero del 2018, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #7 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 52. Gráfica correspondiente al punto #7 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

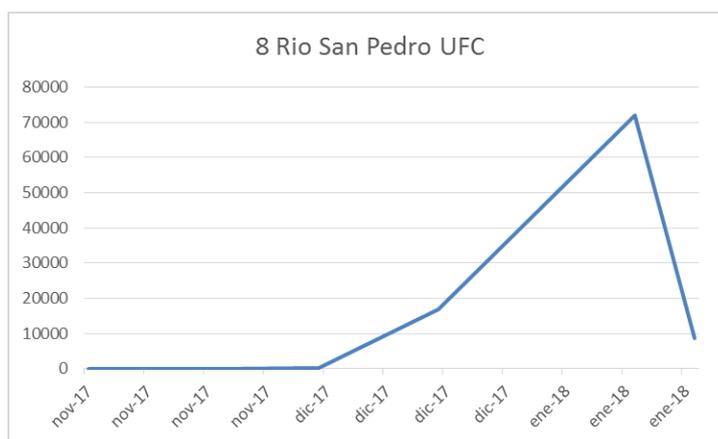


Elaboración por los autores

Se evidenció un mayor crecimiento en el mes de enero el día 2 del año 2018, siendo el 5to día de muestreo, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #8 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 53. Gráfica correspondiente al punto #8 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

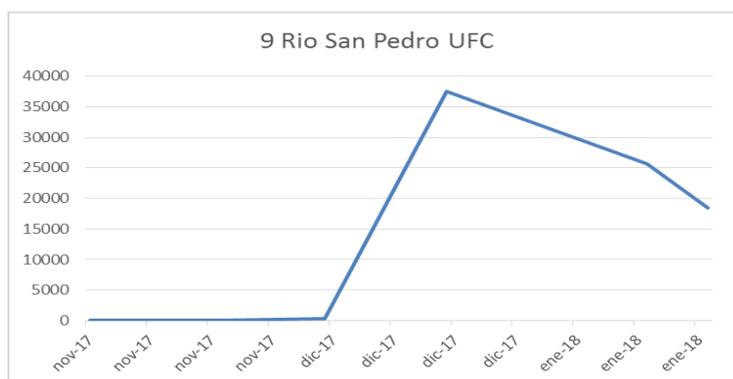


Elaboración por los autores

En el mes de enero, el 2do día del año 2018, existió el mayor crecimiento microbiológico, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #9 DE MUESTREO DEL RÍO SAN PEDRO

Ilustración 54. Gráfica correspondiente al punto #9 del río San Pedro acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

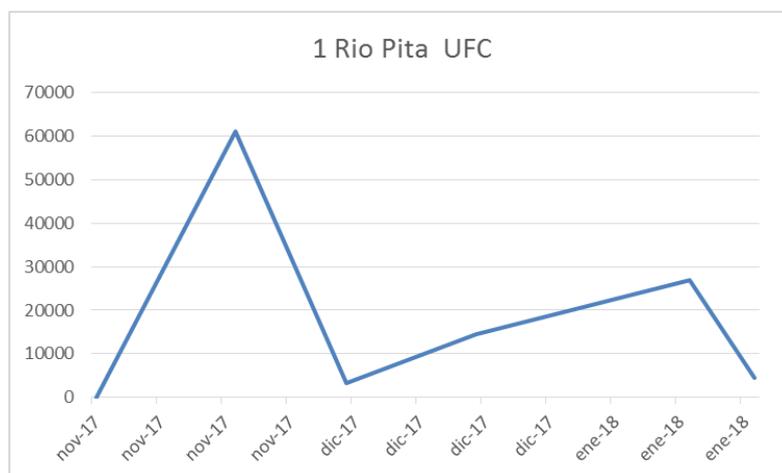


Elaboración por los autores

Se observa un mayor crecimiento de microorganismos el día 18 de diciembre del 2017, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #1 DEL RÍO PITA

Ilustración 55. Gráfica correspondiente al punto #1 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

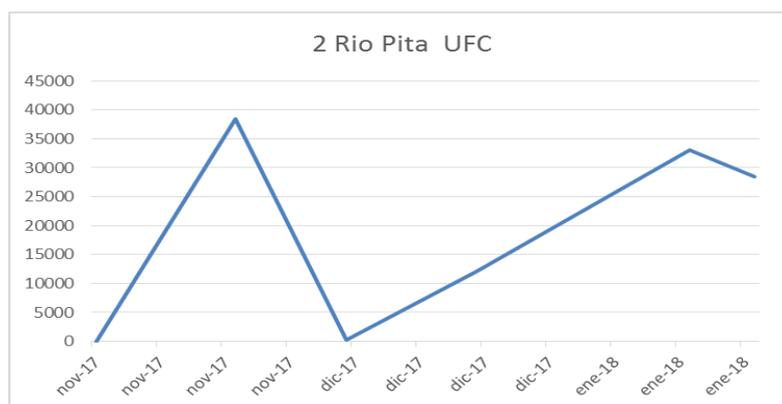


Elaboración por los autores

El día 22 de noviembre del 2017, el crecimiento es mayor con relación a las otras fechas de muestreo, para el día 7 de noviembre del 2017 el crecimiento es considerado como incontable

PUNTO #2 DEL RÍO PITA

Ilustración 56. Gráfica correspondiente al punto #2 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos

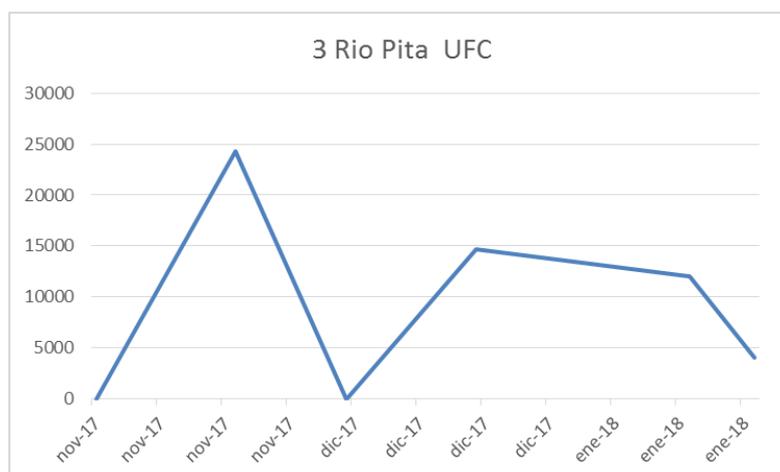


Elaboración por los autores

El día 22 de noviembre del 2017, el crecimiento es mayor con relación a las otras fechas de muestreo, para el día 7 de noviembre del 2017 el crecimiento es considerado como incontable

PUNTO #3 DEL RÍO PITA

Ilustración 57. Gráfica correspondiente al punto #3 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos.

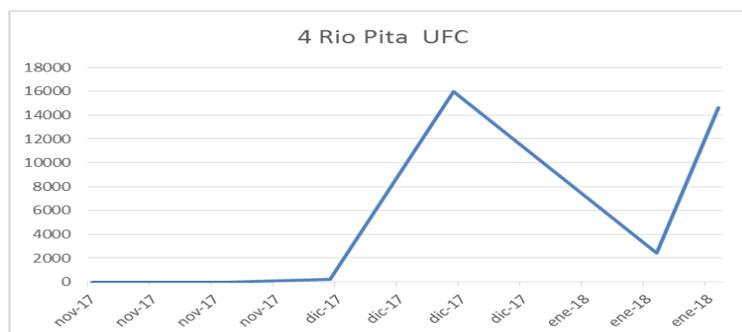


Elaboración por los autores

El día 22 de noviembre del 2017, el crecimiento es mayor con relación a las otras fechas de muestreo, para los días 7 de noviembre y 4 de diciembre del 2017 el crecimiento es considerado como incontable.

PUNTO #4 DEL RÍO PITA

Ilustración 58. Gráfica correspondiente al punto #4 del río Pita acerca de la relación del tiempo y crecimiento de microorganismos



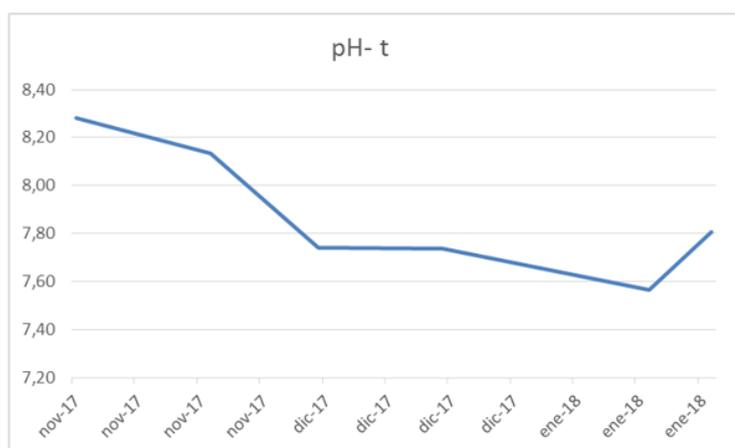
Elaboración por los autores

En el cuarto día de muestreo con fecha 22 de diciembre del 2017, se obtuvo un mayor crecimiento de microorganismos, para el mes de noviembre el crecimiento es considerado como inconstante

5.1.3.3.2 Relación pH - Tiempo

En el tiempo de 3 meses, en el cual se recopiló información del pH, medido para cada una de las 78 muestras se obtuvo que, para el mes de noviembre, en el primer día de toma de muestras con fecha 7/11/2017 se tiene un valor de pH de 8,28 siendo este valor el mayor con respecto a los demás meses.

