

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE
Escherichia coli PROCEDENTES DE LA BAHÍA DE CARTAGENA**

ROBERTH EDUARDO CÁRDENAS CHIQUILLO



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

2018

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE
Escherichia coli PROCEDENTES DE LA BAHÍA DE CARTAGENA**

ROBERTH EDUARDO CÁRDENAS CHIQUILLO

**TRABAJO DE GRADO-PASANTIA DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MICROBIÓLOGO**

Tutores

KAREN LOPEZ SUAREZ

Investigadora. CIOH

Centro de investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe

ROSA MERCEDES BALDIRIS AVILA.

Docente. Universidad de Cartagena

ANGELA MARITZA CAJIAO PEDRAZA

Docente. Universidad de Pamplona

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

2018

NOTA DE ACEPTACIÓN

JURADO

JURADO

PAMPLONA NORTE DE SANTANDER; 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios, por brindarme la oportunidad de vivir, y regalarme toda la sabiduría, entrega y fortaleza en cada momento de vida.

Al Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe, en especial al área de protección al medio marino TN Natalia Burgos, Gisela, Jenny, Karen, Laura, y todo el equipo de trabajo, gracias por su confianza y brindarme el espacio adecuado para mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra. Rosa Baldiris, por permitirme trabajar en su grupo de investigación, brindándome su ayuda, apoyo y motivación para realizar este trabajo de grado.

A mis estimadas profesoras Angela Cajiao Pedraza y Liliana Rojas Contreras, gracias por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación y su confianza desde los inicios de la carrera, sus consejos y regaños me enseñaron la importancia de trabajar por pasión y no por obligación.

A mis compañeros de trabajo que se convirtieron en grandes amigos Emma, Jenny, Alejandra y Fabian; gracias por ser quienes en momentos de angustia y desesperación me brindaron su apoyo, gracias por los buenos momentos compartidos, los recordaré con mucho aprecio y cariño.

A mis compañeros del grupo de investigación en Microbiología Clínica y Ambiental, Natalí, Keidy, Bernardino, Marlon y Alfredo, quienes de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo; infinitas gracias por acogerme como parte de su grupo y brindarme todos sus conocimientos, apoyo y motivación.

A Estefanía, mi gran amigo Hussey Lorduy, Luismi, Jesus, Jessica, Lendys y Laura. Gracias por su compañía, amistad, amor y buenos consejos.

A mis padres y hermano, mi más grande motor para seguir adelante, su apoyo incondicional a lo largo de mi vida me ha permitido ver cuán grande es el amor de Dios por el regalo de la familia, gracias infinitas gracias por su amor y compañía.

A la familia Unipamplona y en especial a los profesores que aportaron en mi formación como Microbiólogo.

Infinitas gracias a todos!

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
1. OBJETIVOS.....	13
1.1. Objetivo general:.....	13
1.2. Objetivos específicos:.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. MARCO REFERENCIAL.....	16
3.1. Bases legales	16
3.2 Antecedentes.....	17
3.3. Sistema teórico.....	18
4. METODOLOGÍA	23
4. 1. Área de estudio.....	23
4. 2. Muestreo.....	24
4. 3. Confirmación, aislamiento y caracterización bioquímica	25
4. 4. Extracción, cuantificación, evaluación de pureza y calidad de ADN genómico.....	26
4.5. Identificación del gen <i>uidA</i> por PCR punto final.....	26
4.6. Evaluación de los filogrupos de <i>E. coli</i>	27
4.7. Evaluación de genes de virulencia por PCR punto final	27
4. 8. Electroforesis en gel de agarosa	28
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	30
6. RESULTADOS Y ANALISIS	31
6.1. Aislamiento, confirmación y caracterización fenotípica.....	31
6. 1. 1. Reactivación y confirmación en cepas de <i>E. coli</i> conservadas procedentes de playa Blanca, playa Marbella y el Laguito.....	31
6.2. Extracción, cuantificación, evaluación de la pureza y calidad de ADN genómico.....	36
6.3. Identificación del gen <i>uidA</i> por PCR punto final.....	38
6. 4. Evaluación de los filogrupos.	40

6. 5. Evaluación de genes de virulencia por PCR punto final	42
7. CONCLUSIONES	49
8. RECOMENDACIONES.....	51
9. GLOSARIO	52
10. BIBLIOGRAFIA	53
11. ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vías de contaminación en aguas marinas.	19
Figura 2. Distribución de filogrupos de <i>Escherichia coli</i> por PCR cuádruplex.	21
Figura 3. Factores de virulencia de <i>E. coli</i>	22
Figura 4. Estación marítima Antares.	23
Figura 5. Ubicación de las playas estudiadas en la Bahía de Cartagena Colombia; Superior Playa Marbella, Intermedia Playa laguito, Inferior Playa Blanca.	24
Figura 6. Confirmación de cepas de <i>E. coli</i>	31
Figura 7. Crecimiento de coliformes en 20 metros de profundidad.	32
Figura 8. Crecimiento en agar EMB de las cepas aisladas.	33
Figura 9. Pruebas de identificación morfológica y bioquímica.	34
Figura 10. Crecimiento en agar m-FC.	34
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico.	38
Figura 12. Electroforesis del gen <i>uidA</i>	39
Figura 13. Electroforesis de los genes <i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , TspE4.C2 para los filogrupos en <i>E. coli</i>	41
Figura 14. Factor de virulencia <i>eaeA</i> (Proteína de membrana).	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes para la detección y clasificación de los grupos filogenéticos en las cepas de <i>E. coli</i>	27
Tabla 2. Genes para la detección de factores de virulencia.	29
Tabla 3. Cronograma de actividades.	30
Tabla 4. Perfil bioquímico de las cepas aisladas.	33
Tabla 5. Concentración de ADN y relación según la absorbancia 260nm/280nm .	37

INTRODUCCIÓN

Colombia es el único país de Sur América que debido a su ubicación geográfica, cuenta con costas sobre el Océano Pacífico y el mar caribe, zonas de gran riqueza biológica, económica y cultural. La región Caribe colombiana actualmente es considerada como una de las más productivas en términos económicos y biológicos, ya que de ella depende el turismo y el transporte fluvial de mayor tráfico del país. En esta región se ubican cinco ciudades capitales de gran población como lo son: Barranquilla, Cartagena, Santa Marta, Riohacha y San Andrés (INVEMAR, 2007) las cuales se describen como zonas frágiles amenazadas por el riesgo de contaminación (Romero, 2017), asociado con el desarrollo industrial, la explotación de los recursos naturales, y el crecimiento de los asentamientos poblacionales (Echavarría & Villamizar, 2006). En Cartagena los problemas de contaminación fecal del agua de mar se agudizan por el aporte del canal del Dique que vierte aproximadamente el 7% del río Magdalena, gran efluente colombiano que recibe residuos de tipo industrial, comercial, agrícola y domiciliario (Abdel-Shafy & Aly, 2002). Por tanto, en los últimos años, estudios hidrológicos enfocados en la Bahía de Cartagena, el Canal del Dique y la cuenca del Río Magdalena, han buscado determinar los principales problemas de contaminación mediante la medición de parámetros como sólidos suspendidos totales (SST), turbidez, demanda biológica de oxígeno (DBO), clorofila, nutrientes, e indicadores microbiológicos como coliformes fecales y *Enterococcus* spp, encontrados por encima del umbral, lo que compromete la vida marina y la idoneidad recreativa de estas aguas (Tosic *et al.*, 2017).

En principio, las fuentes de contaminación del agua de mar varía de un lugar a otro (Colford, *et al.*, 2007), pero se reconoce que el escurrimiento superficial de aguas lluvias y la descarga de aguas residuales son unas de las principales vías de contaminación fecal de ambientes costeros responsables de la presencia de microorganismos patógenos (Vikas, & Dwarakish, 2015). Estimaciones indican que cada año más de 120 millones de casos de enfermedades gastrointestinales y enfermedades respiratorias en el mundo son causados por *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Campylobacter* spp., y *Pseudomonas* spp, presentes en agua de mar contaminadas con aguas residuales (Shuval, 2003). Por ende, se definen dos parámetros microbiológicos como base para la clasificación del agua de mar en cuatro categorías: excelente calidad, buena calidad, suficiente y baja, con referencia a la abundancia de Enterococos intestinales y *Escherichia coli* (Fleisher *et al.*, 1996).

E. coli representa un riesgo de salud pública ya que se considera responsable de causar infecciones del tracto gastrointestinal, respiratorio, vías urinarias, y enfermedades en la piel, ojos y cavidad nasal (W.H.O, 2003). Logrando ser clasificada como: cepas comensales, patógenas intestinales y patógenas extraintestinales (Lamprecht *et al.*, 2014).

E. coli a pesar de ser una bacteria entérica, el ciclo biológico de este microorganismo ha involucrado ambientes diferentes al tracto intestinal, colonizando hábitats secundarios, como agua, sedimento y suelo (Williams, Avery, Killham & Jones, 2005), en los cuales resisten condiciones extremas de temperatura, poca cantidad de nutrientes, presión osmótica, radiación solar, entre otros. La respuesta frente a ello se da gracias a las adaptaciones fisiológicas y genéticas de este microorganismo, lo que amplía su capacidad patogénica (Ishii & Sadowsky, 2008). Su comportamiento patogénico está relacionado con la expresión de genes de virulencia, implicados en la adhesión, invasión y evasión de los mecanismos de defensa del hospedero (Carlos *et al.*, 2010). Hamilton *et al.*, (2010), reportan cepas potenciales de EPEC (*E. coli* enteropatógena) en la Bahía Avalon, debido a la presencia del gen de virulencia *eaeA* (proteína intimina que favorece la adhesión microbiana). Martínez, Villalobos y Castillo, (2015), demostraron la presencia de los genes de virulencia *eae*, *bfp*, *ipaH*, *virF*, *Sxt1*, *Sxt2* asociados con los patótipos enteropatógeno, shigatoxigénico y enteroagregativo de *E. coli* en agua marina recreacional, que genera un riesgo para los bañistas que acuden a estas playas.

Por ende, debido a su importancia desde una perspectiva clínica y ambiental, se han desarrollado diferentes técnicas para identificar y clasificar a *E. coli* en cepas patógenas y no patógenas (Gordon, Clermont, Tolley, & Denamur, 2008). A partir del año 2013, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha demostrado que las cepas de *E. coli* se dividen en 7 grupos (A, B1, B2, C, D, E y F) y clado I (Walk *et al.*, 2009), del cual se obtiene información acerca de su nicho ecológico y patogenia, relacionado con la presencia de factores de virulencia, lo que ha permitido comprender la relación de las cepas de *E. coli*-hospedero y el potencial de causar enfermedades (Morcatti *et al.*, 2015).

Sin embargo, los estudios reportados acerca de la presencia de *E. coli* en agua de mar y sus factores de virulencia, son escasos, por ende, con el fin de reconocer la importancia de *E. coli*, como indicador de contaminación fecal y su papel en la incidencia de enfermedades intestinales y extraintestinales en el ambiente, la

presente investigación se basó en la caracterización bioquímica y genética de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de la Bahía de Cartagena.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general:

- Caracterizar bioquímica y genéticamente aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de la Bahía de Cartagena.

1.2. Objetivos específicos:

- Aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *Escherichia coli*, aisladas en la Bahía de Cartagena.
- Determinar genotípicamente cepas de *Escherichia coli* mediante la amplificación del gen *uidA*.
- Establecer los filogrupos de las cepas de *Escherichia coli* procedentes de la Bahía de Cartagena.
- Determinar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes de virulencia *fimH*, *KpsMTII*, *fyuA*, *papAH*, *PAI*, *eaeA*, *Stx1* y *Stx2* en cepas de *Escherichia coli* procedentes de la Bahía de Cartagena.

2. JUSTIFICACIÓN

Dos tercios de la tierra está cubierta por agua y el 99,7% de esta se encuentra contenida en los 5 océanos, siendo un recurso importante no sólo por la variedad de organismos que viven en ella (Caruso, 2013), sino también por ser una fuente de alimento, empleo, recreación, y defensa de diversos desastres naturales provocados por el hombre (Stewart *et al.*, 2008). Shuval (2003), afirma que alrededor del 50% de la población mundial vive en zonas costeras a menos de 100 km. Por ello, el impacto de las acciones antropogénicas cada vez es más evidente, y actividades como la acuicultura, el transporte marítimo, el turismo, la extracción de petróleo, el desarrollo urbano e industrial disminuyen la calidad de vida de las personas y aumenta la probabilidad de enfermedades intestinales como diarreas (acuosas y sanguinolentas) y extraintestinales como infección del tracto urinario, meningitis y neumonía (Islam & Tanaka, 2004).

Cartagena, como ciudad costera posee uno de los puertos y zonas industriales más importantes y grandes del país, por tanto no es ajena a los problemas ambientales que son evidentes en las aguas de la Bahía de Cartagena y zonas aledañas a ella. Tosic *et al.*, (2017), definen a la bahía de Cartagena “*como un punto caliente de contaminación*”, que diariamente recibe grandes descargas de agua dulce a través del Canal Dique junto con otras aguas industriales y residuales domésticas no tratadas por parte de la población costera, los cuales contienen microorganismos patógenos que pueden infectar tanto al hombre como a los animales marinos. Islam y Tanaka (2004), reporta la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp y *Escherichia coli* en mamíferos como focas y cetáceos. Al igual también se reporta, el consumo de mariscos contaminados, la ingesta accidental de agua de mar y la exposición directa de heridas como puerta de entrada de los principales agentes de las enfermedades infecciosas que se derivan del agua de mar (Flandroy *et al.*, 2018). Así mismo, cuanto mayor sea la contaminación de las aguas residuales y la exposición de animales y humanos, mayor será el riesgo de contraer infecciones (Islam & Tanaka, 2004).

Dentro de la diversas comunidades microbiana, *E. coli* es uno de los microorganismos más estudiados en todo el mundo, útil como modelo genético y metabólico para la dilucidación de rutas, pero también como responsable de enfermedades entéricas y extraintestinales; debido a su capacidad de adaptación al ambiente, y atribución de factores de virulencia innatos y adquiridos (Kaper, Nataro & Mobley, 2004).

