

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO”**

Realizado por:

MICAELA ALEXANDRA ESPINOSA BARAHONA

Director del proyecto:

Ing. Alberto Aguirre, PhD.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 22 de agosto del 2023

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MICAELA ALEXANDRA ESPINOSA BARAHONA, con cédula de identidad # 1727056176, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado en ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



1727056176

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EFFECTO DE ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE EUCALIPTO
SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO”**

Realizado por:

MICAELA ALEXANDRA ESPINOSA BARAHONA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



firma

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOHANNA MEDRANO PhD.

KATTY CORAL PhD (c)

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



firma



firma

Quito, 22 de agosto del 2023

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS
DE QUITO**

AGRADECIMIENTO

A mi familia, amigos y profesores

**EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE
QUITO**

22/03/2023 14:53:27

Para someter a:

To be submitted:

Efecto del aceite esencial de eucalipto sobre el crecimiento de comunidades bacterianas
multirresistentes a antibióticos provenientes de ríos de Quito

Micaela Alexandra Espinosa¹, Alberto Alejandro Aguirre^{1*}

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito,
Ecuador. 22/03/2023 14:53:27

* AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ing. Alberto Alejandro Aguirre PhD.,
Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas, Quito,
Ecuador.

Teléfono: +593; email: alberto.aguirre@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Aceites esenciales, bacterias multirresistentes a antibióticos,
eucalipto.

**EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE
QUITO**

Índice de contenidos

Introducción.....	6
Materiales y métodos.....	9
Área de estudio	9
Fase de campo	9
Recolección del material vegetal.....	9
Recolección del agua residual.	9
Fase de laboratorio.....	9
Lavado y Secado del material Vegetal	9
Ensayo para la extracción del aceite esencial de las hojas del Eucalyptus globulus.	10
Elaboración del medio de cultivo.	11
Periodo de Aclimatación.	12
Montaje, puesta en marcha y operación del sistema: Quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.....	13
Análisis de Estadístico.....	17
Bioensayo	16
Resultados.....	17
Discusión de Resultados.....	21
Conclusiones.....	23
Recomendaciones	23
ANEXOS	29

Índice de Tablas

Tabla 1.- Equipos y materiales para la destilación (Tomado de: (Patiño, Augusto , & Jose, 2014, pág. 5)	11
Tabla 2.- Composición del medio de cultivo.....	12
Tabla 3.- Ensayo de detección de multirresistencia a antibióticos en comunidades bacterianas	15

**EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE
QUITO**

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1	12
Ecuación 2.- Ejemplo de cálculo de dosis de antibióticos.....	15
Ecuación 3.- ΔOD	16
Ecuación 4.- Índice de susceptibilidad	16

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.- Montaje y operación del destilador por arrastre de vapor.....	11
Ilustración 2.-Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, y el sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.....	13
Ilustración 3.- Índice de susceptibilidad promedio.....	18
Ilustración 4.- Promedio de los reactores antes y después de la incubación.	19
Ilustración 5.- Halos formados del control positivo con dosis de 20, 15 y 10 μL , respectivamente.	20

Índice de Anexos

Anexos 1 Bioensayo	29
Anexos 2 Inoculación de la muestra del tubo de bacterias más penicilina.....	30
Anexos 3 Discos artesanales para la prueba de difusión por disco	31
Anexos 4 Aceite esencial de Eucalipto	32
Anexos 5 Montaje del Destilador por la técnica de arrastre de vapor.....	33

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Resumen

La resistencia a los antibióticos es una problemática mundial, la cual ha provocado una rápida propagación de enfermedades infecciosas. El incremento de bacterias multirresistentes a antibióticos (RAM) tiene varias desventajas, las principales son los pocos estudios relacionados a la presencia de multirresistencia bacteriana en ríos de Quito y las escasas alternativas para eliminar estos microorganismos problemáticos en estas aguas, es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto del aceite esencial de eucalipto sobre el crecimiento de comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en ríos de Quito.

Para efectos de este estudio se tomaron muestras de diferentes ríos de Quito, las cuales pasaron por un periodo de aclimatación y luego a un sistema tecnológico (quimioestado simple de una etapa) para aislar comunidades bacterianas con una velocidad específica de crecimiento media ($0,24h^{-1}$). Posteriormente, las comunidades bacterianas presentes en el quimioestado fueron sometidas a un ensayo de susceptibilidad a antibióticos con la intención de detectar si existía o no una susceptibilidad a los antimicrobianos, a continuación se planteó una escala de mayor o igual a 1 no susceptibles y menor a 1 susceptible, finalmente las comunidades bacterianas multirresistentes se sometieron a una prueba de difusión por discos utilizando el aceite esencial de eucalipto a distintas dosis (10 μ L, 15 μ L y 20 μ L).