Ilustración 59. Gráfica correspondiente a la relación y análisis del pH y el tiempo.

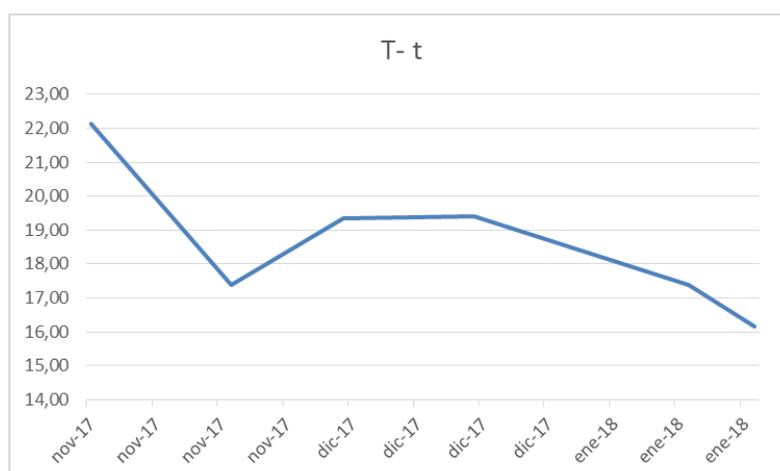


Elaboración por los autores

5.1.3.3.3 Relación Temperatura - Tiempo

Para cada uno de los días que se realizó el muestreo, se tomaron datos de temperatura en cada uno de los puntos de muestro de los ríos, para poder analizar se calculó un promedio de la temperatura de cada día de los dos ríos, obteniendo así que la temperatura para los meses de noviembre, diciembre y enero se encontró valores entre 16°C a 22°C, siendo el día más caluroso el 07 de noviembre del 2017.

Ilustración 60. Gráfica correspondiente a la relación y análisis de la temperatura y el tiempo.



Elaboración por los autores

5.1.3.3.4 Dependencia de la concentración (UFC) y las demás variables en estudio

Para el siguiente análisis se consideraron variables de estudio: el tiempo en que se realizaron los muestreos que fueron los meses de noviembre (solo el segundo muestreo debido a la concentración incontable del primer muestreo), diciembre y enero; también la localización de las muestras, tanto si fue en el río San Pedro o en el río Pita; se consideró la presencia o no de betalactámicos y sulfamidas y al ser valores de existencia o no (dicotómicos), se les asignó un valor de 1 si había presencia y el valor de 0 para indicar la ausencia de los mismos; y por último se tomó los valores de concentraciones UFC/ml de cada muestra de antibiótico positivo según los procesos anteriormente calculados. Este proceso se lo analizó en el programa informático R Studio, que nos permite examinar la relación de cada una de las variables con la concentración obtenida de UFC/ml.

Como primer paso se analizó que los datos obtenidos tengan una estructura normal, estadísticamente hablando. Una vez ingresados los datos se realizaron las pruebas respectivas de normalidad, pruebas estandarizadas para determinar si los datos tienen

una media, tal sea el caso se realizan pruebas paramétricas, caso contrario son consideradas no paramétricas, esto a la vez nos sirve para probar la influencia de los factores en la variable de respuesta, la comprobación del proceso está programado en R Studio (Anexo F2).

A partir de esto se establecen etiquetas de los datos a analizar, los cuales se encuentran en función de las UFC calculadas como concentración/mililitro, como se visualizarán posteriormente, y después se encuentran las pruebas de normalidad registradas en el sistema como “x, y, z, a y b”, obteniendo como resultado lo siguiente:

Ilustración 61. Resultados de la prueba de normalidad de los datos en R Studio.

```

Shapiro-wilk normality test
data: ufc
W = 0.83437, p-value = 4.839e-07

>
> y.test <- cvm.test(ufc)
> print(y.test)

Cramer-von Mises normality test
data: ufc
W = 0.43926, p-value = 9.813e-06

>
> z.test <- ad.test(ufc)
> print(z.test)

Anderson-Darling normality test
data: ufc
A = 2.8577, p-value = 2.875e-07

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
data: ufc
D = 0.18452, p-value = 9.1e-06

>
> b.test <- pearson.test(ufc)
> print(b.test)

Pearson chi-square normality test
data: ufc
P = 96.615, p-value < 2.2e-16

```

Elaboración por los autores

En este proceso el orden “x, y, z, a y b” corresponde al orden de secuencia de las pruebas, con una prueba basta para confirmar la validez de los datos, pero al contar con todas se tiene mayor robustez en los resultados. Con estos resultados consideramos el P valor de cada prueba “p-value” en el programa. Para las pruebas de hipótesis de normalidad si este P valor es $< 0,05$ se determina que los datos no siguen una distribución normal (Olea, 2016). Y como se observa ninguna de las

pruebas nos da un valor que determine que los datos siguen una distribución normal, por lo normal los datos biológicos no suelen ajustarse a distribuciones normales.

Ahora bien, al no considerar los datos como una distribución normal, se los toma para evaluar pruebas no paramétricas, las cuales analizan las diferentes variables con respecto a la variable de respuesta, de igual manera se analizó en el programa ingresando el siguiente código:

Ilustración 62. Programación para prueba no paramétrica de los datos en R Studio

```
kruskal.test (ufc ~ t, data = tabla)
kruskal.test (ufc ~ l, data = tabla)
kruskal.test (ufc ~ b, data = tabla)
kruskal.test (ufc ~ s, data = tabla)
```

Elaboración por los autores

Arrojando los siguientes resultados al correr el programa:

Ilustración 63. Resultados de la prueba no paramétrica de los datos en R Studio.

```
> kruskal.test (ufc ~ t, data = tabla)
kruskal-wallis rank sum test
data: ufc by t
kruskal-wallis chi-squared = 25.91, df = 4, p-value = 3.3e-05
> kruskal.test (ufc ~ l, data = tabla)
kruskal-wallis rank sum test
data: ufc by l
kruskal-wallis chi-squared = 0.55888, df = 1, p-value = 0.4547
> kruskal.test (ufc ~ b, data = tabla)
kruskal-wallis rank sum test
data: ufc by b
kruskal-wallis chi-squared = 7.2625, df = 1, p-value = 0.007041
> kruskal.test (ufc ~ s, data = tabla)
kruskal-wallis rank sum test
data: ufc by s
kruskal-wallis chi-squared = 0.63151, df = 1, p-value = 0.4268
```

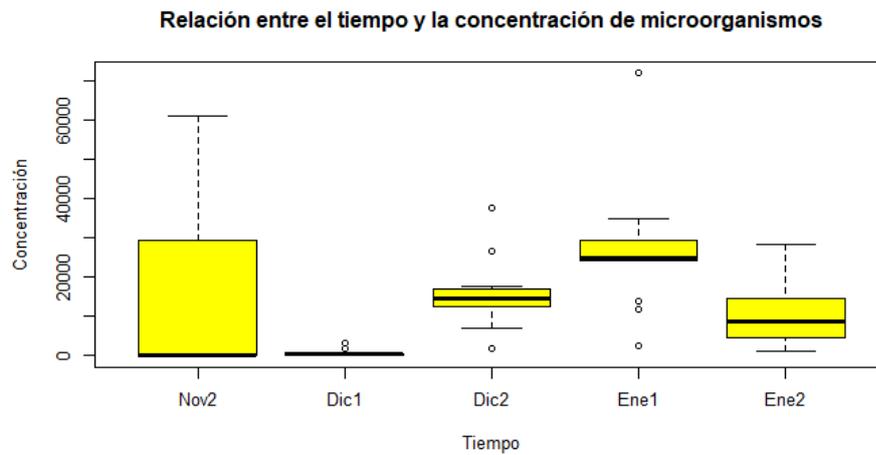
Elaboración por los autores

Estos resultados se obtuvieron al considerar la relación entre las UFC (concentración/mililitro) y cada una de las variables ya observadas como el tiempo, localización y la presencia de betalactámicos y sulfamidas (Olea, 2016).

En este caso observamos de igual manera el P valor, “p-value”, y si este es $< 0,05$ las variables son dependientes entre sí y, tras el análisis se verifica que existe relación entre el tiempo y las UFC y además una relación entre la presencia de betalactámicos y las UFC.