Gracias a los avances de la biología molecular de los últimos años, diferentes herramientas permiten estudiar la naturaleza de los microorganismos. La distribución de los filogrupos en cepas de *E. coli*, está relacionada con su virulencia, ya que permite inferir su carácter patogénico con base a su asignación a un grupo filogenético, que puede estar relacionado con las características accesorias diferenciales de cada cepa, llamadas factores de virulencia (Johnson & Russo, 2002); encargados de adherirse, lesionar e invadir las células y los tejidos; evitando a toda marcha el mecanismo de defensa del hospedero y estableciendo el comportamiento virulento (Johnson, 2003).

A nivel ambiental y más específicamente en el campo de la microbiología marina acoplada a técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden abordar investigaciones sobre identificación y patogenicidad bacteriana en microorganismos presentes en agua de mar (Thakur *et al.*, 2008). En Colombia, las investigaciones relacionadas con el aislamiento y caracterización de aislados ambientales de *E. coli* procedentes de ecosistemas acuáticos marinos contaminados aportan información novedosa y necesaria para el conocimiento relacionada con la distribución de los grupos filogenéticos y la presencia de factores de virulencia en cepas de *E. coli*. La mayoría de las investigaciones que se desarrollan en el país se enfocan al análisis de muestras clínicas y su deducción en la producción de enfermedades intestinales y extraintestinales. A pesar de la implicación ambiental y clínica de las infecciones de *E. coli* se debe considerar, el estudio de los reservorios no clínicos de esta bacteria y sus factores de virulencia (Mokracka, Koczura, Jabłońska, & Kaznowski, 2011), dado el potencial turístico y ambiental de Cartagena, con el fin de describir y predecir los cambios ambientales poblacionales; para disminuir del riesgo de contaminación de las personas y promover conservación del ecosistema marino (Pulido, Torres & Prieto, 2005).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Bases legales

Este proyecto de investigación se ajusta a las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en temas relacionados con la salud y el medio ambiente establecidas en la resolución Número 8430 de 1993, dictaminada por el ministerio de salud.

Para este estudio no se exige la aprobación del comité de ética, debido a que se trabajó con muestras de agua de mar, analizadas en laboratorio de categoría básica de Microbiología de la Universidad de Cartagena y del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe, con un grupo de riesgo nivel I.

A nivel marítimo, en el Decreto 1875 de 1979, se dictan normas sobre la prevención de la contaminación del medio marino y otras disposiciones; se establece en el artículo 1°.

Artículo 1°. Se entiende por contaminación marina, la introducción por el hombre, directa o indirecta de sustancias o energía en el medio marino cuando produzca o pueda producir efectos nocivos, tales como daños a los recursos vivos y a la vida marina, peligros para la salud humana, obstaculización de las actividades marítimas, incluso la pesca y otros usos legítimos del mar, deterioro de la calidad del agua del mar y menoscabo de los lugares de esparcimiento (Decreto 1875, 1979, p.1).

En Colombia el Decreto 1594 de 1984, reglamenta el uso y manejo de aguas superficiales, subterráneas, marinas y estuarinas, establece las destinadas para actividades de contacto primario poseen una concentración límite de Coliformes totales de 1000 Numero Más Probable/100 mL y para Coliformes fecales el límite de la calidad admisibles es de 200 NMP/100ml, en cuanto para las actividades de contacto secundario se establece un límite admisible inferior a una concentración 5000 NMP/100 ml para Coliformes totales.

De igual forma, en el Decreto 5057 de 2009, establece en el Artículo 6°, numeral 1;

Artículo 6°. Son funciones del Centro de Investigaciones Oceanográficas del Caribe (CIOH) y del Centro de Investigaciones Oceanográficas del Pacífico (CCCP), dentro de la jurisdicción asignada a cada uno, las siguientes:

Numeral 1. Estudiar y ejecutar proyectos de investigación y evaluación de fenómenos oceanográficos, hidrográficos y de contaminación marina, de acuerdo con los programas de la Dirección General Marítima (Decreto 5057, 2009, p.6).

3.2 Antecedentes

Hamilton *et al.*, (2010), determinaron la composición genómica por asignación filogenética y la frecuencia de genes de virulencia toxina Shiga (*Stx1/Stx2*), intimina (*eaeA*) y enterotoxinas (*ST/LT*) presentes en *E. coli* aislados de agua de mar en la Bahía Avalon, isla Santa Catalina, California. Hallaron, que el 3,6% de las muestras contenía el gen *eaeA*, posible cepas potenciales de EPEC (*E. coli* entero patógena), pertenecientes a los grupos filogenéticos B1 y B2. La amplificación los genes *Stx1/Stx2*, fue ausente en el 100% de las muestras, a diferencia del gen de la intimina (*eaeA*) que varió entre 0 y 11,8%. Los resultados de este estudio demostraron que las cepas EPEC potenciales pueden encontrarse en el agua marina de playa y su presencia debe ser estudiada en consideración como factor para la toma de decisión relacionada con el cierre de la playa.

Jang *et al.*, (2014), establecieron los factores ambientales que afectan a los grupos filogenéticos de *E. coli* en agua de río de la provincia de Jeonnam, Corea del Sur. Según el análisis filogenético se encontró que de 3.480 cepas de *E. coli* la presencia de los grupos A 49,5%(1.724), B1 34,3%(1.192), B2 10,8% (376) y D 5,4%(188). A sí mismo, se determinó que las diferencias de distribución de los grupos filogenéticos entre las poblaciones de *E. coli* en distintos ambientes pueden ser causadas por la adaptabilidad genómica y la versatilidad de las cepas de *E. coli* que pertenecen a cada grupo filogenético.

Viana (2015), caracterizó 99 cepas de *E. coli* aisladas de agua de mar, en tres regiones costeras con diferentes niveles de contaminación en el estado de Sao Paulo, Brasil. La clasificación en grupos filogenéticos según la metodología propuesta por Clermont 2013. Se encontró que los aislamientos de *E. coli* se distribuyeron en los todos los filogrupos permitiendo una mejor distribución de las cepas de *E. coli* con la asignación en los nuevos grupos E, C, F y clado I, predominando los grupos filogenéticos A y D, cepas comensales de origen humano y animal.

Moritzky, Frost & Heard (2016), a partir de muestras de arena de Playa, en Carolina del Sur, determinaron los orígenes de *E. coli* por PCR cuádruplex, y detección de factores de virulencia para los genes *Stx1*, *Stx2* y *eaeA*. Encontraron que las cepas de *E. coli* se distribuyeron en los filogrupos A y B1, indicando que es probable que las cepas del grupo A provengan de contaminación fecal humana y que las cepas del grupo B1, de heces de animales domesticados y / o salvajes; además de esto se detectó la presencia del gen *Stx2* en todas las muestras de arena, a excepción de los genes *Stx1* y *eaeA*, el cual codifica para la expresión de la toxina Shiga.

Gomez *et al.*, (2010), evaluaron la prevalencia de patógenos intestinales como *E. coli* en la ciudad de Sincelejo y Cartagena. Mediante confirmación fenotípica, bioquímica y molecular por amplificación del gen *uidA* específico para la enzima β -D-glucuronidasa, encontrando que el 14.4% de todos los aislamientos de *E. coli* se asociaban a patótipos intestinales y que la mayoría de ellos pertenecían a los grupos filogenéticos A y B1.

3.3. Sistema teórico

Los océanos, son considerados centros de importancia biológica debido a su productividad; en él desencadenan vientos periódicos los cuales inciden sobre la superficie del mar generando corrientes superficiales y subsuperficiales las cuales tienen efecto directo sobre el transporte de desechos, materia orgánica, sustancias químicas y microorganismos, desde las costas hacia las zonas más internas de los océanos, alterando las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la columna de agua (García, Franco, Ramírez & López, 2010).

La liberación de *E. coli* en el medio marino (**Figura 1**) a través de aguas residuales y ríos contaminados es preocupante desde el punto de vista ecológico y recreativo, debido al riesgo para la salud humana y de los ecosistemas.

La presencia de *E. coli* y de microorganismos entéricos en ambientes marinos es producto de interacciones entre procesos físicos, biológicos y bioquímicos, relacionado con el rápido crecimiento de la población y sus actividades, las cuales aumentan dramáticamente la contaminación fecal (Pommepuy *et al.*, 2005).

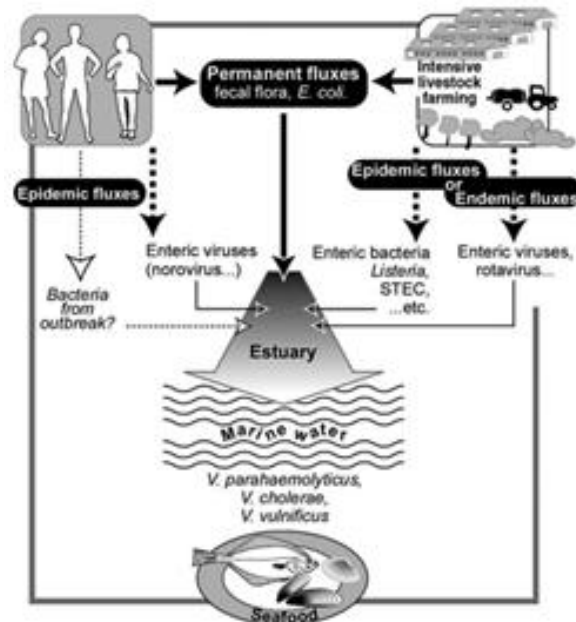


Figura 1. Vías de contaminación en aguas marinas.

Fuente: Pommepuy *et al.*, 2005.

E. coli se utiliza clásicamente como indicador de contaminación fecal en el agua debido a que se encuentra como comensal en la capa mucosa del colon. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, oxidasa negativo, que fermenta la lactosa a 44°C por acción de la enzima β -galactosidasa, produciendo ácido y gas dentro de 24-48 horas; además de ello posee la enzima β -D-glucuronidasa codificada por el gen *uidA*, capaz de generar una respuesta fenotípica y genética, mediante la hidrólisis del 4-metilumbeliferil β -D-glucuronido (MUG) que al romperse expresa fluorescencia bajo luz ultravioleta; reacción ligada a la expresión del gen que codifica para la enzima en mención (Lasalde, Rodriguez, Toranzos, & Smith, 2003).

E. coli a pesar de ser una bacteria entérica, el ciclo biológico de este microorganismo ha involucrado ambientes diferentes al tracto intestinal, colonizando hábitats secundarios, como agua, sedimento y suelo (Williams, Avery, Killham & Jones, 2005), en los cuales resisten condiciones extremas de temperatura, poca cantidad de nutrientes, salinidad, radiación solar, entre otros. La respuesta de *E. coli* frente a ello se da gracias al metabolismo heterotrófico que le proporciona cierta versatilidad para utilizar fuentes simples de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros oligoelementos para su crecimiento (Díaz, Ferrández, Prieto & García, 2001).

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, las cepas patógenas pueden ser responsables de una variedad de infecciones en las que se destacan estos tres síndromes clínicos: enfermedad entérica/diarreica, infecciones de las vías urinarias (ITU) y sepsis/meningitis (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004).

La diferencia entre *E. coli* comensal y patógena se basa en la expresión de múltiples factores de virulencia los cuales incluyen adhesinas, toxinas, sideróforos, formación de biopelículas, cápsula con acción antifagocítica, que contribuyen en conjunto para potenciar su patogenicidad (Sanchez, 2011), y a su vez permiten identificar los mecanismos por los cuales causan enfermedad (Mainil, 2013).

Clermont, Christenson, Denamur & Gordon (2000), elaboraron una estrategia para la asignación filogenética de *E. coli* basada en reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica utilizó un set de tres marcadores: *chuA* y *yjaA*, los cuales cumplen la función de sideróforo y respuesta al estrés de *E. coli* al peróxido de hidrogeno, cadmio, y ácido (Lee, Hiibel, Reardon, & Wood, 2010), y un tercer fragmento denominado TSPE4.C2 ligado a un gen putativo de esterase lipasa (Gordon *et al.*, 2008), permitieron la asignación filogenética en cuatro grupos A, B1, B2, y D.

Años después, Clermont, Christenson, Denamur & Gordon (2013), reorganizaron la técnica modificando las secuencias nucleotídicas de los cebadores para aumentar la especificidad y evitar el polimorfismo en el proceso de hibridación, además de ampliar la posibilidad de detectar nuevos grupos filogenéticos (Clermont, Gordon, Brisse, Walk, & Denamur, 2011), subdivididos en 7 grupos A, B1, B2, C, D, E y F (**Figura 2**). Se mantiene el mismo principio propuesto en el año 2000, pero con la diferencia de un nuevo y cuarto gen *arpA*, convirtiendo la

técnica en PCR cuádruplex. Este gen actúa como un control interno de la calidad del DNA, pero también permite la identificación de cepas pertenecientes al grupo filogenético F, anteriormente identificadas como grupo D (Clermont, Bonacorsi, & Bingen 2004). Esta relación filogenética ha demostrado que las cepas de *E. coli* extraintestinales virulentas pertenecen al grupo B2 y D, mientras que las comensales están asociadas con el grupo A y B1 (Carlos *et al.*, 2010).

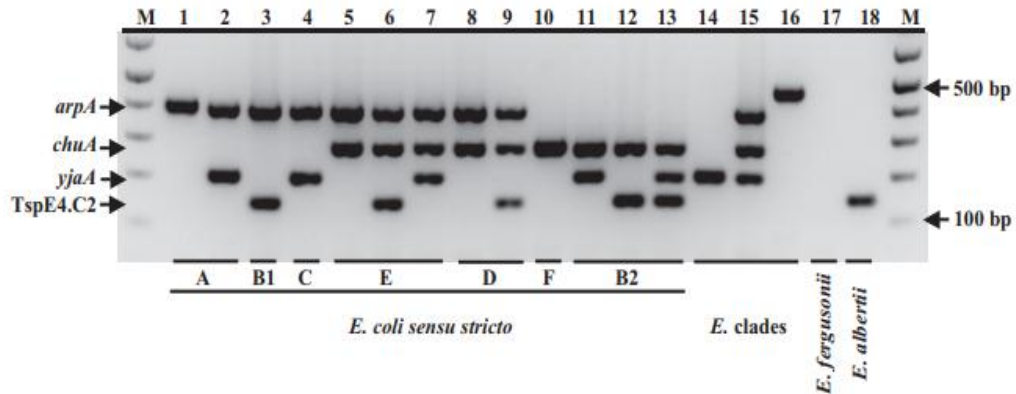


Figura 2. Distribución de filogrupos de *Escherichia coli* por PCR cuádruplex.