Los antibióticos a los cuales las comunidades bacterianas presentaron susceptibilidad fueron la ampicilina, la gentamicina, la ceftriaxona y la amikacina y no presentaron susceptibilidad hacia la penicilina. Los resultados permitieron determinar que esta nueva tecnología no tiene la capacidad de aislar comunidades bacterias multirresistentes pero si aquellas resistentes a la penicilina. Al exponer la muestra al aceite esencial de eucalipto no se encontró inhibición bacteriana a pesar del alto contenido de fenoles y monoterpenos que poseen los aceites esenciales.

Palabras clave: Comunidades bacterianas, multirresistencia, quimioestado, aceite esencial, antibióticos.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Abstract

Antibiotic resistance is a global problem that has caused the rapid spread of infectious diseases. The increase in multi-resistant bacteria to antibiotics (RAM) has several disadvantages. The main ones are the few studies related to the presence of bacterial multi-resistance in rivers of Quito and the few alternatives to eliminate these problematic microorganisms in these waters, which is why in In this study, the effect of eucalyptus essential oil on the growth of multi-resistant bacterial communities to antibiotics present in Quito rivers was evaluated.

For this study, samples were taken from different rivers in Quito, which underwent acclimatization and then a technological system (simple one-stage chemostat) to isolate bacterial communities with a specific average growth rate (0.24h^{-1}). Subsequently, the bacterial communities in the chemostat were subjected to an antibiotic susceptibility test to detect whether or not there was susceptibility to antimicrobials, then a scale of greater than or equal to 1 not susceptible and less than one was raised. One susceptible, finally, the multi-resistant bacterial communities were subjected to a disk diffusion test using eucalyptus essential oil at different doses ($10\mu\text{L}$, $15\mu\text{L}$, and $20\mu\text{L}$).

The antibiotics to which the bacterial communities presented susceptibility were ampicillin, gentamicin, ceftriaxone, and amikacin, and they did not present susceptibility to penicillin. The results showed us that this new technology could not isolate multi-resistant bacterial communities but those resistant to penicillin. When exposing the sample to eucalyptus essential oil, no bacterial inhibition was found despite the high content of phenols and monoterpenes that essential oils possess.

Keywords: Bacterial communities, multiresistance, chemostat, essential oil, antibiotics.

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Introducción

Globalmente, se entiende como aguas residuales al tipo de agua que ha perdido su valor inmediato; es decir, aquellas que se han visto afectadas de manera negativa por la influencia humana y sus actividades cotidianas. (Velasquez, 2016). La falta de plantas de tratamiento para aguas residuales tanto en las ciudades como en las industrias ha ocasionado grandes desechos de agua contaminada que al final del día son descargadas en ríos, lagos, suelos y/o mares, a través de las alcantarillas, pozos sépticos y rellenos sanitarios (Barreto, 2020), lo cual repercute de manera negativa en la productividad económica, la salud humana, y en la calidad ambiental; adicionalmente, la multirresistencia a antibióticos (RAM) constituye un problema creciente y de interés científico en la salud pública mundial porque impide la capacidad de controlar enfermedades infecciosas ocasionando que aumente la tasa de mortalidad y morbilidad, reduce la eficacia terapéutica, permite la transmisión de microorganismos infecciosos de un individuo a otro, incrementa los costos y el tiempo de tratamiento y amenaza la seguridad sanitaria. (German & Aguilar, 2016). La aparición de bacterias resistentes se produce a través de cambios en la secuencia cromosómica (mutaciones) y por la transmisión del material genético que se da de generación en generación o por medio de plásmidos u otro material genético; esto último no solo permite la transmisión entre bacterias de la misma especie sino entre varias lo que provoca que las bacterias puedan adquirir resistencia a uno o varios antibióticos incluso sin haber estado en contacto con estos. (Fernandez, López, Ponce, & Manchado, 2003)

Por otro lado, las bacterias multirresistentes a antibióticos presentes en aguas residuales son un problema grave debido a los daños que provocan tanto a la salud como al ambiente; los principales efectos que causa el no tratar aguas residuales es la eutrofización, disminución de la biodiversidad, pérdida de los cuerpos de agua y toxicidad crónica hacia plantas y animales que han sido expuestos a fármacos y bacterias que están presentes en el agua, esto se debe a

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

que la mitad de los antibióticos administrados a seres humanos y animales se excreta de forma activa en el agua a través de desechos tales como la orina, heces, entre otros, y entran en contacto con bacterias presentes en los ríos lo cual genera una multirresistencia. (Acevedo, Severiche, & Morales, 2015).