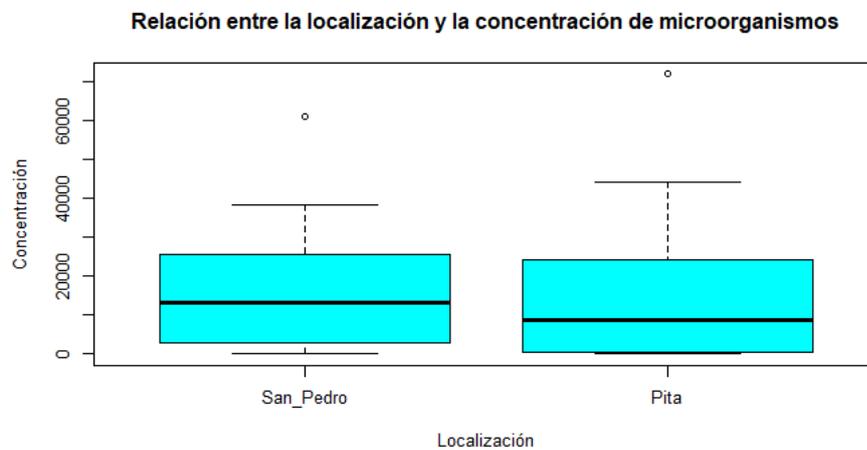
Ya que si se obtuvieron resultados con estas pruebas creamos gráficos para describir cada una de las situaciones en las que se encontró la relación de variables, teniendo los siguientes gráficos:

Ilustración 64. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre el tiempo y la concentración de microorganismos



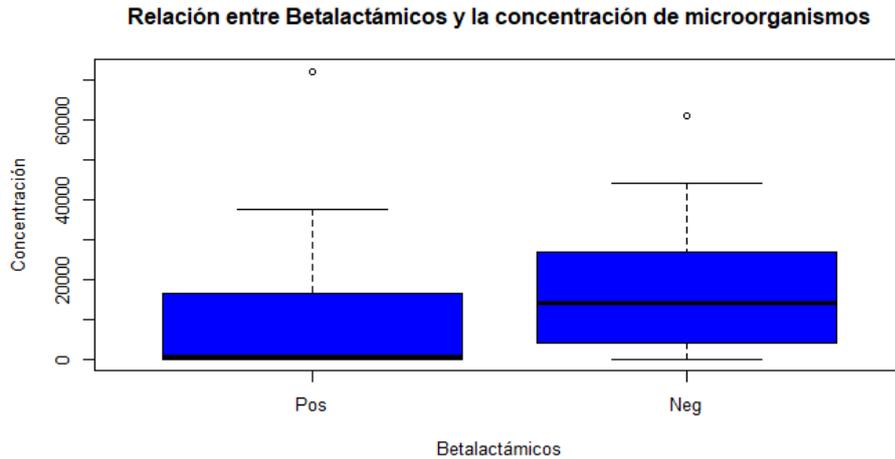
Elaboración por los autores

Ilustración 65. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la localización y la concentración de microorganismos



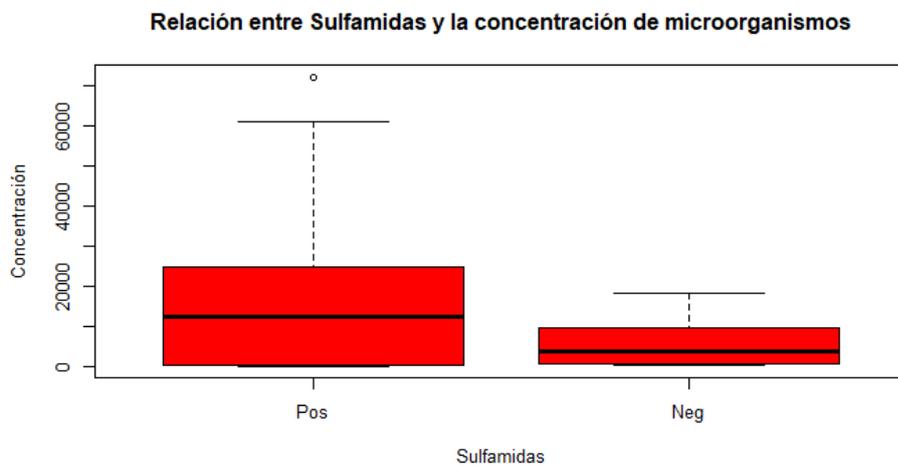
Elaboración por los autores

Ilustración 66. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la presencia o no de betalactámicos y la concentración de microorganismos



Elaboración por los autores

Ilustración 67. Resultados gráficos del R Studio sobre la relación entre la presencia o no de sulfamidas y la concentración de microorganismos



Elaboración por los autores

Este tipo de gráficos se los denomina gráficos de cajas y bigotes, donde la caja representan todos los datos desde el primer al tercer cuartil, incluyendo el 50% de datos más cercanos a la mediana; la línea negra representa la mediana de cada rango de datos; las líneas exteriores como la desviación estándar, el error esperado de las mediciones y los puntos por fuera de todo el conjunto son datos no esperados (atípicos).

Teniendo en cuenta que nuestra prueba solo determinó la existencia de la relación entre el tiempo con la concentración de microorganismos y, la relación de la presencia de betalactámicos con la concentración de microorganismos; tenemos que: en el gráfico de la relación entre el tiempo y la concentración de microorganismos se observan medianas diferentes en distintas posiciones determinando que para Nov2 el 50% de datos esta entre 0 UFC y 30000 UFC aproximadamente teniendo una mediana cercana al 0 y un dato máximo de 60000 aproximadamente, para Dic1 los datos son despreciables debido a que no hubo crecimiento en este tiempo determinado, para Dic2 la mediana se encuentra alrededor de las 15000 UFC teniendo datos entre las 13000 y 18000 UFC con un mínimo de aproximadamente de 8000 UFC incluyendo datos que podrían salir de los rangos establecidos, para Ene1 la mediana de este tiempo está alrededor del valor de 25000 UFC/ml y a partir de este valor el 50% de datos son superiores a este teniendo un máximo de 35000 UFC/ml aproximadamente y para Ene2 tenemos que la mediana tiene un valor de alrededor de 9000 UFC/ml y un rango de valores desde las 5000 UFC/ml a los 15000 UFC/ml con valores mínimo y máximo de 0 y 24000 UFC/ml. Como se observa los valores correspondientes a los tiempos de Dic2 y Ene1, al tener sus medianas con valores superiores a los demás tiempos, indican que en esos tiempos fue donde mayor fue la concentración de los microorganismos dado en UFC/ml.

Y en el gráfico de la Relación entre Betalactámicos y concentración de microorganismos, observamos que cuando la presencia de betalactámicos es positivo la mediana se encuentra en 0 UFC/ml y su rango es de 0 a 16000 UFC/ml aproximadamente con un valor máximo de 38000 UFC/ml y, cuando no existe presencia de betalactámico la mediana de concentración se encuentra en un valor de 15000 UFC/ml con un rango de datos entre 4000 y 27000 UFC/ml respectivamente,

con valores mínimo de 0 UFC/ml y máximo de 45000 UFC/ml, de esta manera se presenta una relación de forma inversa, ya que cuando no había presencia de betalactámicos se evidenció un mayor crecimiento de microorganismos y viceversa, concluyendo que las UFC dependen inversamente de la presencia de Betalactámicos, determinado también por las medianas obtenidas.

Para los demás gráficos se consideró que tras las pruebas no presentan mucha relación y son exentos de análisis, además como se observa sus medianas y rangos no cambian, no se evidencia mayor o menor crecimiento de microorganismos.

5.2 Discusión

Analizando los resultados de cada uno de los ríos notamos que en relación a condiciones ambientales como el pH y la temperatura; ambos ríos presentaron condiciones similares después de analizar los promedios de cada uno de los resultados obtenidos, mientras que con la conductividad hay una diferencia de 26.03 mS, siendo mayor la conductividad del río Pita. En cuanto a la presencia de antibióticos se evidenció que la presencia de betalactámicos en el río Pita es más frecuente en el intervalo de tiempo estudiado en comparación con el río San Pedro, siendo un referente la primera muestra tomada en el mes de enero, en el cual se presentó el betalactámico en el 100% de los puntos de muestreo, mientras que solo un 33% de puntos de muestreo del río San Pedro dieron positivos a la presencia de betalactámicos. En el caso de la presencia de sulfamidas en las aguas de los ríos en el intervalo de tiempo estudiado, se notó el mismo número de casos de puntos con muestras positivas con este antibiótico, sin embargo, en el primer muestreo de noviembre ya se presenta la diferencia de presencia de sulfamidas, siendo más frecuente en el río San Pedro con un 67% de las muestras positivas en comparación con el 25% de las muestras del río Pita y, en el primer muestreo de diciembre ocurrió

lo contrario ya que la presencia de sulfamidas en el río Pita fue más frecuente con un total de 50% de muestras positivas a diferencia del 11% de muestras del río San Pedro.