Fuente: Clermont *et al.*, 2013.

La importancia clínica y ambiental de asignar filogenéticamente los aislamientos parte del vínculo establecido entre el grupo filogenético y la virulencia (Johnson & Stell, 2000).

Las cepas que hacen parte de estos grupos filogenéticos poseen diferencias en cuanto a la presencia de factores de virulencia, resistencia a antibióticos y nichos ecológicos (Gordon *et al.*, 2008). A su vez, también se ha demostrado que el límite entre *E. coli* comensal y *E. coli* patógena se relaciona con la presencia de genes que codifican factores de virulencia. Estos últimos se definen como mecanismos propios de cada microorganismo responsable de causar distintos tipos enfermedades intestinales y extraintestinales generados por la expresión de múltiples genes de virulencia que incluyen toxinas, recubrimientos superficiales y receptores de superficie, entre otros (Johnson & Russo, 2002).

La virulencia se refiere a la capacidad del organismo para causar enfermedad a pesar de los mecanismos de defensa del huésped (Picard *et al.*, 1999). Entre ellos se encuentran: cápsula polisacárida específica del grupo II encargada de las infecciones extraintestinales (*kpsMTII*) y mediación de la interacción bacteria-entorno, adhesina fimbria tipo 1, sensibles a la manosa e implicada en la invasión de las células epiteliales de la vejiga codificada por el gen *fimH*, fimbria P resistente a la manosa y responsable de septicemias de origen urinario codificada por el gen *papAH*, marcador de isla de patogenicidad que codifican genes para factores de movilización, tales como integrasas, transposasas, o partes de elementos de inserción expresadas por el gen *PAI*, sideroforos encargados de la captación del hierro e implicado en la patogenicidad, codificada por el gen *fyuA* (Johnson & Russo, 2002), y por último, la expresión de la toxina Shiga de los subgrupos *Stx1* y *Stx2*, y la proteína de membrana externa (*eaeA*-intimina) de la bacteria responsable de la adherencia bacteriana en *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) (Farfán, Ariza, Vargas & Vargas, 2016).

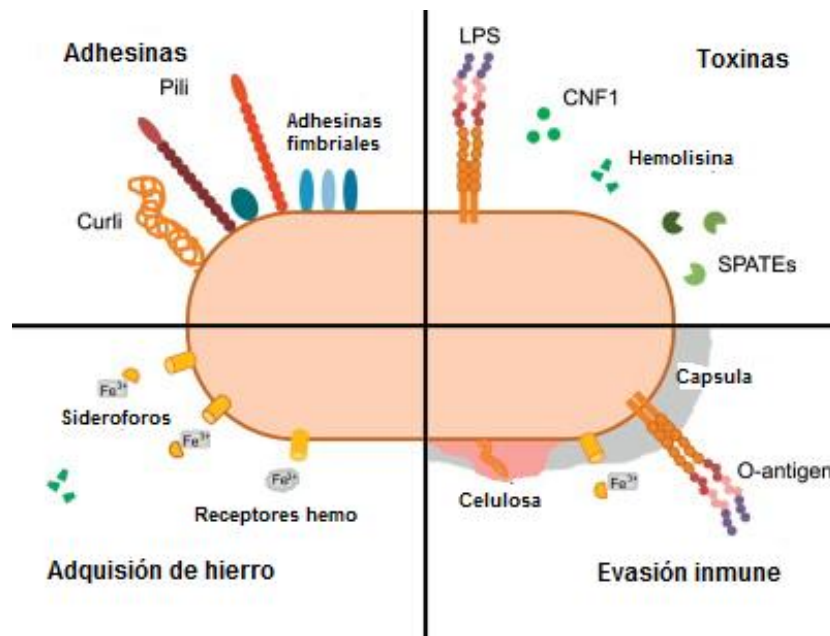


Figura 3. Factores de virulencia de *E. coli*.

Fuente: Lüthje, P., & Brauner, A. (2014)-Modificado.

4. METODOLOGÍA

4. 1. Área de estudio

La estación marítima Antares se encuentra localizada a 10 millas náuticas de distancia de la costa oeste de Tierra Bomba en Cartagena/ Colombia. El muestreo fue desarrollado a bordo del buque oceanográfico ARC “Malpelo” y es realizado periódicamente por CIOH del Caribe, como representante de Dimar (Dirección general marítima) ante la Red Internacional de Monitoreo Antares.



Figura 4. Estación marítima Antares.

Fuente: Google Earth, 2018.

La bahía de Cartagena de Indias es una bahía del Caribe Colombiano que se encuentra ubicada al noroccidente de Colombia, posee dos bocas por los cuales se efectúa el intercambio de aguas con el medio oceánico: Bocagrande, ubicada en el extremo nororiental, la cual tiene una longitud de 1,9 km y una profundidad promedio de 2 m, y Bocachica ubicada al suroccidente, con 0,5 km de longitud y una profundidad promedio de 23 m (Tosic *et al*, 2017). El muestreo a las playas pertenecientes a la Bahía de Cartagena, playa Blanca, Marbella y el Laguito; fueron realizadas con anterioridad por el Grupo de Investigación en Microbiología Clínica y Ambiental (MCyA) de la Universidad de Cartagena.

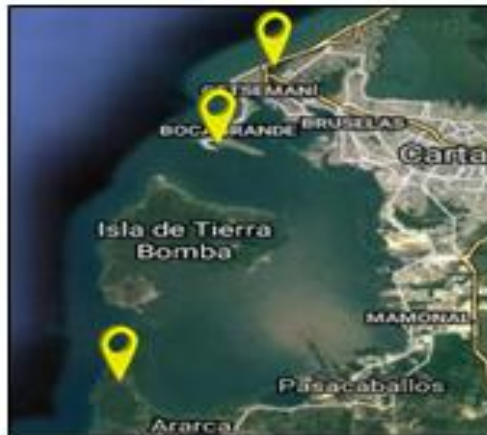


Figura 5. Ubicación de las playas estudiadas en la Bahía de Cartagena Colombia; Superior Playa Marbella, Intermedia Playa Laguito, Inferior Playa Blanca.

Fuente: Google Earth, 2018.

4. 2. Muestreo

Se realizó un muestreo en la Estación Marítima Antares, a 6 profundidades de la columna de agua 5, 10, 20, 30, 40, 50 metros respectivamente, teniendo en cuenta criterios como clasificación de los ecosistemas marinos, concentración de oxígeno, presión y salinidad, reportados por la literatura.

La muestra de agua oceánica fue tomada en la estación Antares con una botella Niskin de tipo vertical, con capacidad de 5 litros. Para las muestras microbiológicas se utilizaron botellas SCHOTT estériles de 500 ml. Todas las muestras se refrigeraron a 4°C durante el transporte al laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe y el laboratorio de Microbiología Clínica y Ambiental (GIMCA) de la Universidad de Cartagena, donde se realizaron los análisis respectivos.

4. 3. Confirmación, aislamiento y caracterización bioquímica

4. 3. 2. Reactivación y confirmación en cepas de *E. coli* conservadas

Debido a que el muestreo de las playas pertenecientes a la Bahía de Cartagena, playa Blanca, Marbella y el Laguito; fueron realizadas con anterioridad por el Grupo de Investigación en Microbiología Clínica y Ambiental (GIMCA) de la Universidad de Cartagena. Un total de 8 cepas presuntivas para *E. coli* se reactivaron en Agar nutritivo a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}/24$ horas, para lo cual se verificó la morfología por tinción de Gram y confirmación de colonias de color negro azulado con brillo verde metálico en agar Eosina azul de metileno (EMB, Levine Britania), a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para la (Khanfer, Al-Awadhi, & Radwan, 2017).

4. 3. 1. Aislamiento y caracterización bioquímica de *E. coli* en agua oceánica de la estación marítima Antares

Para la determinación de *E. coli* en agua de mar oceánica se realizó mediante la técnica de filtración por membrana según lo establecido por el Estándar Métodos Edición 22nd, donde se filtró un volumen de 100 ml de agua de cada muestra, utilizando filtros de nitrato de celulosa con tamaño del poro de $0.45\ \mu\text{m}$. Una vez filtrado el volumen de agua el filtro se colocó en agar selectivo m-Endo LES (Merck Millipore) incubando a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (APHA, 2012).

Pasado el tiempo de incubación, se realizó lecturas de las colonias características en agar m-Endo LES (colonias rojas oscuras con brillo verde metálico), las cuales fueron subcultivadas en agar eosina azul de metileno (EMB) hasta purificación y sembradas en agar nutritivo, para la caracterización por tinción de Gram, crecimiento en agar m-FC (Merck Millipore), y pruebas bioquímicas tales como caldo Lauril Triptosa, caldo BRILA (Verde brillante-Bilis-Lactosa, Merck Millipore) con campanas de Durham a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}/48\text{h}$, citocromo Oxidasa (CO), β -galactosidasa (Disco-ONPG), caldo EC-MUG con campanas de Durham (Merck Millipore) $44.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; caldo triptófano (Merck Millipore) y crecimiento en citrato $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ (Merck Millipore) (APHA, 2012).

Las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922 (APHA, 2012) y *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, se utilizaron como controles positivos y negativos conforme requerimiento del procedimiento de la técnica de filtración por membrana y cumplimiento de aseguramiento de la calidad.

4. 4. Extracción, cuantificación, evaluación de pureza y calidad de ADN genómico

Los aislamientos fueron inoculados en 1 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI, Becton Dickinson) a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}/16\text{-}18\text{h}$ en agitación constante (Van, Degener & Harmsen, 2011). El ADN genómico fue extraído acuerdo con las instrucciones del fabricante para la aplicación del Kit DNA genómico ISOLATE II-Bioline.

La concentración y pureza de ADN fue determinada por espectrofotometría en el equipo NanoGenius Spectrofotometer (Thermo Scientific™ GENESYS™ UV-Vis spectrophotometer), usando como indicador la relación de absorbancias A260 y A280. La integridad del ADN, se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y fotografiados con un transiluminador de luz ultravioleta (PhotoDoc-It™ Imaging Systems), utilizando el marcador de peso molecular de 1000 pb DNA (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, EEUU) para identificar el tamaño de los productos amplificados (Baena Del Valle, Ramos Moreno, Gómez Alegría, & Gómez Camargo, 2013).

4.5. Identificación del gen *uidA* por PCR punto final

Para detectar la presencia del gen *uidA* que codifica para la enzima β -D-glucuronidasa (**Tabla 1**). Se realizó una mezcla de PCR en un volumen final de 25 μL que contenían: 2 μL de tampón 10X (Thermo Fisher Scientific), 2 unidades de Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 2mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 2 μL de ADN (aproximadamente 50-100 ng/ μL) y 20 μmol de cada oligonucleótido, en el Termociclador Aeris-BG096 – Esco. Las condiciones de la PCR fueron: 95°C (5 minutos), 95°C (30 segundos), 67°C (30 segundos), 72°C (30 segundos), 72°C (5 minutos) x30 ciclos (Gómez *et al*, 2010).

4.6. Evaluación de los filogrupos de *E. coli*

La asignación filogenética (A, B1, B2, C, D, E, F) se llevó a cabo según la presencia y/o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, *arpA*, (**Tabla 1**) *ArpAgpE*, *trpAgpC* y *trpBA* según Clermont *et al.*, 2013. Se realizó una PCR cuádruplex, donde se incluyeron los oligonucleótidos *chuA.F*, *chuA.R*, *yjaA.F*, *yjaA.R*, *TspE4.C2.F*, *TspE4.C2.R*, *AceK.F* y *arpA1R*. El ciclo de programación se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización 95°C (5 minutos), 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 59°C (30 segundos), 70°C (30 segundos) y una etapa de extensión final de 72°C (10 minutos). Los cebadores utilizados para los alelos específicos del filogrupo E son *ArpAgpE.F*, *ArpAgpE.R*, para el filogrupo C *trpAgpC.F*, *trpAgpC.R*. El ciclo de programación de PCR es el mismo que el anterior con la única excepción que la temperatura de alineamiento es de 57°C, además para las reacciones de PC para los filogrupos E y C, se utilizan los cebadores *trpBA.F* y *trpBA.R* para proporcionar un control interno.

Tabla 1. Genes para la detección y clasificación de los grupos filogenéticos en las cepas de *E. coli*.

Gen	Cebadores	Tamaño (pb)	*Secuencia5'-3'.	Referencia
<i>uidA</i>	<i>uidAF</i> <i>uidAR</i>	508	GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT	Gomez <i>et al.</i> , 2016.
<i>arpA</i>	<i>AceK.fF</i> <i>ArpA1R</i>	400	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	Clermont <i>et al.</i> , 2013.
<i>chuA</i>	<i>chuAF</i> <i>chuAR</i>	279	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGA	
<i>yjaA</i>	<i>yjaAF</i> <i>yjaAR</i>	211	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>TspE4.C2</i>	<i>TspE4C2F</i> <i>TspE4C2R</i>	152	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	

*EurofinsGenomics. Fuente: Autor.

4.7. Evaluación de genes de virulencia por PCR punto final

Se estudió la presencia de 8 genes de virulencia, por PCR punto final, los cuales incluyeron: cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), adhesina de la fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papAH*), marcador de isla de patogenicidad (*PAI*),

yersiniabactina (sideróforo *fyuA*), producción de la toxina Shiga (*Stx1* y *Stx2*) e intimina (*eaeA*). La evaluación genes de virulencia fueron analizados siguiendo la metodología propuesta por Johnson & Stell, (2000); para lo cual se realizó una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 2 µl ADN molde, 4 mM de MgCl₂, 0,8 mM de 4 dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 0,6 mM de cada primer y 2,5 unidades de Taq Polimerasa (Thermo Fisher Scientific),. El ciclo de programación para los primeros 5 genes (*KpsMTII*, *fimH*, *papAH*, *PAI* y *fyuA*) (**Tabla 2**) consistió en: Desnaturalización inicial de 95°C(10 minutos), 25 ciclos a 94,7°C (30 segundos), 63,7°C (30 segundos), (68,7°C, 3 minutos) y una extensión final 72°C (10 minutos).

Para los 3 genes *Stx1*, *Stx2* y *eaeA* (**Tabla 2**); las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 95 °C (3 minutos), 35 ciclos a 95 °C (20 segundos), 58 °C (40 segundos), y 72 °C (90 segundos), ciclo final de extensión de 72 °C (5 minutos), en una mezcla de 25 µl (Fagan, Hornitzky, Bettelheim, & Djordjevic, 1999).

4. 8. Electroforesis en gel de agarosa

En todos los ensayos, los productos amplificados se revelaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y fotografiados con un transiluminador de luz ultravioleta (PhotoDoc-It™ Imaging Systems). Se utilizó el marcador de peso molecular de 1000 pb DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific para identificar el tamaño de los productos amplificados (Baena Del Valle, *et al.*, 2013).

Tabla 2. Genes para la detección de factores de virulencia.

Gen	Cebadores	Tamaño (pb)	*Secuencia5'-3'.	Referencia
<i>KpsMTII</i>	<i>KpsMTIIF</i> <i>KpsMTIIR</i>	272	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
<i>FimH</i>	<i>fimHF</i> <i>fimHR</i>	508	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	Johnson, James R y Stell Adam L, 2000
<i>papAH</i>	<i>papAHF</i> <i>papAHR</i>	720	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	
<i>PAI</i>	<i>PAIF</i> <i>PAIR</i>	930	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	
<i>fyuA</i>	<i>fyuAF</i> <i>fyuAR</i>	880	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
<i>Stx1</i>	<i>Stx1F</i> <i>Stx1R</i>	614	ACACTGGATGATCTCAGTGG CTGAATCCCCCTCCATTATG	Fagan, Hornitzky, Bettelheim y Djordjevic, 1999.
<i>Stx2</i>	<i>Stx2F</i> <i>Stx2R</i>	779	CCATGACAACGGACAGCAGTT CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
<i>eaeA</i>	<i>eaeAF</i> <i>eaeAR</i>	890	GTGGCGAATACTGGCGAGACT CCCCATTCTTTTTACCGTCCG	

*EurofinsGenomics. **Fuente:** Autor.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 3. Cronograma de actividades.

ACTIVIDADES	Feb		Mar				Abr				May				Jun	
	I	II	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II
I. Inducción al CIOH.																
II. Apoyo al laboratorio, SGC, ensayos, capacitaciones y reuniones (Anexo)																
III. Revisión bibliográfica.																
III. Muestreo.																
IV. Aislamiento, reactivación y caracterización de las cepas bacterianas.																
V. Extracción, cuantificación, evaluación de pureza y calidad de ADN genómico																
VI. Identificación del <i>uidA</i> y evaluación de los grupos filogenéticos.																
VII. Evaluación de genes de virulencia por PCR punto final																
VIII. Preparación de informes.																
VIII. Entrega de informes CIOH.																
VIV. Entrega de informes académicos.																

I, II, III, IV: Semanas. Fuente: Autor.

6. RESULTADOS Y ANALISIS

6.1. Aislamiento, confirmación y caracterización fenotípica

6. 1. 1. Reactivación y confirmación en cepas de *E. coli* conservadas procedentes de playa Blanca, playa Marbella y el Laguito

Las 8 cepas de *E. coli* aisladas y conservadas de playa Blanca, playa Marbella y el Laguito presentaron la morfología macroscópica y microscópica característica de *E. coli* en agar nutritivo y en agar EMB, la cual se describe como bacilos cortos Gram negativos, y colonias de centro azul oscuro y/o negro con brillo verde metálico (El-Hadedy, & El-Nour, 2012) (**Figura 6**).

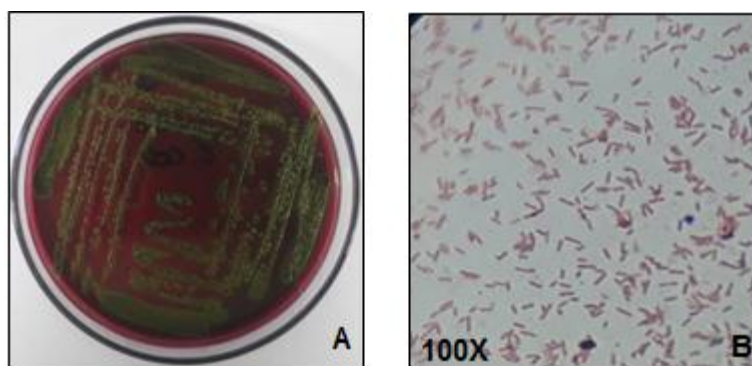


Figura 6. Confirmación de cepas de *E. coli*.

A. Morfología característica de *E. coli* en agar EMB (Colonias oscuras con verde brillo metálico), **B.** Bacilos Gram negativos. 100X. **Fuente:** Autor.

6. 1. 2. Aislamiento y caracterización bioquímica de *E. coli* en agua de mar de la estación marítima Antares

En las profundidades muestreadas a 5, 10 20, 30, 40, y 50 metros en agua oceánica (Estación Antares) se obtuvo crecimiento de 4 colonias presuntivas a 20 metros de profundidad (**Figura 7**).

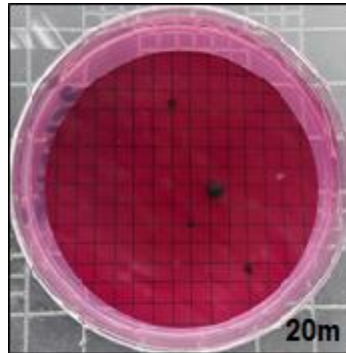


Figura 7. Crecimiento de coliformes en 20 metros de profundidad.

Colonias rojas oscuras con brillo verde metálico. **Fuente:** Autor.

Registro del recuento de colonias presuntivas para *E. coli*, según la técnica de filtración por membrana.

$$\text{Colonias presuntivas: } \frac{4 \times 100}{100 \text{ mL}} : 4 \frac{\text{UFC}}{100} \text{ mL de agua de mar oceánica.}$$

(Formula 1)

La purificación de las colonias en agar EMB (**Figura 8**) y la caracterización bioquímica recomendada por el Estándar Métodos (Citrato (-), Caldo BRILA (+), Caldo Lauril triptosa (+), Triptofano (+), Oxidasa (-), EC-MUG (Crecimiento +), (Gas +), (Fluorescencia +) (**Figura 9**), permitió establecer el perfil bioquímico aproximado de cepas aisladas.

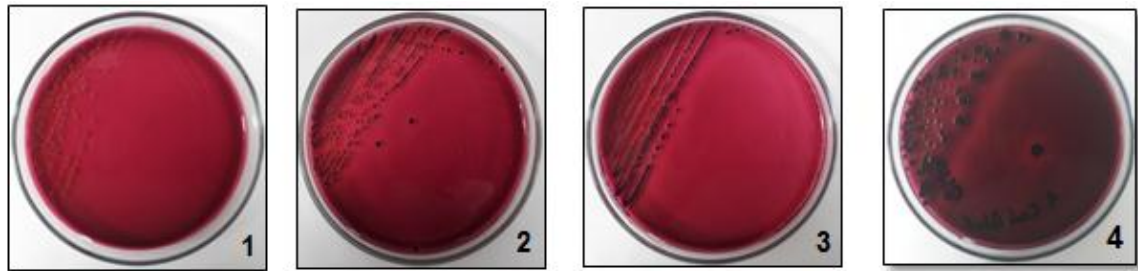


Figura 8. Crecimiento en agar EMB de las cepas aisladas.

1. Colonias rosadas de borde irregular; 2. Colonias con centro oscuro, periferia incolora y borde regular; 3. Colonias oscuras mucosas, 4. Colonias oscuras con borde regular. **Fuente:** Autor.

Tabla 4. Perfil bioquímico de las cepas aisladas.

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>E. coli</i> (Estándar Métodos, 22Ed)	1	2	3	4
Citrato	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
Caldo brilla	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Caldo Lauril triptosa	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Triptofano	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
EC-MUG	(+),(+),(+)	(-),(-),(-)	(+),(+),(+)	(+),(+),(-)	(+),(+),(-)
Porcentaje de afinidad	100%	33,33%	100%	66,7%	50%

Fuente: Autor.

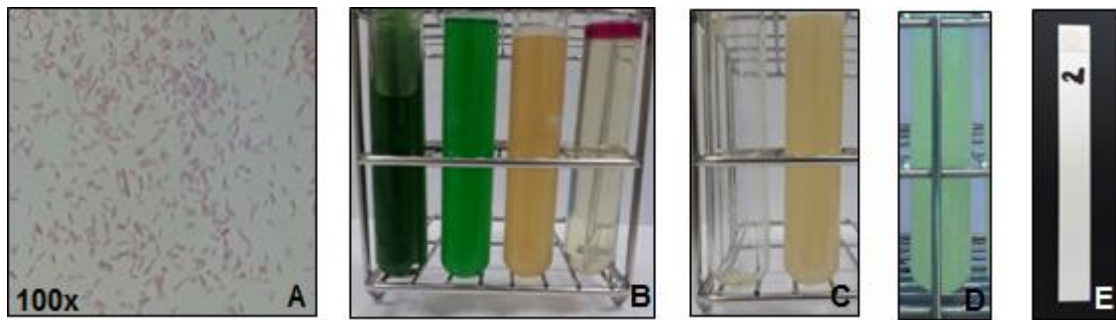


Figura 9. Pruebas de identificación morfológica y bioquímica.

Imágenes de izquierda a derecha. **A.** Tinción de Gram: Bacilos, Gram Negativos 100X; **B.** Citrato (-), Caldo BRILA (++) , Lauril triptosa (++) , Triptófano (+); **C.** Disco de ONPG (+), EC-MUG (++) ; **D.** EC-MUG (+), **E.** Oxidasa (-). **Fuente:** Autor.

El crecimiento en agar m-FC (selectivo para *E. coli*) de las cepas purificadas, se obtuvo crecimiento característico de *E. coli* en la colonia 2, este medio posee azul de anilina el cual actúa como indicador de pH, los coliformes fecales en especial *E. coli*, por su actividad fermentadora de lactosa, acidifican el medio generando colonias azules, mientras que los no fermentadores darán colonias grises a cremas; color característico presentado en la cepa 1, a diferencias de las cepas 3 y 4, inhibidas completamente; así mismo el subcultivo de la cepa 2, confirmó el crecimiento satisfactorio en el agar en mención (**Figura 10**).

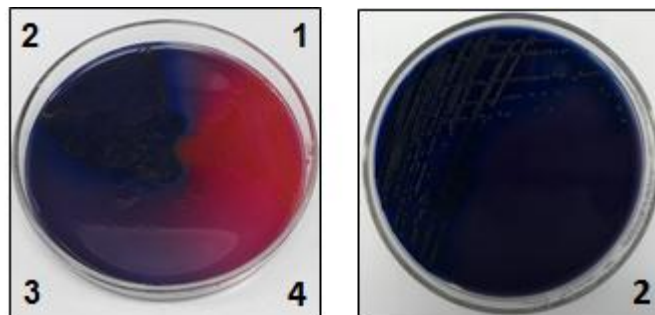


Figura 10. Crecimiento en agar m-FC.

A. Siembra múltiple de las colonias aisladas; **B.** Crecimiento selectivo-cepa 2. **Fuente:** Autor.

La identificación de cepas de *E. coli* según las pruebas bioquímicas establecidas en el Estándar métodos Edición 22, permitió caracterizar por su actividad metabólica las cepas aisladas. Se encontró que la cepa 2, cumple en un 100% con las 6 características bioquímicas evaluadas. La prueba de citrato mostró un resultado negativo en la cepa 2, esta prueba evalúa la capacidad del microorganismo para utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento, indicando la ausencia y/o presencia de proteínas de transporte del citrato (Jesumirhewe *et al.*, 2016). La fermentación de lactosa en caldo BRILA y Lauril triptosa, reaccionaron positivamente, indicando la utilización de este carbohidrato por vía fermentativa. Las enterobacterias de tipo coliforme de la cual hace parte *E. coli* se caracterizan por fermentar la lactosa y producir ácido y gas, a diferencia de otros microorganismos no coliformes, no fermentadores como *Salmonella* spp y *Yersinia* spp (Hervert, Martin, Boor, & Wiedmann, 2017). El test de Indol, para la diferenciación de *E. coli* de otros microorganismos, se usa frecuentemente para distinguir bacterias entéricas indol-negativa entre ellas *Klebsiella* spp y *Shigella* spp, debido a que el 96% de *E. coli* se considera positiva para esta reacción (Rezwan, Lan, & Reeves, 2004). La determinación de la enzima β -D Glucuronidasa (GUD), mediante la utilización del sustrato incoloro 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), se utiliza para la identificación de *E. coli* en muestras de agua, este microorganismo es capaz de hidrolizarlo, produciendo un compuesto fluorogénico (Bain *et al.*, 2015). A partir de este principio se logra diferenciar otras bacterias entéricas como *Shigella* spp, y *Yersinia* spp, que poseen la enzima GUD pero no producen fluorescencia (Entis, & Boleszczuk, 1990).

Además de ello, la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) recomienda el uso del agar m-FC, un medio selectivo y diferencial para enumeración de coliformes fecales por la técnica de filtración por membrana, en aguas; su selectividad se debe a las sales biliares y a la temperatura de incubación de 44,5 °C, en donde los coliformes fecales crecen como colonias azules, mientras que las colonias rosadas son de otras enterobacterias, esto permite la diferenciación entre *E. coli* (Colonias azules oscuras) con crecimiento satisfactorio a 44°C y microorganismos como *Enterobacter aerogenes* (Colonias de color crema), observado en la **figura 10** en este estudio.

La presencia de *E. coli* y de otros microorganismos entéricos, es un indicativo de que en el agua de mar de las playas analizadas y la estación Antares están siendo sometidas a fuentes de contaminación fecal. El crecimiento de *E. coli* en 20 metros de profundidad, se debe a las mareas generadas por los vientos Alisios en los primeros meses del año, en donde se considera que el viento por su continuidad y velocidad, favorece el intercambio profundo y completo de las aguas de la bahía y

áreas cercanas a esta, lo anterior, permite establecer dos aspectos importantes, primero, la presencia de *E. coli* como indicador de contaminación fecal en la estación marítima Antares procedentes de aguas contaminadas depositada en la bahía y en la Isla Tierra Bomba como territorio cercano a la estación en mención. Y segundo, la adaptación de las bacterias entéricas como *E. coli* al estrés en el agua de mar implicando procesos de osmoregulación bacteriana para su supervivencia (Munro Gauthier, Breittmayer & Bongiovanni 1989).