Los resultados demostraron que existen antibióticos en el agua de los ríos San Pedro y Pita, los resultados obtenidos son comparables a los valores de 36,5 y 50%, reportados por otros investigadores en la detección de betalactámicos en leche cruda y pasteurizada (Khaskheli, Malik, Arain, Soomro, & Arain, 2008). Mediante las pruebas realizadas con el kit se probó que, así como lee muestras de leche también es posible leer muestras de agua y es así que, después del estudio se detectó un 52,56% de antibióticos. La presencia de antibióticos conforme al estudio se pudo deber a la presencia de industrias aledañas a los ríos que tienen como efluente el cauce del río, además de que había zonas en las que existía actividad agrícola y demás actividades agroindustriales como elaboración de químicos afines a la agricultura, sin despreciar la existencia de efluentes domésticos y como una importante fracción de fármacos que son consumidos en grandes cantidades y variedad luego de su ingesta se excretan por el individuo a través de orina y heces, ingresando de manera continua y persistentes a las aguas residuales (Elorriaga, Carriquiriborde, & Ronco, 2012). Estudios sobre el consumo de fármacos en los países de la UE, se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (L. D. Barceló & López, 2012; Jones, Voulvoulis, & Lester, 2010). Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y entre los antibióticos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas (Dang, Zhang, Song, Chang, & Yang, 2007), como se han identificado también, omitiendo el hecho que no hubo presencia de tetraciclinas.

Con la curva de calibración elaborada se cuantificó la concentración de antibiótico tanto betalactámicos y sulfamidas. En un estudio se comprueba que los resultados obtenidos señalan que el porcentaje de recuperación, es de un 96%. El coeficiente de correlación (R^2) de la curva de calibrado es 0,9946 y el coeficiente de variación 1,86% (Aguilera, Herrera, & Ponce, 2010). Para nuestro caso fue un valor del coeficiente de correlación (R^2) de la curva de calibrado entre 0,9484 y 0,9648 valores cercanos para el método aplicado, donde se considera que para valores superiores a 0,95 son aceptables para el análisis y, considerar que el valor de R^2 es la varianza que existe o que explica la relación entre la variable independiente y la variable dependiente. El valor del coeficiente de correlación permite señalar una relación exponencial entre la concentración de y su área asociada de respuesta.

El crecimiento de microorganismos en uno de los casos se relacionaba inversamente a la presencia de betalactámicos ya que su detección implicaba que el crecimiento de microorganismos era mínimo o cero. Para la mayoría de las pruebas con microorganismos sensibles, el betalactámico se comporta como bactericida porque la concentración bactericida mínima (CBM), o la concentración mínima de antimicrobiano elimino el 99,9% de los microorganismos viables (Taroco, Seija, & Vignoli, 2008).

Al comparar con un estudio, en el que se detectó antibióticos y se observó un aumento notable de la carga de los mismos simultáneamente con una crecida del caudal del río, después de fuertes precipitaciones. Estas condiciones son favorables a la escorrentía, lo que puede resultar en aportes de antibióticos utilizados en la agricultura, ganadería y en descargas de aguas residuales no tratadas. El análisis del agua del río Sena en Francia, debido a que analizan los antibióticos en estudio y a su relación con las actividades humanas como agricultura e industrial se tomó en cuenta

para la comparación, presentando antibióticos en concentraciones que alcanzan 544 ng/l. En condiciones de pH de 7 y temperatura de 4°C (Tamtam et al., 2008). Concluyendo que a diferencia de nuestro caso, con datos de betalactámicos de $1,66 \times 10^{-4}$ mg/L a un valor de $1,24 \times 10^{-2}$ mg/L y de sulfamidas en un rango de $4,16 \times 10^{-5}$ mg/L a $8,74 \times 10^{-3}$ mg/L el valor obtenido es de alrededor de $5,44 \times 10^8$ mg/L, esto pudo deberse a la variación de temperatura, ya que en ambos ríos las actividades humanas e industriales eran realizadas comúnmente, sin descartar que el aumento de caudal también era debido a las precipitaciones propias de la época y, según las condiciones en las que se tomó las muestras, con una temperatura de 14°C a 26°C, existió un aumento de 22°C a diferencia del estudio en Francia, ya que como se explica en la relación de las ilustraciones 21, 23 y 25 sobre la temperatura y la presencia de antibióticos, la temperatura es un factor importante en el crecimiento de microorganismos. Esto también se ha discutido con respecto a valores máximas de concentraciones de los antibióticos presentes en aguas residuales en estudios realizados en Estados Unidos, para el caso de los betalactámicos se verificó el valor de la amoxicilina, la cual se encontró en un valor de 150 ug/l y para las sulfamidas como muestra la sulfametoxazol con una máxima concentración de alrededor de 2,8 ug/l (Kim & Aga, 2007; Kim, Jensen, Aga, & Weber, 2007; Morse & Jackson, 2003). Valores que para la comparación con nuestro estudio serían de: $1,50 \times 10^{-8}$ mg/L de betalactámicos y $2,8 \times 10^{-6}$ mg/L y, los valores de los resultados de los muestreos son de: $1,24 \times 10^{-2}$ mg/L de betalactámicos y $8,74 \times 10^{-3}$ mg/L de sulfamidas, cuya diferencia se debe a la cantidad de la muestra tomada ya que en el estudio de Estados Unidos se tomó una muestra de 0.1 mL (Kim et al., 2007; Morse & Jackson, 2003), mientras que para nuestra investigación se ocupó 1 ml de muestra, y al ser un crecimiento exponencial, la concentración no sigue una relación directa de

crecimiento, considerando que el único factor de diferencia de crecimiento es la cantidad de muestra.

La tarea de evaluar el impacto de las actividades humanas y las fuerzas antropogénicas en las frecuencias de presencia de los antibióticos en el medio ambiente es intrínsecamente compleja y difícil. En primer lugar, no hay datos de referencia de perfiles o patrones de presencia de los mismos en varios hábitats, al igual que el uso de antibióticos sin contar los fenómenos que pueden alterar a las áreas por ejemplo inundaciones, terremotos y otros eventos naturales que mezclan flora en el ambiente. No existe un ensayo estandarizado para evaluar la susceptibilidad o resistencia de las bacterias del medio ambiente (Esiobu, Armenta, & Ike, 2013).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El Kit AuroFlow™ es útil para la detección de antibióticos para muestras de agua, ya que, al ser probado en laboratorio se pudo interpretar y leer las muestras, determinando a su vez la presencia de antibióticos en el agua, por último, corroboramos su funcionalidad en el campo, determinando así los resultados obtenidos.

El estudio realizado en el tramo Uyumbicho – Sangolquí, indica que existe una gran cantidad de contaminación por materia orgánica, especialmente en las zonas donde existen centros poblados como Amaguaña, por donde el río San Pedro atraviesa la parroquia, al igual que en la Parroquia de Sangolquí que es atravesada por el río Pita, estos resultados se obtuvieron al analizar las siembras de microorganismos, que se realizaron en el laboratorio obteniendo la presencia de bacterias, que en su mayoría, solo se encuentra en la materia orgánica, debido a su crecimiento en los medios de cultivo que determinan dicha afirmación.

La capacidad que poseen los Ríos San Pedro y Pita de autodepuración, ayuda a la estabilidad en los niveles de contaminación de materia orgánica, considerando que los caudales de las aguas residuales van en aumento debido al incremento de la población en las zonas aledañas a los ríos como son las parroquias de Uyumbicho, Amaguaña y Sangolquí, además considerando la época invernal donde las precipitaciones aumentan también el cauce de los ríos.

Los casos positivos en las muestras con antibióticos se presentaron en mayor número a los derivados de betalactámicos, seguidos de sulfamidas y para las tetraciclinas no

se presentó ningún resultado, despreciándose así los cálculos según los resultados que se obtuvieron del kit AuroFlow™.

El número de casos positivos en los diferentes puntos o zonas de muestreo que fueron analizados, se presentó en el siguiente orden: con un total de 78 muestras analizadas 41 muestras dieron positivas de las cuales 36 casos fueron de residuos de antibióticos de betalactámicos y 13 casos de sulfamidas, considerando que en algunos casos en la misma muestra hubo los dos tipos de residuos de antibióticos, esto se pudo identificar con las tiras de medición del kit.

En los tres meses de muestreo se recolectaron y se analizaron las muestras de agua de los ríos, en la que existió mayor presencia de casos positivos, fue en el mes de enero con una cantidad de 16 casos positivos del total de 41 casos positivos para los tres meses de muestreos, el cual representa el 39% de las muestras positivas.

6.2 Recomendaciones

Profundizar cuál es el origen de los residuos de antibióticos betalactámicos y sulfamidas encontrados en los ríos San Pedro y Pita, tomando en cuenta la presencia de industrias, lubricadoras, madereras, industrias agrícolas y además de efluentes domiciliarios ubicadas en las orillas de los ríos.

Investigar si existe algún impacto negativo en la salud de seres humanos y animales, considerando que en la zona de estudio en las orillas del río San Pedro en la parroquia de Amaguaña se encontró un espacio considerado para la recreación (pesca deportiva), se deberá tomar en consideración toda la normativa vigente establecida en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente (TULSMA) con respecto a las áreas de recreación.

Realizar un análisis microbiológico identificando y aislando los diferentes microorganismos que se encuentran en los ríos, para de esta forma saber de qué manera influye en el comportamiento de los mismos ante la presencia de residuos de antibióticos.

Continuar con el estudio con la finalidad de recopilar la mayor cantidad de información, de ser posible crear una base de datos con esta información para estudios posteriores que se realicen en el mismo ámbito, para de esta manera poder realizar un tratamiento adecuado para optimizar la calidad del agua, y con esto también la calidad de vida de la población cercana a los ríos San Pedro y Pita mejorará.

7. BIBLIOGRAFÍA

- A.I.N.I.A. (2016a). Emerging issues in water and infectious disease. Retrieved from <http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/como-hacer-frente-a-los-contaminantes-emergentes-de-las-aguas-en-las-industrias-agroalimentarias/>
- A.I.N.I.A. (2016b). Restos de antibióticos en aguas: El problema de los contaminantes emergentes. Retrieved from <http://www.ainia.es/noticias/restos-de-antibioticos-en-aguas-el-problema-de-los-contaminantes-emergentes/>
- Águila Ramirez, R. N. (2012). Caracterización y bioactividad de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California, 167. Retrieved from <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/13459>
- Aguilera, C., Herrera, C., & Ponce, J. (2010). Implementacion, validacion y aplicacion de un nuevo metodo para la determinacion de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonideos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(2), 227–233. <https://doi.org/10.3856/vol38-issue2-fulltext-7>
- Amaguaña, G. (2013). ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL GAD PARROQUIAL DE AMAGUAÑA – D.M.Q, 1, 2015.
- APHA. (1970). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 15th ed. APHA. (1985); ISO 4833:2003.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 22 N°, XIV–XVI.
- Barceló, L. D., & López, J. (2012). Contaminación y calidad química del agua : el problema de los contaminantes emergentes.

- Burbano, N., Becerra, S., & Pasquel, E. (2015). Introducción a la Hidrogeología del Ecuador, 128. Retrieved from <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/promotion/inamhi-monitorea-las-24-horas-del-dia-este-parametro/>
- CIJUL. (2013). EL DERECHO A UN AMBIENTE SANO Y ECOLÓGICAMENTE EQUILIBRADO COMO DERECHO HUMANO DE TERCERA, 1–44.
- CultiMed. (2010). Manual Básico de Microbiología. *Cultimed*, 545.
- Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y., & Yang, G. (2007). Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2580–2592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03494.x>
- Daughton, C. G., Ternes, T. A., Environmental, S., Perspectives, H., Dec, S., & Ternes, A. (2014). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment : Agents of Subtle Change ?, *107*, 907–938.
- Dosal, M. A., & Villanueva, M. (2008). INTRODUCCIÓN A LA METROLOGÍA QUÍMICA:Curvas de calibración en los métodos analíticos. *Antología De Química Analítica Experimental*, 18–25. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf
- Doyle, M. (2006). Veterinary Drug Residues in Processed Meats Potential Health Risk. *A Review of the Scientific Literature. Food Research Institute.*
- Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2012). Contaminantes emergentes: productos farmacéuticos en el medio ambiente.

- Esiobu, N., Armenta, L., & Ike, J. (2013). International Journal of Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, (April 2013), 37–41.
<https://doi.org/10.1080/09603120220129292>
- Fernández, A. (2017). Contaminantes emergentes: ¿Cómo nos afectan? Retrieved from
http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/urbano/2017/12/05/225688.php
p
- Ferrer, I., & Thurman, E. M. (2012). Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1259, 148–157.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.059>
- Gimeno, E. (2001). El uso responsable de los antimicrobianos como moduladores de crecimiento. *Trabajo Comunicado a La Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria de La República de Argentina*, 1–30.
- Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Rumiñahui. (2014). Plan De Desarrollo Y Ordenamiento Territorial de Rumiñahui, 142.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial rural de Uyumbicho 2014 - 2019. (2015). *Actualización del Plan del desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia rural de Uyumbicho 2015 - 2019*.
- Henríquez-Villa, D. (2012). Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile, 138.

- Jackson, L., Reyes, L., & Cordiés, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *ACTA Médica*, 8(1), 13–27.
- Jones, O., Voulvoulis, N., & Lester, J. (2010). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment a Review, (November 2012), 37–41.
- Khaskheli, M., Malik, R. S., Arain, M. A., Soomro, A. H., & Arain, H. H. (2008). Detection of β - Lactam antibiotic residues in market milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(5), 682–685. <https://doi.org/10.3923/pjn.2008.682.685>
- Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 10(8), 559–573. <https://doi.org/10.1080/15287390600975137>
- Kim, S., Jensen, J. N., Aga, D. S., & Weber, A. S. (2007). Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. *Chemosphere*, 66(9), 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.066>
- Le Bizec, B., Pinel, G., & Antignac, J. P. (2009). Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8016–8034. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.007>
- Lozano, María. Arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia | Lozano A. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 121–135. Retrieved from <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324262/20781437>
- Márquez, L. (2008). Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y

desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9, 124–135.

Martín, D. C. (2010). Conceptos básicos. Clasificación de los Fármacos.

Nomenclatura de Fármacos. *Diseño y Síntesis de Compuesto Orgánicos Bioactivos*, 55–67.

Morse, A., & Jackson, A. (2003). Fate of a representative pharmaceutical in the environment, 35p.

Muñoz, A. (2017). ANTIBIÓTICOS EN EL SUELO. *Facultad de Farmacia, Universidad Complutense*.

NTE INEM 2117. (2013). NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 266 : 2013 Primera revisión, *First Edit*, 7–12.

Olea, F. (2016). Técnicas estadísticas aplicadas en nutrición y salud. Retrieved from <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/how-to/normality-test/interpret-the-results/key-results/>

Parral, C. A. (2017). Insectos podrían ser claves para producir antibióticos y biocombustibles. Retrieved from <http://www.vinv.ucr.ac.cr/es/noticias/insectos-podrian-ser-claves-para-producir-antibioticos-y-biocombustibles>

Patiño, D. (2013). ¿Por Que Las Bacterias Se Hacen Resistentes a La Accion De Los Antibioticos? *Umbral Científico*, 3, 48–56. <https://doi.org/ISSN-e 1692-3375>

Peña, M. E. (2006). *Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos basados en Nuevos Elementos para reconocimiento molecular para la determinación de Antibióticos β -lactámicos en muestras de interés Agroalimentario y Medioambiental*.

- Reig, R., & Toldrá, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 78, 60–67.
- Reig Riera, M. M. (2010). *Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos medicamentosos en animales de granja*.
<https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/8644>
- RStudio. (2016). RStudio Version 1.0.143. *Mozilla/5.0 (Windows NT 6.2; WOW64) AppleWebKit/538.1 (KHTML, like Gecko) Rstudio Safari/538.1 Qt/5.4.1*.
- Sánchez, M. (2004). Fármacos nacidos de plantas. Retrieved from
https://elpais.com/diario/2004/10/17/eps/1097994420_850215.html
- Scientific, B. (2018). Pruebas de tira de AuroFlow™. . PerkinElmer Company. © Copyright 2018 Bioo Scientific Corporation. 7050 Burleson Road, Austin TX, 78744 | 1-888-208-2246. Retrieved from
<http://www.biooscientific.com/Products-Services/Food-and-Feed-Products/AuroFlow-Strip-Tests-for-Rapid-Screening-of-Antibiotic-Residues-in-Milk>
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria (Tercera ed.)*. (M.-H. / I. DE MEXICO, Ed.). Retrieved from <https://www.casadellibro.com/libro-farmacologia-veterinaria-3-ed/9789701056967/1088975>
- Talero, V., Medina, O., & Rozo, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, 19(1), 11–28.
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>
- Tamtam, F., Mercier, F., Le, B., Eurin, J., Tuc, Q., Clément, M., ... Cedex, P.

(2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions, *93*, 0–11.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.009>

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, *36*(Cim), 663–671.

Toledo, M. (2017). SevenGo Duo™ pH / conductivity meter SG23.

Volfredo, J. (2010). Los antimicrobianos en la práctica médica. *Medicina Intensiva*, *272*.