6.2. Extracción, cuantificación, evaluación de la pureza y calidad de ADN genómico

En total 12 cepas fueron sometidas al proceso de extracción de ADN, 8 procedentes de las tres islas anteriormente mencionadas y 4 aisladas de la Estación Marítima Antares.

La extracción de ADN genómico de las cepas mediante el kit de extracción ISOLATE II-Bioline, mostró una concentración variable representada en un rango entre 1,227 y 4,023 µg/ml, con una pureza mayor a 1,8 leídos en el espectrofotómetro (NanoGenius Spectrofotometer).

Se encontró que 7 (58,33%) de las cepas evaluadas se encuentra en el rango de 1,8-2,0; y que 5 (41, 66%) de ellas se encuentra mayor a 2,0 y menor 2,2 (**Tabla 5**).

Las relaciones entre 1.8 y 2.0 para A260 / A280 se aceptan como indicadoras de ADN de buena calidad en cuanto a pureza (Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017); Olson, N. D., & Morrow, J. B., 2012). En realidad, este rango es variable ya que otros autores recomiendan intervalos de pureza diferentes. Khare, Raj, Chandra & Agarwal (2014), establece que el rango de pureza puede estar entre 1.6-2.0 en el cual valores por debajo de 1,6 se cree que están contaminadas por proteína y valores superiores a 2,0 puede estar contaminada con ARN. La presencia de ARN en un extracto de ADN no interfiere en aplicaciones posteriores, pero es muy probable que cause una sobreestimación en la concentración del mismo (Olson, N. D., & Morrow, J. B., 2012).

Además de los parámetros arrojados por el espectrofotómetro, por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 11**), se pudo visualizar bandas de ADN con buena resolución, a excepción del carril 5 (Cepa 4) en donde se presencia ADN degradado, con ausencia de una banda definida, de igual forma la presencia de dímeros en los carriles 6, 8, 9 y la posible presencia de RNA en los carriles 3, fueron evidenciados en el gel de electroforesis. Sandoval, Ochoa, y Torres, (2017) sugiere que la evaluación de calidad y pureza por medio de espectrofotometría en algunos casos no corresponde completamente a lo reflejado por el gel de electroforesis. Kasajima, Sasaki, Tanaka, Terakawa, y Ohtsubo, (2013), establecen que las estimaciones de calidad y pureza de ácidos nucleicos se hacen de manera más confiable con visualización directa en gel de electroforesis, que con el uso de relaciones A260/280 y A260/230, ya que se pueden diferenciar por corrida electroforética la presencia de otros contaminantes.

Tabla 5. Concentración de ADN y relación según la absorbancia 260nm/280nm

Cepa	C-DNA µg/ml	Relación 260 nm/280 nm
1	2,266	2,007
2	2,816	2,024
3	3,059	2,072
4	1,149	2
5	3,235	1,889
6	1,244	1,991
7	1,227	2,022
8	1,142	1,91
9	3,976	2,042
10	2,791	1,907
11	4,023	1,978
12	3,690	1,891

Cepa 1-8: Cepas conservadas (Muestreo Bahía de Cartagena-MCyA). **Cepas 9-12:** Cepas aisladas de agua oceánica (Estación Antares). **Fuente:** Autor.

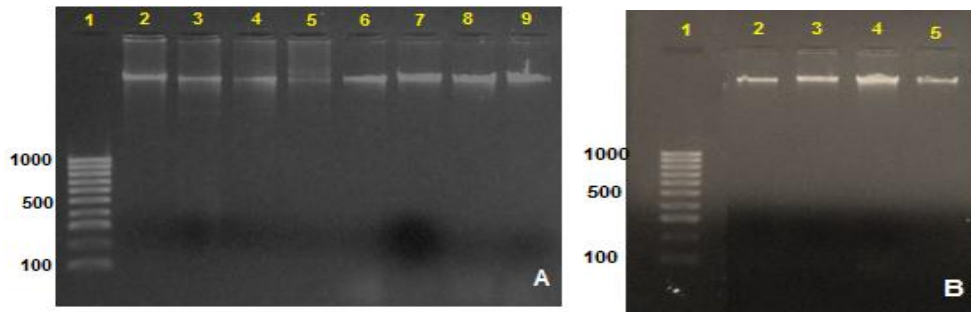


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico.

A. Carril 1: Marcador de peso molecular (1000pb); Carril 2-9: ADN genómico cepas conservadas 1-8. (**B.** Carril 2: ADN genómico cepas de agua mar oceánicas. **Fuente:** Autor.

6.3. Identificación del gen *uidA* por PCR punto final

Al evaluar la presencia del gen *uidA* en las 12 cepas analizadas, se encontró que 8 (66,66%) de ellas amplificaron para el gen *uidA*, excepto 4 (33,33%) cepas que no amplificaron. En relación, de las 8 cepas procedentes de Playa Blanca, Marbella y el Laguito, 7 amplificaron para el gen *uidA* (**Figura 12-A. Carril 4- 10**), al igual una cepa (cepa 2) de la estación marítima Antares (**Figura 12-B. Carril 3**) para un total de 8 cepas confirmadas para *E. coli*. En total 4 cepas no fueron confirmadas como *E. coli*, 1 procedente de las 3 playas estudiadas (**Figura 12-A. Carril 11**), y 3 cepas de la estación marítima Antares (**Figura 12-B. Carril 2, 4, 5**), Walker *et al.*, (2017) reporta la amplificación del gen *uidA* en el 98.9% de 87 cepas de *E. coli* en agua de mar. Brasher, Panicker, & Bej, (2002), en un estudio de aguas estuarinas destinadas para el cultivo de mariscos determinó la presencia de *E. coli* por amplificación del gen *uidA*, estableciendo el riesgo que presenta para el consumidor y para la seguridad microbiológica de los mariscos. Costa *et al.*, (2014) en el Complejo Portuario de Marañón/Brasil determinó la presencia de enterobacterias, entre las cuales, la especie más frecuentemente fue *E. coli*, que representó 51/98 (52,04%) de los aislados, seguido de *Proteus mirabilis* y otras enterobacterias como *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Morganella morganii*, y *Enterobacter cloacae*. Este gen se encuentra en el 94 – 96% de las cepas de *E. coli* (Gensberger, *et al.*, 2014).

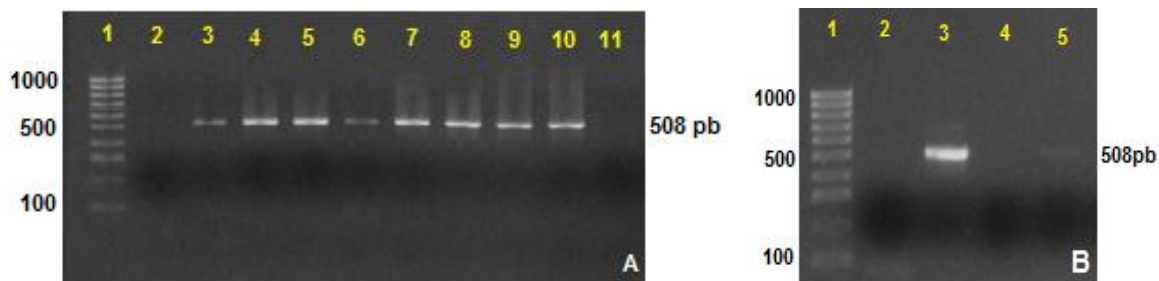


Figura 12. Electroforesis del gen *uidA*

A. Electroforesis del gen *uidA*, en las 8 cepas conservadas (Playa Blanca, Marbella y el Laguito) presuntivas para *E. coli*. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo. **Carril 4-10:** Cepas confirmadas; **Carril 11:** Cepa no confirmada. **B.** Electroforesis del gen *uidA* en las 4 cepas aisladas de la Estación Marítima Antares. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2, 4, 5:** Cepas no confirmadas (Correspondiente a las cepas 1, 3, 4); **Carril 3:** Cepa confirmada (Correspondiente a la cepa 2). **Fuente:** Autor.

En agua de mar las investigaciones relacionadas con el uso del gen *uidA* para la identificación de *E. coli* son escasas, la mayoría de los estudios reportados se llevan a cabo para la evaluación de *E. coli* en ambientes acuáticos como lagos y ríos, siendo ampliamente utilizado para el seguimiento y monitoreo de aguas tratadas y no tratadas (Bej, McCarty, & Atlas 1991; Tsai, Palmer & Sangermano, 1993; Martins, 2013; Lasalde, Rodriguez, Toranzos, & Smith, 2005).

La bahía de Cartagena y zonas cercanas a ellas son consideradas como aguas estuarinas debido a la descarga de agua dulce provenientes del canal del Dique, la presencia de *E. coli* en ella puede estar relacionada por fuentes terrestres de contaminación, entre las que se incluyen escorrentías continentales, descargas industriales y aguas residuales domésticas (Tosic *et al.*, 2017).

Según los resultados obtenidos en este estudio, la presencia de este microorganismo, prevé un problema asociado a aguas contaminadas. Vergaray, Méndez, Morante, Heredia & Béjar (2007), indica que la presencia de *E. coli* en el agua de mar puede provenir de 3 fuentes: desagües domésticos, descargas de ríos, y directamente del bañista; aunque no se puede descartar contaminación proveniente de embarcaciones. El encontrar la presencia de *E. coli* y bacterias

entéricas, alerta acerca de la posible descarga de aguas de lastre vertidos por los buques con elevadas cargas microbianas, actuando como vehículos de transporte de especies patógenas entre puertos. Sin duda, esto representa un riesgo para la conservación del ecosistema marino y a su vez para la salud humana, puesto que como indicador de contaminación fecal, puede alertar acerca de la presencia y el comportamiento de otros patógenos con probabilidad de causar diversas enfermedades (Figueras & Borrego, 2010).

6. 4. Evaluación de los filogrupos.

Al evaluar la distribución de los filogrupos de las cepas de *E. coli* 7 (87,5%) de los aislamientos corresponden al filogrupo A, y 1 al filogrupo F (12,5%) (**Figura 13**). Moritzky *et al.*, (2016), encontró que las cepas de *E. coli* en muestras de playa se clasificaron principalmente en el filogrupo A, seguido del B1. Al igual Viana. (2015), encontró que la mayoría de *E. coli* aisladas de ambientes acuáticos pertenecen al grupo A. Esto permite inferir acerca de la predominancia de cepas pertenecientes al grupo A, la cual puede estar relacionada con la fuente de contaminación fecal (Animal o humana). Este panorama se encuentra en diversos estudios. Morcatti *et al.*, 2015, en cepas aisladas de aves de corral y agua encontró una mayor frecuencia del filogrupo A y B1 en relación con el resto de filogrupos, estableciendo que estos se asocian a cepas procedente de aves de corral. Walk, Alm, Calhoun, Mladonicky & Whittam, (2007), establecen que de todos los grupos filogenéticos reconocidos, existe una mayor frecuencia en el ambiente de los grupos filogenéticos A y B1. Johnson, O'Bryan, Kuskowski & Maslow (2001), establece que las cepas comensales del intestino de humanos y animal se distribuyen en estos grupos filogenéticos, caracterizados por poseer una baja capacidad patogénica.

Según Clermont *et al.*, (2013), el grupo F se encuentra estrechamente relacionado con el grupo B2 en cuanto a características como comportamiento, nicho ecológico y capacidad patogénica, así mismo se establece que este grupo hace parte de los filogrupos menores entre los cuales también esta C y E. Vangchhia *et al.*, (2016), a partir de diversas fuentes (heces de humanos, animales domésticos (perros), mamíferos salvajes, aves de corral, aguas y aves silvestres) logró el aislamiento de cepas del grupo F. Este mismo autor, resalta que poco se conoce sobre la distribución geográfica, hospedero, características fenotípicas y propensión de estas cepas para causar enfermedad. Pero se ha establecido que se encuentra en una alta frecuencia en las heces de las aves silvestres (Byton *et al.*, 2015). Esto permite establecer una posible contaminación con heces de aves, como factores bióticos que interactúan con el agua de mar. Así mismo, Guo *et al.*,

2015, en su estudio determina que las cepas del grupo F se han clasificado como patógenos extraintestinales de animales. Estas pueden contener genes de virulencia extraintestinal, capaces de causar infección del tracto urinario (Vangchhia *et al.*, 2016).

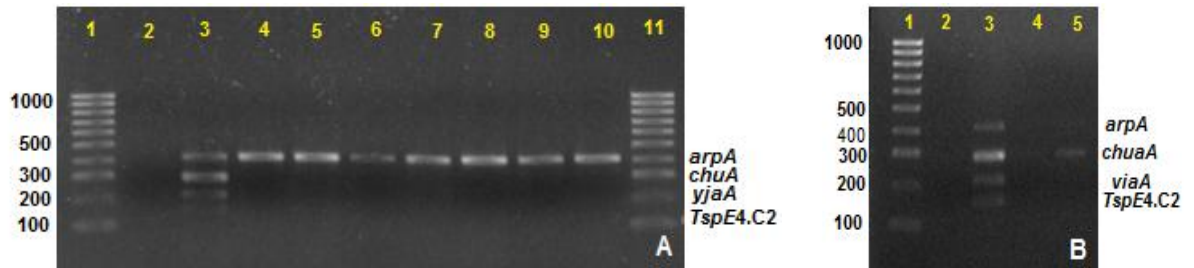


Figura 13. Electroforesis de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* para los filogrupos en *E. coli*.

A. Electroforesis en gel de agarosa para las 7 cepas confirmadas por amplificación del gen *uidA* para *E. coli* provenientes de playa. **Carril 1 y 11:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-10 (Cepa 1-7):** Amplificación del gen *arpA*, característico del Grupo A. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para la cepa confirmada por amplificación del gen *uidA* para *E. coli* proveniente de la estación marítima Antares. **Carril 1:** Marcador de peso molecular; **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 5:** Amplificación del gen *chuA*, característico del Grupo F. **Fuente:** Autor.

Todas cepas del grupo A de *E. coli*, fueron aisladas de agua de mar provenientes de playa, mientras que la cepa perteneciente al grupo F fue aislada de agua de mar oceánica. Esto permite inferir lo propuesto por Clermont *et al.*, 2000; el cual establece que las cepas de *E. coli* se agrupan filogenéticamente según su nicho ecológico, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades. En aguas cercanas a zonas urbanas existe una constante interacción con actividades humanas, por ende la predominancia de cepas de tipo comensal. Caso contrario en las aguas de mar oceánicas donde puede haber una predominancia de cepas adaptables y resistentes a las condiciones de mar abierto, en el cual las interacciones microbianas para la supervivencia deben ser de mayor potencial, con el fin de sobrevivir a condiciones extremas.

6. 5. Evaluación de genes de virulencia por PCR punto final

Al determinar la presencia de los genes de virulencia se encontró que en las 8 cepas procedentes de Playa Blanca, Marbella y el Laguito, como también en las 4 cepas de la estación marítima Antares, hubo ausencia de los factores de virulencia codificadas por los genes relacionados con fimbria tipo P (*papAH* -Figura 14), islas de patogenicidad (*PAI*-Figura 15), y sideróforo (*fyuA* Yersiniabactina-Figura 16).

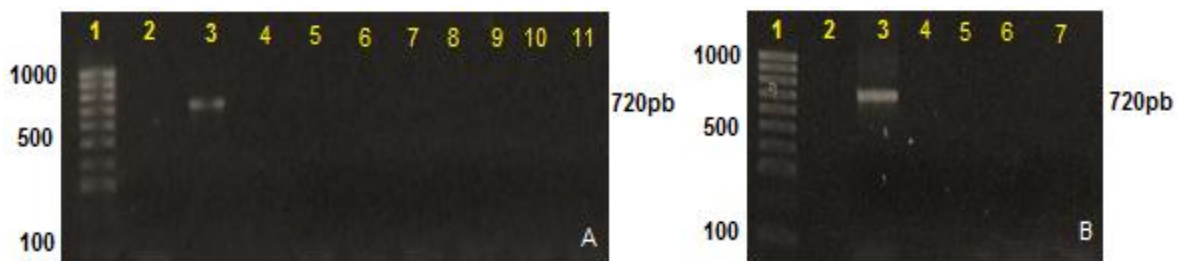


Figura 14. Factor de virulencia *papAH* (Fimbria tipo P).

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *papAH*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, Carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, Carril 11). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-11:** Gen no amplificado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *papAH*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-7:** Gen no amplificado.

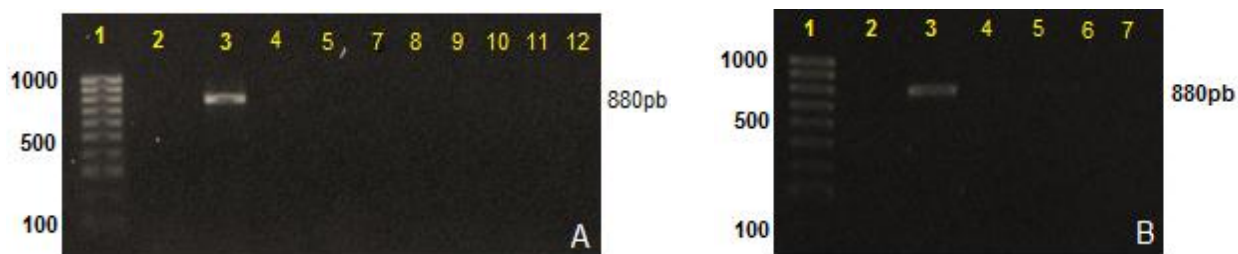


Figura 15. Factor de virulencia *FyuA* (Sideróforo).

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *fyuA*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, Carril 4-11 y 1 no confirmada para *E. coli*, Carril 12). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-12:** Gen no amplificado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *fyuA*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-7:** Gen no amplificado.

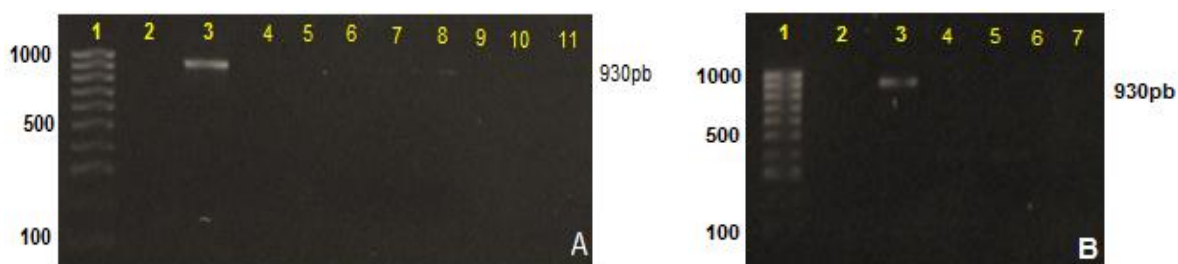


Figura 16. Factor de virulencia *PAI* (Isla de patogenicidad).

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *PAI*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, Carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, Carril 11). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-11:** Gen no amplificado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *PAI*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-7:** Gen no amplificado.

Los genes relacionados con la capsula tipo II y fimbria tipo I, fueron amplificados en las cepas procedentes de las 3 playas, 1 cepa amplificó para el gen *KpsMTII* (**Figura 17 B. Carril 2**) cepa no confirmada genéticamente para *E. coli* y en 7 (87,5%) cepas hubo amplificación para el gen *fimH* (**Figura 18 A**) pertenecientes a las aislamientos confirmados genéticamente de *E. coli*, clasificadas dentro del grupo filogenético A. Bien, Sokolova, & Bozko, P (2012); establecen que las cepas pertenecientes al grupo filogenético A son consideradas de bajo poder virulento. Sin embargo esto no quiere decir que no posea algunos genes implicados en potenciar la patogenicidad microbiana. Millan, Hernández, Millán, & Araque, (2014); determinó que el perfil de virulencia se encuentra asociado con el grupo filogenético, en su estudio las cepas del grupo A, poseían genes asociados a *fimH*, *fyuA*, *PAI*, *papAH*. A su vez, Marquez *et al.*, (2018) detectó una frecuencia de 73% de *fimH* en cepas de *E. coli*. En este estudio se encontró un porcentaje de 87,5%. Esto permite establecer la abundancia de cepas de *E. coli* con frimbria tipo 1. Pero, se ha establecido, que la fimbria tipo 1 codificada por *fimH* se expresan tanto en cepas patógenas y como en comensales (Hagberg, *et al.*, 1991). Es decir, cumple la función como mediadora de la adhesión bacteriana, pero también se ha mostrado que también está implicada en la invasión de las células epiteliales de la vejiga, comportándose como extraintestinal (Martínez *et al.*, 2000), lo que dificulta su diferencia en las cepas de *E. coli*.

La cápsula se considera como la principalmente estructura de conformación polisacárida que protege a la bacteria del sistema inmune del anfitrión, evadiendo la fagocitosis y el efecto bactericida del complemento (Bien *et al.*, 2002). Su presencia en algunas cepas extraintestinales la convierte en un factor de virulencia de implicado en la resistencia bacteriana. Mamani (2014), establece que las cápsulas clasificadas del grupo II (codificada por el gen *KpsMTII*) y III, son cepas responsables de infecciones extraintestinales.

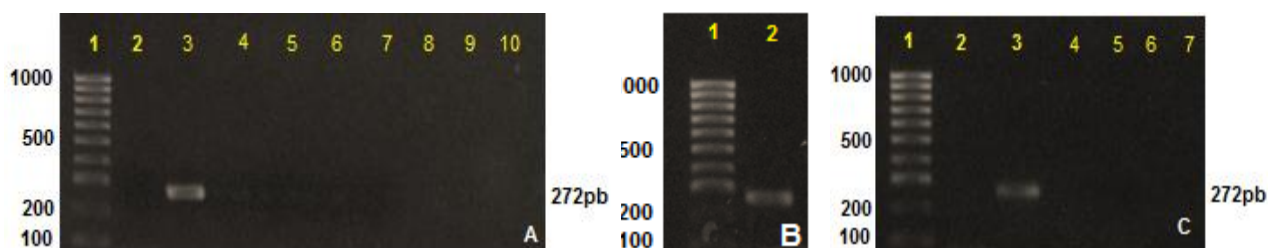


Figura 17. Factor de virulencia *KpsMTII* (Capsula tipo II).

A y B. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *KpsMTII*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, Carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, presente en gel **B.** Carril 2), **A. Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-10:** Gen no amplificado. **B. Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Gen amplificado. **C.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *KpsMTII*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-7:** Gen no amplificado.

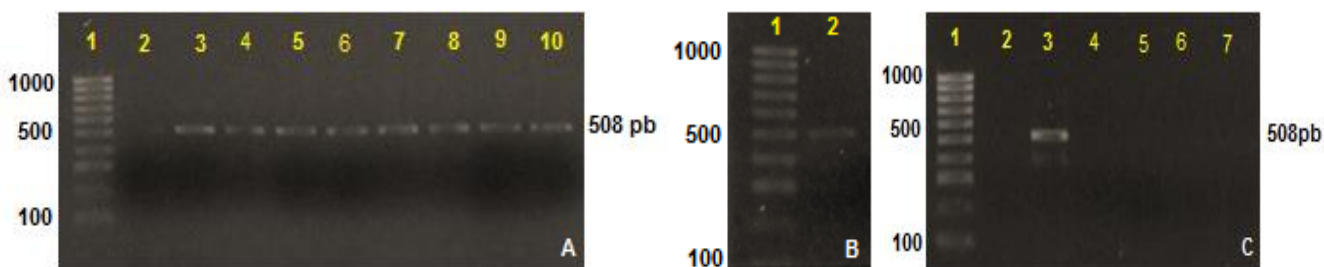


Figura 18. Factor de virulencia *fimH* (Fimbria tipo I).

A y B. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *fimH*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, Carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, gel **B.** carril 2). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-10:** Gen amplificado. **B. Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Gen amplificado. **C.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *fimH*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-7:** Gen no amplificado.

A pesar de que las cepas del grupo A, tienen una baja probabilidad de ser patógenas, debido a la presencia de los factores de virulencia. Moreno *et al.* (2006) indica que los dos grupos filogenéticos comensales A y B1, a pesar de ser comensal han estado implicadas en infecciones extraintestinales. Debido a que las cepas comensales pueden adquirir genes de virulencia y convertirse en potencialmente patógena según las variaciones en las condiciones geográficas y climáticas (Duriez *et al.*, 2001). O a través de mecanismos de transferencia vertical y horizontal de genes y la presencia de plásmidos que le permiten comportarse como un patógeno intrainestinal o extraintestinal (Wiles, Kulesus & Mulvey, 2008).

Al evaluar la presencia los genes *eaeA*, *Stx1* y *Stx2*, se halló una ausencia del gen *Stx2* (**Figura 19**), en el 100% de las cepas. Caso contrario en la amplificación del gen *Stx1* (**Figura 20**) y *eaeA* (**Figura 21**) presentes en 1 (12,5%) de las cepas confirmadas genotípicamente para *E. coli*, y asignada dentro del grupo filogenético F. Así mismo, las cepas 3 y 4 no identificadas como *E. coli* amplificaron para el gen *Stx1* (**Figura 20-B. Carril 4 y 5**), siendo la cepa 3 positiva para *eaeA* (**Figura 21-B. Carril 5**). Hamilton *et al.*, (2010) a partir de 24.493 cepas reporta la presencia de *E. coli* en agua de mar 875 (3,6%) positiva para para la proteína de membrana microbiana *eaeA*, considerándose como cepas potenciales para ser clasificada como *E. coli* enteropatógena (EPEC). Miyagi *et al.*, (2001) también reporta la detección de los genes *Stx1* y *Stx2* en agua marina del puerto de Osaka que recibe efluentes de los ríos Aji y Kizu, como los principales responsables de la presencia de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC).

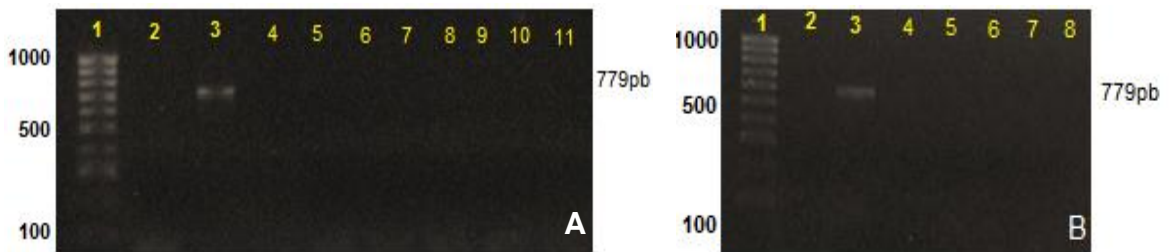


Figura 19. Factor de virulencia *Stx2* (Subgrupo toxina Shiga)

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *Stx2*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, gel, carril 11). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-11:** Gen no amplificado para el gen *Stx2*. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *Stx2*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de

peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4- 7:** Gen no amplificado.

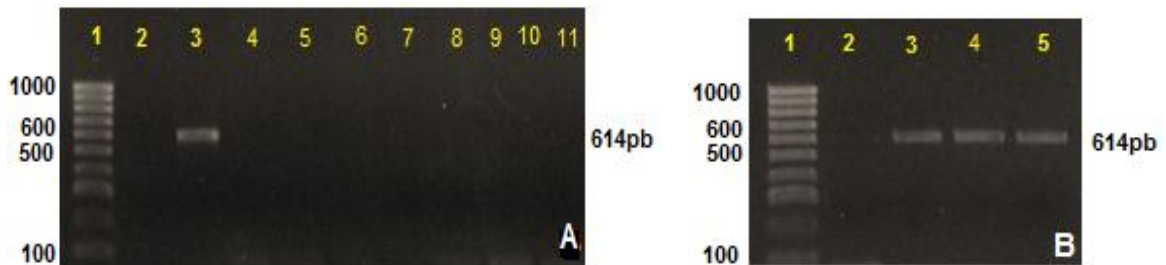


Figura 20. Factor de virulencia *Stx1* (Subgrupo toxina Shiga)

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *Stx1*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, gel, carril 11). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-11:** Gen no amplificado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *Stx1*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 2-5). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Gen no amplificado; **Carril 3- 5:** Gen amplificado.