8. ANEXOS

Anexo A: Toma de muestras, medición y conservación



Foto 1. Muestreo 1 río San Pedro, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 2. Muestreo 2 río San Pedro, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 3. Muestreo 1 río Pita, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 4. pH-metro, oxidímetro y el kit, Ramos-Chicaiza 2018



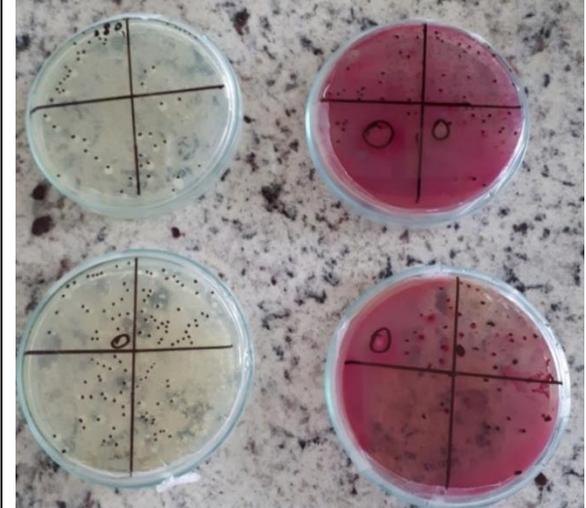
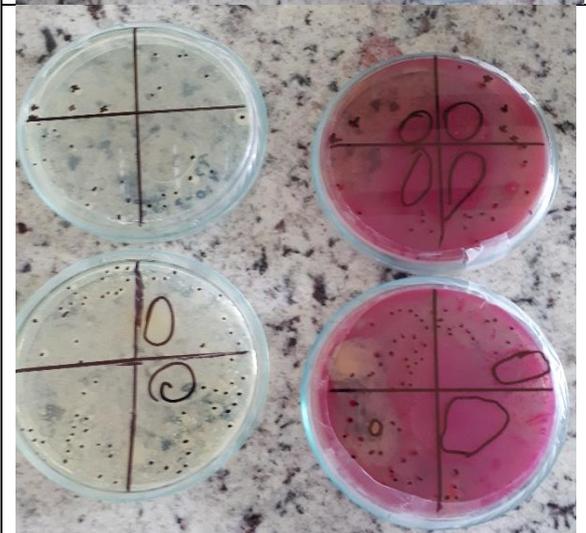
Foto 5. Recolección de la muestra, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 6. Uso de equipos para registrar datos, Ramos-Chicaiza 2018

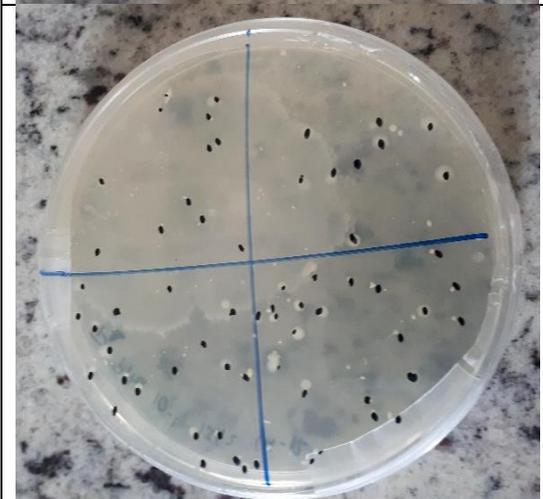
Anexo B

Anexo B1: Imágenes de las siembras de las muestras positivas de los ríos (mes Noviembre)

Imagen	Descripción
	<p>Imágenes correspondientes al mes de noviembre fecha 22 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} y 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de noviembre fecha 22 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 3 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} y 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>

	<p>Imágenes correspondientes al mes de noviembre fecha 22 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 4 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} y 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de noviembre fecha 22 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 3 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} y 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de noviembre fecha 22 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 8 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} y 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>

Anexo B2: Imágenes de las siembras de las muestras positivas de los ríos (mes Diciembre)

Imagen	Descripción
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 04 del 2017.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 04 del 2017.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 6 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 04 del 2017.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

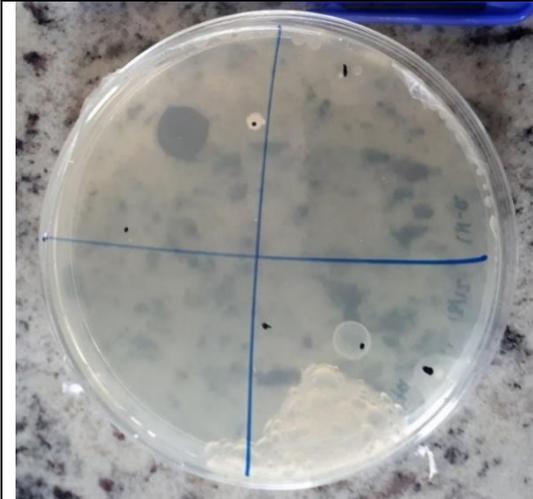
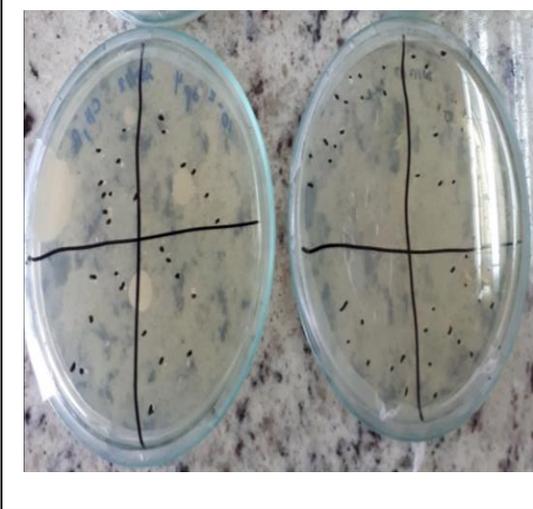
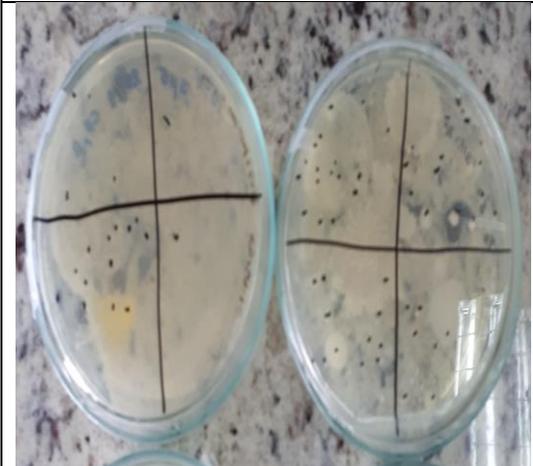
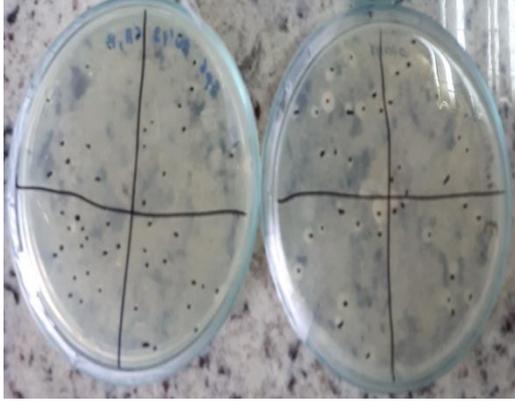
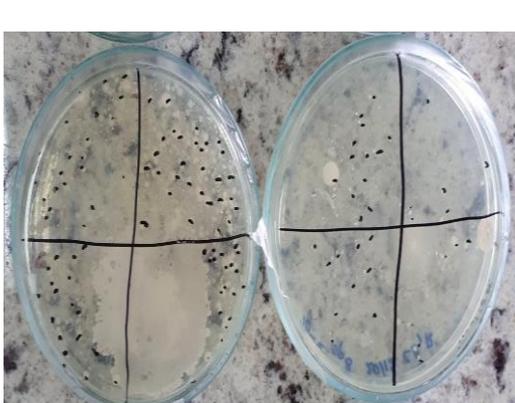
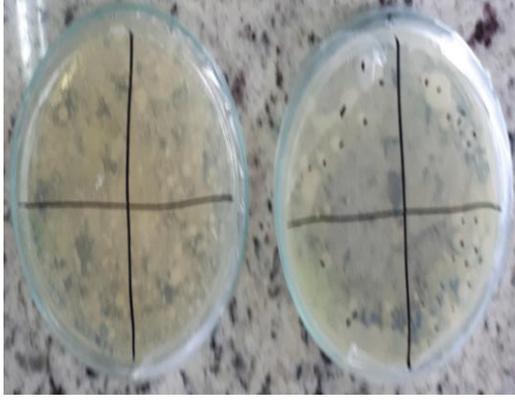
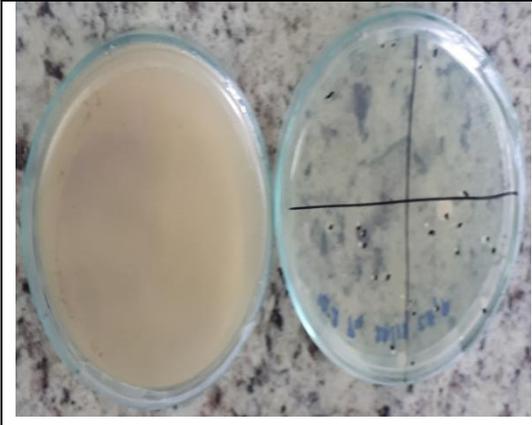
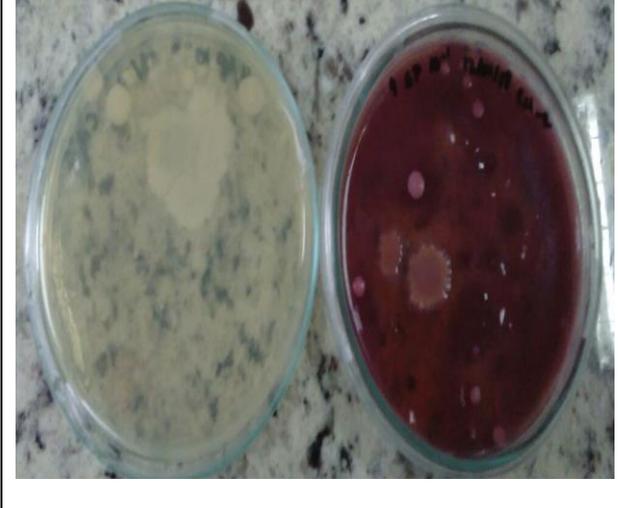
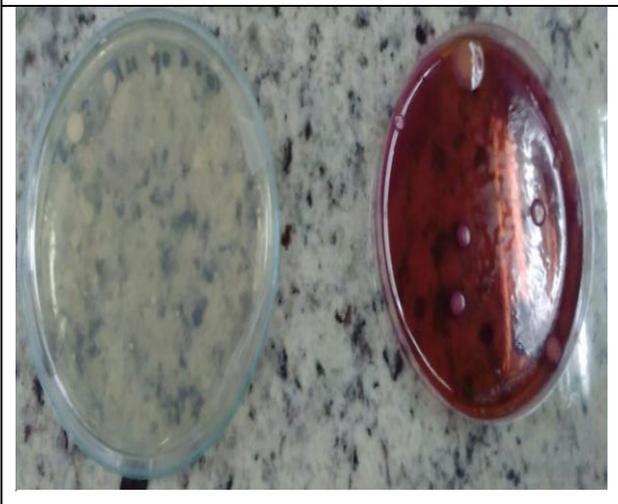
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 04 del 2017.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 4 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
---	--