Figura 14. Factor de virulencia *eaeA* (Proteína de membrana).

A. Electroforesis en gel de agarosa para el gen *eaeA*, con las 8 cepas procedentes de las 3 playas (7 confirmadas para *E. coli*, carril 4-10 y 1 no confirmada para *E. coli*, gel, carril 11). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4-11:** Gen no amplificado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa para el gen *eaeA*, con las 4 cepas aisladas de la estación marítima Antares (Carril 4-7). **Carril 1:** Marcador de peso molecular (1000pb); **Carril 2:** Control de reactivo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril: 4-5:** Gen amplificado; **Carril: 6-7:** Gen no amplificado.

En este estudio la cepa de *E. coli* positiva para los genes *Stx1* y *eaeA*, puede ser clasificada como un patógeno intestinal de *E. coli* shigatoxigénica (STEC) con unión específica hacia los enterocitos ya que la interacción de ECST con los está mediada por la intimina, seguido de la secreción de la toxina (Farfan *et al.*, 2016).

Moritzky, *et al.*, (2016), establece que una ausencia del gen *eaeA* (Adhesina bacteriana), debe generar poca preocupación, ya que sin el gene *eaeA*, es improbable que cause daño al huésped debido a que la función principal de la proteína es mediar la unión y favorecer la entrada de las proteínas efectoras a través de los poros.

Según Paton & Paton (2002), una reacción positiva con cebadores específicos para *Stx1* o *Stx2* es suficiente para confirmar la presencia de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), principal agente etiológico del síndrome hemolítico urémico (SHU). El receptor de *Stx1* y *Stx2* es la globotriaosilceramida o también llamado Gb3 en humanos (Jacewicz *et al.*, 1995), su expresión en la superficie celular provoca la unión de la toxina a la Gb3, internalizándola con dirección al complejo de Golgi, retículo endoplásmico y la membrana nuclear (Sandvig & Van, 1996) para generar una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas (Endo *et al.*, 1998).

En relación a las dos cepas no identificadas como *E. coli*, pero productoras de la toxina Shiga se han demostrado en estudios previos que esta toxina puede ser expresada por una variedad de especies bacterianas entre las que se encuentra *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Acinetobacter spp* y *Campylobacter spp* (Paton & Paton 1996; Schmidt *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1988).

Las cepas STEC se encuentran comúnmente en el intestino de los bovinos y otros rumiantes, considerados el reservorio principal de STEC (Brussow *et al.*, 2004). Cedillo, (2017), afirma que estas bacterias pueden entrar en el ambiente marino por el escurrimiento de tierra y de aguas residuales.

7. CONCLUSIONES

A nivel fenotípico, bioquímico y molecular se encontró la presencia de *E. coli* en playa Blanca, Marbella, el Laguito y a 20 metros de profundidad en agua oceánica de la estación marítima Antares; sin duda representa un riesgo para la salud humana y del ecosistema marino, ya que como indicador de contaminación de tipo fecal, es responsable de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos, y el lograr determinar su presencia tanto en agua de mar costera como en agua oceánica puede dar un indicio en cuanto a la supervivencia de *E. coli* en, y el transporte de ella desde la zona costera hasta mar adentro. A nivel molecular, de las 12 cepas analizadas, se encontró que 8 (66,66%) de ellas amplificaron para el gen *uidA*, excepto 4 (33,33%) cepas que no amplificaron, su identificación por PCR ratifica la presencia de *E. coli*, lo que prevé un problema de contaminación con aguas residuales que pueden llegar producto del escurrimiento superficial de aguas lluvias o de la descarga directa de aguas domésticas, alertando acerca de la alta probabilidad de la presencia de otros patógenos.

Al analizar los filogrupos de las 8 cepas de *E. coli* identificadas genotípicamente, 7 (87,5%) cepas hacen parte del grupo A, mientras que 1 (12,5 %) de ellas pertenece al grupo F, lo anterior permite establecer el posible comportamiento patogénico o no de *E. coli*, es decir, la distribución en los filogrupos aporta información relacionada con la naturaleza de la cepa; generalmente las cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo A, son caracterizadas como comensal, habitantes normales de intestino de humanos y animales las cuales no se consideran patógenos debido a la ausencia de genes de virulencia, mientras que la cepa del grupo F, se atribuye a cepas clasificadas como patógenos intestinales o extraintestinales, con una mayor probabilidad de causar enfermedad, debido la presencia de genes de virulencia específicos que aumentan su capacidad patogénica.

Al evaluar la presencia de los genes de virulencia, en las cepas de *E. coli* identificadas genotípicamente, se encontró que las 7 cepas *E. coli* procedentes de las 3 playas (Blanca, Marbella y el Laguito), distribuidas dentro del filogrupo A, amplificaron para el gen *fimH* que codifica la fimbria tipo 1, sensible a manosa, a excepción del resto de genes, *PAI*, *fyuA*, *papH*, *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, y *KpsMTII*, esto permite inferir acerca de la baja patogenicidad de las cepas, según la presencia de los genes de virulencia evaluados en este estudio. Caso contrario en la cepa de *E. coli*, clasificada dentro del filogrupo F aislada de la estación marítima Antares, la cual amplificó los genes para el subgrupo de la toxina Shiga *Stx1* y proteína intimina *eaeA*, genes determinantes para caracterizar la cepa como *E. coli*,

productora de la toxina Shiga (STEC), principal agente etiológico asociado al síndrome hemolítico urémico (SHU), y otros síntomas clínicos como dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y fiebre. Lo anterior permite, se agrupan filogenéticamente según su nicho ecológico, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades. Lo anterior permite analizar la relación que guardan las cepas de acuerdo a su nicho ecológico, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere para un próximo estudio o como actividad complementaria a este trabajo, aumentar el número de muestreos en las playas de la Bahía de Cartagena y en la estación marítima Antares, con el fin de poder obtener un mayor número de cepas de *E. coli* y así poder realizar una aproximación de los filogrupos mucho más amplia en las cepas de *E. coli* aisladas de agua de mar en la ciudad de Cartagena, estableciendo la relación estadística entre el filogrupo y los factores de virulencia de las cepas de *E. coli*.

Se recomienda seguir fortaleciendo los conocimientos relacionados con la biología molecular, desde los centros de investigaciones y laboratorios de investigación de las universidades, ya que este tipo de proyectos amplía la relación interdisciplinar de la microbiología con otras ramas de estudio, permitiendo explorar nuevos campos en donde se acoplan las técnicas moleculares al estudio de los microorganismos.

El primer contacto generado gracias a esta pasantía con el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe y el Grupo de Investigación en Microbiología Clínica y Ambiental de la Universidad, abre la puerta a que otros estudiantes también tengan la posibilidad de realizar este tipo de experiencias que enriquecen la vida personal y profesional.

9. GLOSARIO

ADN: Acido desoxirribonucleico.

APROM: Área de protección al medio marino.

BHI: Infusión cerebro corazón.

CIOH: Centro de investigaciones oceanográficas e hidrográficas del caribe.

DBO: Demanda biológica de oxígeno.

E. coli: *Escherichia coli*.

EMB: Eosina Azul de metileno.

EPEC: *E. coli* Enteropatógena.

STEC: *E. coli* toxina Shiga.

GIMCA: Grupo de Investigación en Microbiología Clínica y Ambiental.

MUG: 4-Metilumbeliferil β -D Glucorónido.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

SHU: Síndrome urémico hemolítico.

SST: Sólidos suspendidos totales.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant methods*, 13(1), 1.
- Abdel-Shafy, H., & Aly, R. (2002). Water issue in Egypt: resources, pollution and protection endeavors. *Navigation*, 49(3.1), 4-6.
- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington, D.C: American Public Health Association; 2012.
- Baena Del Valle, J. A., Ramos Moreno, Á. J., Gómez Alegría, C. J., & Gómez Camargo, D. E. (2013). Comparison of DNA extraction methods from formalin-fixed paraffin sections for RCP amplification. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 172-179.
- Bain, R. E., Woodall, C., Elliott, J., Arnold, B. F., Tung, R., Morley, R., ... & Pedley, S. (2015). Evaluation of an inexpensive growth medium for direct detection of *Escherichia coli* in temperate and sub-tropical waters. *PloS one*, 10(10).
- Bej, A. K., McCarty, S. C., & Atlas, R. M. (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2429-2432.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*, 2012.
- Blyton, M. D., Cornall, S. J., Kennedy, K., Colligon, P., & Gordon, D. M. (2014). Sex-dependent competitive dominance of phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains within human hosts. *Environmental microbiology reports*, 6(6), 605-610.
- Brasher, C., Panicker, G., & Bej, A. K. (2002). Evaluation of PCR Amplification-based Detection of Heat-killed *Escherichia coli* and Cell-free DNA in Shellfish. *Molecular Biology Today*, 3(3), 85-90.
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 560-602.

Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I., Gomes, T. A., ... & Ottoboni, L. M. (2010). Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*, 10(1), 161.

Caruso G (2013) Microbes and their use as Indicators of Pollution. *J Pollut Eff Cont* 1 (1).

Cedillo Martin, C. (2017). Isolation and Characterisation of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli from Norwegian Bivalves (Master's thesis, The University of Bergen).

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555-4558.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2004). Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to Escherichia coli strains causing neonatal meningitis. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1770-1772.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58-65.

Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic Escherichia lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental microbiology*, 13(9), 2468-2477.

Colford Jr, J. M., Wade, T. J., Schiff, K. C., Wright, C. C., Griffith, J. F., Sandhu, S. K., ... & Weisberg, S. B. (2007). Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology*, 18(1), 27-35.

Costa, C. F. M., Monteiro Neto, V., Santos, B. R. D. C., Costa, B. R. R., Azevedo, A., Serra, J. L., ... & Kuppinger, O. (2014). Enterobacteria identification and detection of diarrheagenic Escherichia coli in a Port Complex. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 945-952.

Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M. A., & García, J. L. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 523-569.

Dirección General Marítima. (2009) Decreto 5057. Estructura del Ministerio de Defensa Nacional — Dirección General Marítima Bogotá, D.C, Recuperado de: <https://www.dimar.mil.co>.

Echavarría, J. J., & Villamizar, M. (2006). El proceso colombiano de desindustrialización. Borradores de economía, 361.

El-Hadedy, D., & El-Nour, S. A. (2012). Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1), 129-135.

Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., & Igarashi, K. (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *The FEBS Journal*, 171(1-2), 45-50.

Entis, P., & Boleszczuk, P. (1990). Direct enumeration of coliforms and *Escherichia coli* by hydrophobic grid membrane filter in 24 hours using MUG. *Journal of food protection*, 53(11), 948-952.

Fagan, P. K., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., & Djordjevic, S. P. (1999). Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 868-872.

Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450.

Figueras, M., & Borrego, J. J. (2010). New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *International journal of environmental research and public health*, 7(12), 4179-4202.

Flandroy, L., Poutahidis, T., Berg, G., Clarke, G., Dao, M., Decaestecker, E., Furman, E., Haahtela, T., Massart, S., Plovier, H., Sanz, Y. and Rook, G. (2018). The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Science of The Total Environment*, 627, pp.1018-1038.

Fleisher, J. M., Kay, D., Salmon, R. L., Jones, F., Wyer, M. D., & Godfree, A. F. (1996). Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. *American journal of public health*, 86(9), 1228-1234.

García-Hoyos, L. M., Franco-Herrera, A., Ramírez-Barón, J. S., & López-Cerón, D. A. (2010). Ocean-Atmosphere Dynamics And Their Influence On The Phytoplankton Biomass Off The Magdalena Region Coastal Zone, Colombian Caribbean. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 39(2), 307-335.

Gensberger, E. T., Polt, M., Konrad-Köszler, M., Kinner, P., Sessitsch, A., & Kostić, T. (2014). Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. *Water research*, 67, 367-376.

Gómez-Duarte, O. G., Arzuza, O., Urbina, D., Bai, J., Guerra, J., Montes, O., ... & Castro, G. Y. (2010). Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne pathogens and disease*, 7(2), 199-206.

Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., & Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental microbiology*, 10(10), 2484-2496.

Guo, S., Wakeham, D., Brouwers, H. J., Cobbold, R. N., Abraham, S., Mollinger, J. L., ... & Trott, D. J. (2015). Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. *Microbes and infection*, 17(4), 266-274.

Hagberg, L., Jodal, U., Korhonen, T. K., Lidin-Janson, G., Lindberg, U., & Eden, C. S. (1981). Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infection and Immunity*, 31(2), 564-570.

Hamilton, M. J., Hadi, A. Z., Griffith, J. F., Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2010). Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water research*, 44(18), 5463-5473.

Hervert, C. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. *Journal of dairy science*, 100(2), 950-960.

INVEMAR. 2007. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2006. Recuperado de: <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/IEAR2006.pdf>.

- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101-108.
- Islam, M. S., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine pollution bulletin*, 48(7-8), 624-649.
- Jacewicz, M. S., Acheson, D. W., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Balasubramanian, K. A., & Keusch, G. T. (1995). Maturation regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 96(3), 1328-1335.
- Jang, J., Di, D. Y., Lee, A., Unno, T., Sadowsky, M. J., & Hur, H. G. (2014). Seasonal and genotypic changes in *Escherichia coli* phylogenetic groups in the Yeongsan River basin of South Korea. *PloS one*, 9(7), e100585.
- Jesumirhewe, C., Ogunlowo, P. O., Olley, M., Springer, B., Allerberger, F., & Ruppitsch, W. (2016). Accuracy of conventional identification methods used for Enterobacteriaceae isolates in three Nigerian hospitals. *PeerJ*, 4, e2511.
- Johnson, J. R. (2003). Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics*, 17(2), 261-278.
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155-162.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of infectious diseases*, 181(1), 261-272.
- Johnson, J. R., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M., & Maslow, J. N. (2001). Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infection and immunity*, 69(9), 5363-5374.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123.
- Khanafer, M., Al-Awadhi, H., & Radwan, S. (2017). Coliform Bacteria for Bioremediation of Waste Hydrocarbons. *BioMed research international*, 2017.

Khare, P., Raj, V., Chandra, S., & Agarwal, S. (2014). Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *Journal of forensic dental sciences*, 6(2), 81.

Kasajima, I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Terakawa, T., & Ohtsubo, N. (2013). Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Scientia horticultrae*, 164, 65-72.