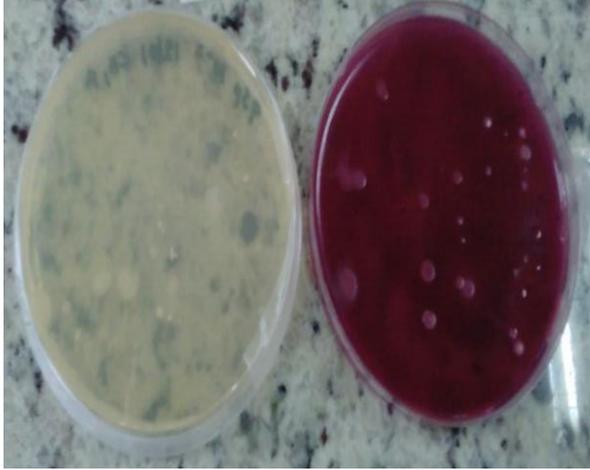
Imagen	Descripción
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 1 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 5 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 6 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 7 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 8 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

	<p>Imágenes correspondientes al mes de diciembre fecha 18 del 2017.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 4 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
---	--

Anexo B3: Imágenes de las siembras de las muestras positivas de los ríos (mes Enero)

Imagen	Descripción
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 4 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 6 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 9 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 1 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

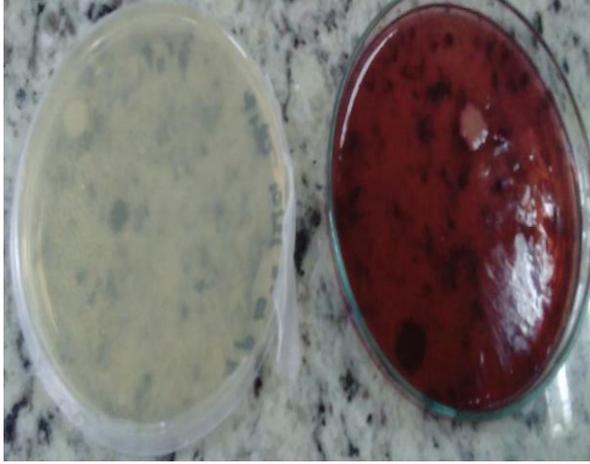
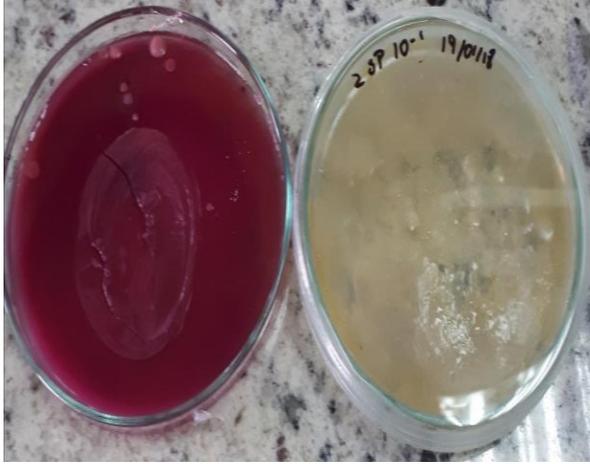
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 3 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>Punto número 4 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>

Imagen	Descripción
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 17 del 2018.</p> <p>2da. Muestreo.</p> <p>Punto número 2 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC.</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p>

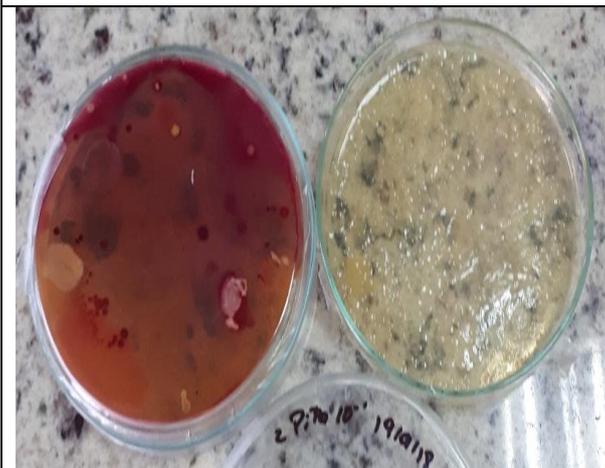
	<p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 3 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 5 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>
	<p>Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>Punto número 6 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}</p> <p>Método de cuadrantes para conteo UFC</p>



Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018. 2do. Muestreo.
 Punto número 7 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}
 Método de cuadrantes para conteo UFC



Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.
 2do. Muestreo.
 Punto número 9 Río San Pedro, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}
 Método de cuadrantes para conteo UFC



Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.
 2do. Muestreo.
 Punto número 2 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}
 Método de cuadrantes para conteo UFC

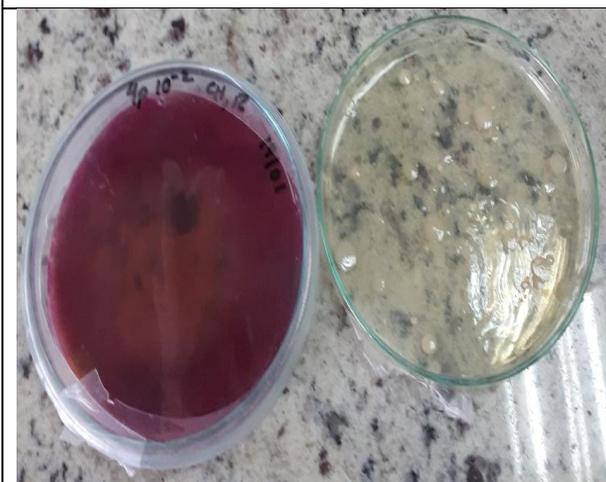


Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.

2do. Muestreo.

Punto número 3 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}

Método de cuadrantes para conteo UFC



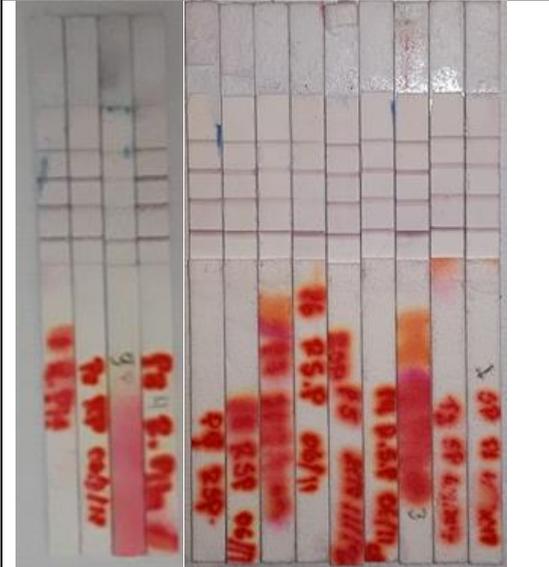
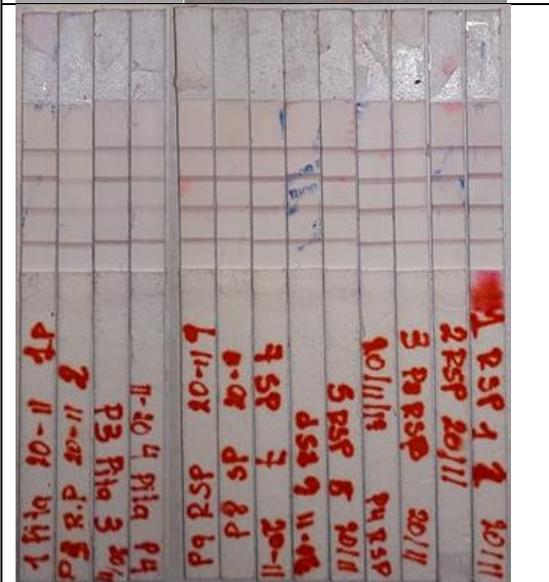
Imágenes correspondientes al mes de enero fecha 02 del 2018.

2do. Muestreo.

Punto número 4 Río Pita, representa las diluciones 10^{-1} 10^{-2}

Método de cuadrantes para conteo UFC

Anexo C: Imágenes de las tiras para análisis en R Studio

Imagen	Descripción
	<p>Foto 7 y 8. Imágenes correspondientes al mes de noviembre.</p> <p>1er. Muestreo.</p> <p>De derecha a izquierda: muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del río San Pedro y 4, 3, 2 y 1 del río Pita.</p>
	<p>Foto 9 y 10. Imágenes correspondientes al mes de noviembre.</p> <p>2do. Muestreo.</p> <p>De derecha a izquierda: muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del río San Pedro y 4, 3, 2 y 1 del río Pita.</p>
	<p>Foto 11 y 12. Imágenes correspondientes al mes de diciembre.</p> <p>3er. Muestreo.</p> <p>De izquierda a derecha: muestras 1, 2, 3 y 4 del río Pita y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del río San Pedro</p>

	<p>Foto 13 y 14. Imágenes correspondientes al mes de diciembre.</p> <p>4to. Muestreo.</p> <p>De derecha a izquierda: muestras 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1 del río San Pedro y 1, 2, 3 y 4 del río Pita.</p>
	<p>Foto 15 y 16. Imágenes correspondientes al mes de enero.</p> <p>5to. Muestreo.</p> <p>De derecha a izquierda: muestras 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 1 y 2 del río San Pedro y 1, 2, 3 y 4 del río Pita.</p>
	<p>Foto 17 y 18. Imágenes correspondientes al mes de enero.</p> <p>6to. Muestreo.</p> <p>De derecha a izquierda: muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del río San Pedro y 4, 3, 2 y 1 del río Pita.</p>

Anexo D: Procedimiento de laboratorio



Foto 19. Instrumentos de Siembra, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 20. Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , Ramos-Chicaiza 2018

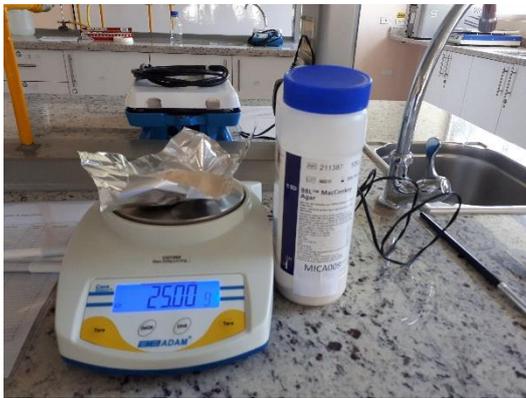


Foto 21. Peso Agar MacConkey, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 22. Agar MacConkey, Ramos-Chicaiza 2018

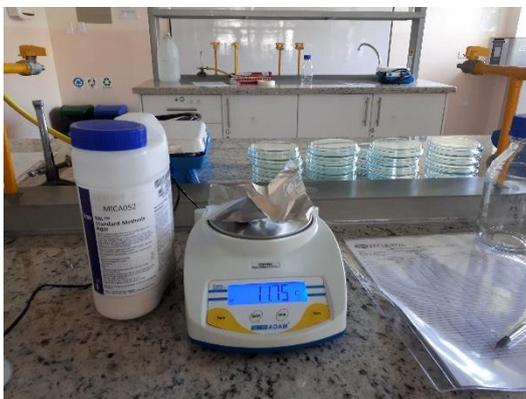


Foto 23. Peso Agar PCA, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 24. Agar PCA, Ramos-Chicaiza 2018

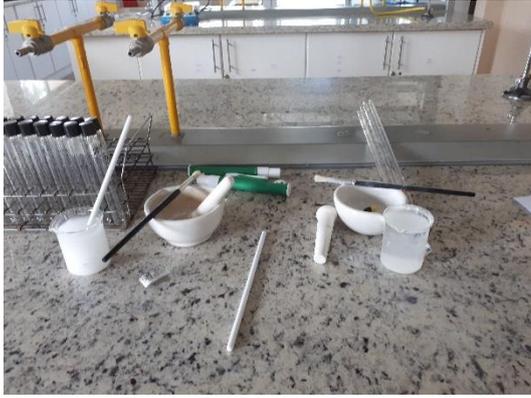


Foto 25. Blanco Bactrim, Amoxipen-t, Ramos-Chicaiza 2018



Foto 26. diluciones de los fármacos Ramos-Chicaiza 2018

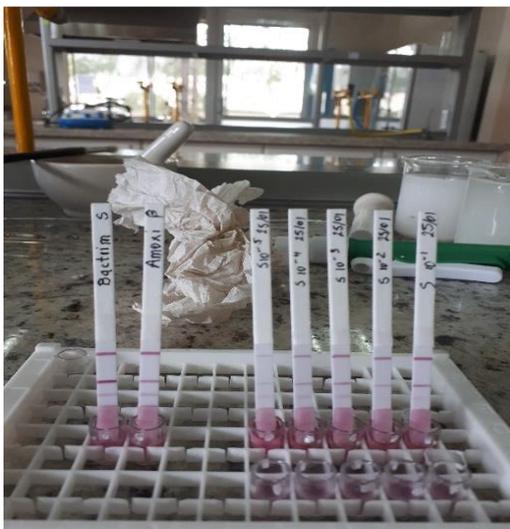


Foto 27. Blanco sulfamidas Ramos-Chicaiza 2018

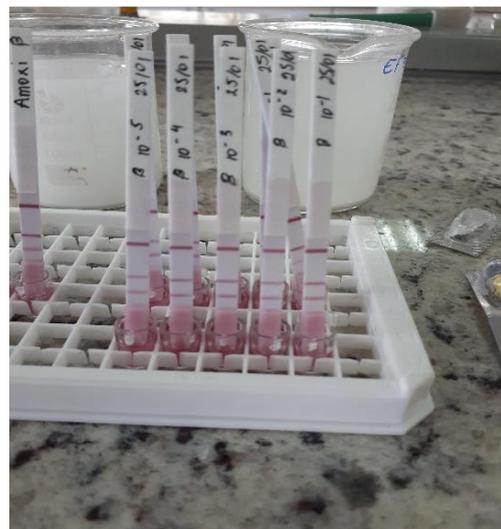


Foto 28. Blanco betalactámicos Ramos-Chicaiza 2018

Anexo E:

Composición de los agares utilizados en el proceso de laboratorio.

Agar MacConkey, composición:

Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

Lactosa..... 10,0 g Peptona (carne y caseína)3,0 g

Sales Biliares..... 1,5 g Peptona de Gelatina.....17,0 g

Rojo Neutro..... 0,03 g Sodio Cloruro.....5,0 g

Violeta Cristal..... 0,001 g Agar.....13,5 g

pH final: 7,1±0,2 (CultiMed, 2010).

Agar PCA, composición:

Fórmula (por litro)

Extracto de Levadura2,5 g

D (+)-Glucosa1,0 g

Triptona.....5,0g

Agar.....15,0 g

pH final: 7,0±0,2 (CultiMed, 2010).

Anexo F

Anexo F1: Datos de la programación y análisis de la muestra blanco para determinación de la curva de calibración.

```
> summary(R0)           > summary(G0)           > summary(B0)
      Blanco_B          Blanco_B          Blanco_B
Min.           90      Min.           94      Min.           138
1st Qu.        129     1st Qu.        152     1st Qu.           179
Median          139     Median          160     Median           192
3rd Qu.         162     3rd Qu.         180     3rd Qu.           207
Max.            188     Max.            204     Max.            221
NA's              0      NA's              0      NA's              0
```

Resultados de programación en R studio, presentando los datos estadísticos de los cuales solo se toma el valor de la media. Elaboración por los autores, 2018.

Anexo F2: Programación en R Studio para análisis de Pruebas de Normalidad

```
t<-factor(t,labels=c('Nov2','Dic1','Dic2','Ene1','Ene2'))
l<-factor(l,labels=c('San_Pedro','Pita'))
b<-factor(b,labels=c('Pos','Neg'))
s<-factor(s,labels=c('Pos','Neg'))
tabla <- data.frame(t,l,b,s,ufc)
attach(tabla)

#install.packages('nortest')
library(nortest)
x.test <- shapiro.test(ufc)
print(x.test)

y.test <- cvm.test(ufc)
print(y.test)

z.test <- ad.test(ufc)
print(z.test)

a.test <- lillie.test(ufc)
print(a.test)

b.test <- pearson.test(ufc)
print(b.test)
```

Programación en R studio, estableciendo etiquetas y las primeras pruebas de normalidad “x, y, z, a y b”. Elaboración por los autores, 2018.