Lamprecht, C., Romanis, M., Huisamen, N., Carinus, A., Schoeman, N., Sigge, G. O., & Britz, T. J. (2014). *Escherichia coli* with virulence factors and multidrug resistance in the Plankenburg River. *South African Journal of Science*, 110(9-10), 01-06.

Lasalde, C., Rodriguez, R., Toranzos, G. A., & Smith, H. H. (2005). Heterogeneity of uidA gene in environmental *Escherichia coli* populations. *Journal of water and health*, 3(3), 297-304.

Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., & Wood, T. K. (2010). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of applied microbiology*, 108(6), 2088-2102.

Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *In Advances in microbial physiology*. 65, pp. 337-372.

Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 2-12.

Mamani H. (2014). Caracterización Molecular de Cepas de *Escherichia coli* del Grupo Clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros Clones Causantes de Infecciones Extraintestinales en Seres Humanos. Genes de Virulencia y de Resistencia.

Márquez, V., Quiroz, L., Miranda, P., Vidales, R., Sánchez, S., López, M., Flores, A., Ramírez R.(2018). Genes de virulencia y Grupo Filogenético en aislados de *Escherichia Coli* Patogénica Aviar. *Archivos de medicina* 14(1).

Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO journal*, 19(12), 2803-2812.

- Martínez-Nazaret, R. E., Villalobos de Bastardo, L. B., & Castillo, L. K. (2015). *Escherichia coli* diarregénicas procedentes de aguas marinas recreacionales caracterizadas por reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica*, 25(3).
- Martins, M. T., Rivera, I. G., Clark, D. L., Stewart, M. H., Wolfe, R. L., & Olson, B. H. (1993). Distribution of uidA gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2271-2276.
- Millan, Y., Hernández, E., Millán, B., & Araque, M. (2014). Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients in the community of Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de microbiología*, 46(3), 175-181.
- Ministerio De Agricultura (1979). Decreto 1875. Normas sobre la prevención de la contaminación del medio marino y otras disposiciones. Bogotá, D.C. Recuperado de: www.minambiente.gov.co.
- Ministerio De Salud (1993). Resolución 8430, Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá, D.C. Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co>.
- Ministerio del Medio Ambiente. (1984). Decreto 1594. Uso y manejo de aguas superficiales, subterráneas, marinas y estuarinas. Bogotá, D.C. Recuperado de: <http://www.alcaldiabogota.gov.co>.
- Miyagi, K., Omura, K., Ogawa, A., Hanafusa, M., Nakano, Y., Morimatsu, S., & Sano, K. (2001). Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiology & Infection*, 126(1), 129-133.
- Mokracka, J., Koczura, R., Jabłońska, L., & Kaznowski, A. (2011). Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(4), 817-824.
- Moore, M. A., Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., & O'Brien, A. D. (1988). Production of a Shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microbial pathogenesis*, 4(6), 455-462.

- Morcatti Coura, F., Diniz, S. D. A., Silva, M. X., Mussi, J. M. S., Barbosa, S. M., Lage, A. P., & Heinemann, M. B. (2015). Phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from animals samples. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Pérez, T., & Andreu, A. (2006). Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(8), 483-489.
- Moritzky, S. A., Frost, V., & Heard, M. (2016). Determination of phylo-group diversity of *Escherichia coli* in environmental sand samples collected from a South Carolina beach. *The Winthrop McNair Research Bulletin*, 2(1), 8.
- Munro, P. M., Gauthier, M. J., Breittmayer, V. A., & Bongiovanni, J. (1989). Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 2017-2024.
- Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes*, 5(1), 668.
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (1996). Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 34(2), 463-465.
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (2002). Direct detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 271-274.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Mori, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*, 67(2), 546-553.
- Pommepuy, M., Hervio-Heath, D., Caprais, M. P., Gourmelon, M., Le Saux, J. C., & Le Guyader, F. (2005). Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach. In *Oceans and Health: Pathogens in the marine environment* (pp. 331-359). Springer, Boston, MA.
- Pulido, M. D. P. A., de Navia, S. L. Á., Torres, S. M. E., & Prieto, A. C. G. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4).

- Rezwan, F., Lan, R., & Reeves, P. R. (2004). Molecular basis of the indole-negative reaction in *Shigella* strains: extensive damages to the *tna* operon by insertion sequences. *Journal of bacteriology*, 186(21), 7460-7465.
- Romero Lares, M. C. (2017). Medidas para la protección del medio marino en la región del Gran Caribe por daños ocasionados por la industria mar adentro. *Revista de Derecho*, (47), 207-233.
- Sanchez, C. (2011). Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions. *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), 630.
- Sandvig, K., & Van Deurs, B. (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiological reviews*, 76(4), 949-966.
- Sandoval-Pineda, J. F., Ochoa-Corona, F. M., & Torres-Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1).
- Schmidt, H. E. R. B. E. R. T., Montag, M. O. N. I. K. A., Bockemühl, J., Heesemann, J. U. R. G. E. N., & Karch, H. E. L. G. E. (1993). Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infection and immunity*, 61(2), 534-543.
- Shuval, H. (2003). Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *Journal of Water and Health*, 1(2), 53-64.
- Stewart, J. R., Gast, R. J., Fujioka, R. S., Solo-Gabriele, H. M., Meschke, J. S., Amaral-Zettler, L. A., ... & Sinigalliano, C. D. (2008). The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. In *Environmental Health*, 7(2).
- Thakur, N. L., Jain, R., Natalio, F., Hamer, B., Thakur, A. N., & Müller, W. E. (2008). Marine molecular biology: an emerging field of biological sciences. *Biotechnology advances*, 26(3), 233-245.
- Tosic, M., Restrepo, J. D., Izquierdo, A., Lonin, S., Martins, F., & Escobar, R. (2017). An integrated approach for the assessment of land-based pollution loads in the coastal zone. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- Tsai, Y. L., Palmer, C. J., & Sangermano, L. R. (1993). Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*, 59(2), 353-357.

- Van Tongeren, S. P., Degener, J. E., & Harmsen, H. J. M. (2011). Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(9), 1053-1061.
- Vangchhia, B., Abraham, S., Bell, J. M., Collignon, P., Gibson, J. S., Ingram, P. R., ... & Gordon, D. M. (2016). Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microbiology*, 162(11), 1904-1912
- Vergaray, G., Méndez, C. R., Morante, H. Y., Heredia, V. I., & Béjar, V. R. (2007). *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 10(20), 82-86.
- Viana Da Silva, V. F. (2015) *Caracterização Fenotípica E Molecular De Escherichia Coli Isoladas De Amostras De Água Do Mar Da Região Costeira Do Estado De São Paulo, Brasil. Título de Mestre em Microbiologia. Universidade de São Paulo.*
- Vikas, M., & Dwarakish, G. S. (2015). Coastal pollution: a review. *Aquatic Procedia*, 4, 381-388.
- Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M., & Whittam, T. S. (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental microbiology*, 9(9), 2274-2288.
- Walk, S. T., Alm, E. W., Gordon, D. M., Ram, J. L., Toranzos, G. A., Tiedje, J. M., & Whittam, T. S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), 6534-6544.
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., ... & Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water research*, 126, 101-110.
- Williams, A. P., Avery, L. M., Killham, K., & Jones, D. L. (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1075-1083.
- World Health Organization. (2003). *Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters (Vol. 1)*. World Health Organization.

11. ANEXOS

Las actividades desarrolladas durante la pasantía de investigación en el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe, se enmarcaron en 8 objetivos con sus respectivas actividades.

1. Realizar lectura y seguimiento de las condiciones ambientales de cada una de las zonas del laboratorio con relación a temperatura y humedad.

-Se realizó histórico en graficas de las variables de temperatura y humedad de los meses de enero, febrero, marzo, abril y mayo en cuanto a los datos arrojados.

-Seguimiento a 3 termo-higrómetros por comparación de los ya calibrados.

2. Apoyar en el alistamiento y preparación de materiales, reactivos, equipos y medios de cultivo para la toma y procesamiento de muestras que involucren los ensayos microbiológicos.

-Según el requerimiento en el laboratorio se brindó apoyo en todo lo correspondiente a la preparación de materiales y medios de cultivos para los ensayos de: control de superficie semanal, control de ambiente mensual, y apoyo para la determinación de coliformes totales, fecales y *Enterococcus* spp, en agua de mar con relación al proceso de validación.

-Se realizó una revisión acerca del procedimiento de toma de muestras para análisis microbiológico en el cual se sugirió modificar las profundidades para toma de muestra en la columna de agua para el aislamiento de coliformes totales y fecales.

3. Apoyar en el lavado, esterilización del material y limpieza y desinfección del laboratorio.

4. Apoyo en la realización de las pruebas de controles de aseguramiento de la calidad tanto del material, como de los medios empleados en los ensayos microbiológicos.

- Se realizó ensayos relacionados con el control de calidad de superficies y aire.
- Histórico del control de superficie y de ambiente, durante los meses de enero, febrero, marzo, abril, y mayo del 2018.
- Apoyo en el mantenimiento rutinario nivel 1 de los equipos conforme plan establecido por el laboratorio durante el mes de abril y mayo.

5. Elaborar un protocolo para la identificación de bacterias y hongos en muestras de agua de mar, mediante técnicas de biología molecular.

- Se realizó la consulta bibliográfica y de reactivos-materiales para la elaboración del protocolo, de forma constante hasta la entrega del informe final.
- Aislamiento de cepas y conservación en BHI y glicerol.
- Se ensayó el kit de extracción de ADN con tejidos.
- Presentación de seminario Universidad de Cartagena.
- Presentación métodos de extracción y participación en protocolos de extracción de ADN (Kit ADN Genómico y Solventes orgánicos).
- Ensayo de electroforesis para determinar la presencia de ADN.
- Ejecución del trabajo de grado con sus respectivas actividades.

Estas actividades se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Clínica y Ambiental y en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cartagena.

6. Apoyar las actividades que requiera el área de microbiología que permitan el mejoramiento continuo del sistema de gestión de calidad.

-Se apoyó de forma permanente en todo lo relacionado con las actividades del sistema de gestión de calidad.

-Organización de Hoja de vida Datalogger y termohigrometros.

-Participación en el foro de actualización de la norma ISO/IEC 17025:2017

-Asistencia a las asignaturas de redacción científica y crucero oceanográfico, impartida por la facultad de oceanografía física (maestría) de la ENAP.

7. Entregar informes mensuales parciales, representado con datos y gráficas, en caso en los que aplique. Y 01 final

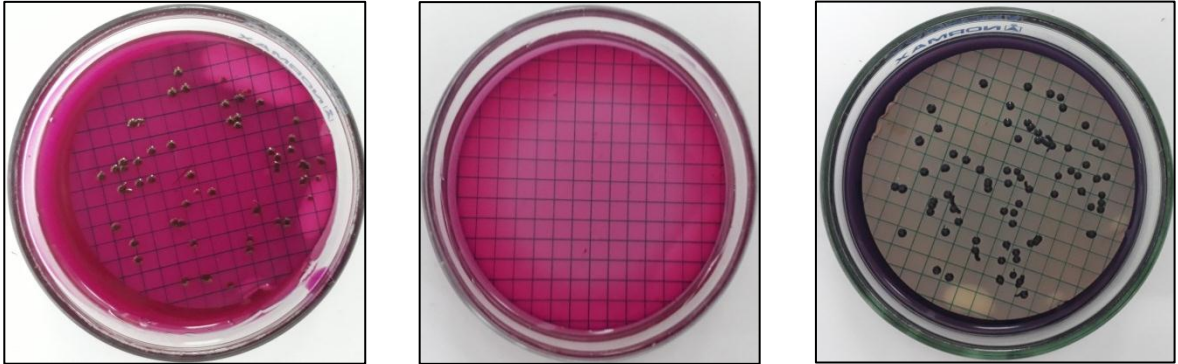
-Realización de documento de trabajo de grado bajo la temática de biología molecular.

-Entregables de avances en los meses de abril y mayo, conforme a lo establecido.

8. Participar en la elaboración de notas periodísticas para la página web del centro y artículos de interés.

-Elaboración de una nota periodística para la página web, relacionada con el trabajo realizado en conjunto con la Universidad de Cartagena.

EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS



Fuente: Autor.

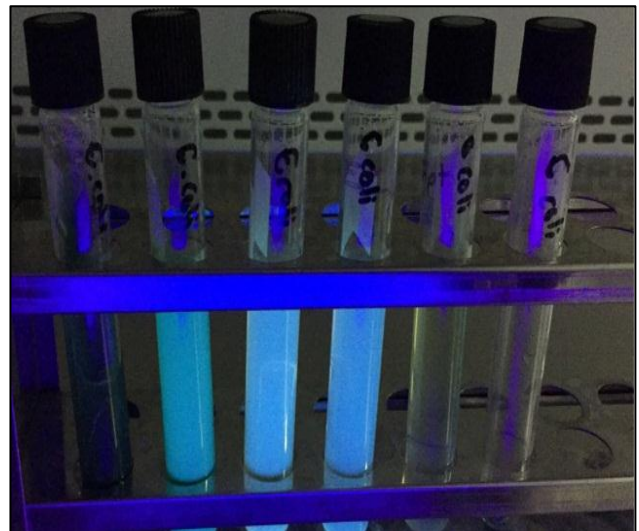
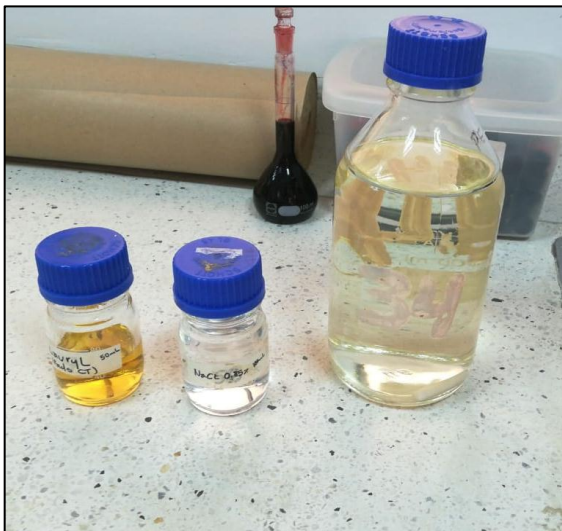


Fuente: Autor.





Fuente: Autor.



Fuente: Autor.