De acuerdo con *Basilio & Diego (2021)* el 80% de las aguas residuales retornan al ambiente sin ser tratadas o reutilizadas, representando un grave problema ambiental. En los últimos años el mundo ha mostrado su preocupación frente a esta problemática y ha tratado de resolver dificultades relacionadas con la disposición de los efluentes líquidos que provienen del uso comercial, industrial y doméstico. (Barreto, 2020).

Ecuador se encuentra en un lugar intermedio en cuanto a los servicios de agua potable y alcantarillado; sin embargo, existe mucha inequidad entre las zonas rurales y urbanas ya que en los últimos años la cobertura urbana ha aumentado y la rural ha disminuido. La mayoría de sistemas de agua potable dependen de un redireccionamiento de aguas que provienen de manantiales y van directo hacia las comunidades, estas aguas cuentan solo con un tratamiento de desinfección (Lopez, 2011).

El tratamiento de aguas residuales tanto en los sectores urbanos como en los rurales de la ciudad de Quito se sustenta bajo el “Programa para la descontaminación de Ríos de Quito” propuesto por la EPMAPS que tiene como objetivo principal efectuar un manejo adecuado e integral de los residuos líquidos generados por la población y las industrias mediante su interceptación, conducción y tratamiento de las aguas residuales urbanas; de manera que se minimicen los impactos que en la actualidad vienen dados por las descargas directas a los ríos y quebradas (EPMAS, 2020); sin embargo, de acuerdo con *García, (2018)* en Quito, las zonas con mayor densidad poblacional que disponen de cobertura de alcantarillado implementan

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

tratamientos como el uso de lodos activados, lagunas de oxidación y filtros anaerobios, y en zonas que no disponen de alcantarillado se presentan tecnologías poco convencionales como humedales artificiales y biofiltros con la finalidad de suplir el tratamiento principal; sin embargo, solo se alcanza a tratar el 3,5% de aguas residuales y el restante que no alcanza a ser tratado desemboca directamente en los ríos; además, ninguno de estos tratamientos soluciona la problemática presencia de microorganismos RAM en los ríos de Quito.

Es por ello que en el presente trabajo se determinó si el aceite esencial conocido popularmente como Eucaliptol, extraído de hojas de residuos agroindustriales de eucalipto, fue capaz de eliminar comunidades bacterianas resistentes a antibióticos, esto sería posible gracias a que los aceite esenciales y componentes del eucalipto tienen propiedades antimicrobianas. Tanto la actividad bactericida como antifúngica del aceite esencial está relacionada con los fenoles y monoterpenos que poseen las hojas, estos compuestos son capaces de interactuar de manera directa con el citoplasma del patógeno. Gracias a su hidrofobicidad el eucaliptol es capaz de incorporarse a los lípidos que posee la membrana celular de la bacteria y destruirla. (Montero M. , Morocho, Áviles , Carrasco, & Erazo, 2019).

Como hipótesis del trabajo se esperó que el aceite esencial obtenido de los residuos de hojas de eucalipto elimine las comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos que están presentes en aguas residuales de ríos de Quito.

El objetivo general fue determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto sobre el crecimiento de comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos que están presentes en ríos de Quito. Los objetivos específicos fueron (1) aislar comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en los ríos de la ciudad de Quito, (2) establecer un proceso de extracción del aceite esencial de eucalipto usando la técnica de

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

destilado por arrastre de vapor de agua y por último (3) determinar la actividad bactericida del aceite esencial frente al crecimiento de comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en aguas residuales usando la técnica de difusión por disco.

Materiales y métodos

Área de estudio

- Área general: Distrito Metropolitano de Quito.
- Área específica: Calle Alberto Einstein y 5ta Transversal. Carcelén, Quito – Ecuador.

Fase de campo

Recolección del material vegetal.

La recolección de material vegetal se realizó en la Universidad Internacional SEK en el campus Miguel de Cervantes. Se recolectó aproximadamente 1 kg de material vegetal de *Eucalyptus Globulus* distribuido entre hojas jóvenes, hojas adultas y ramas.

Recolección del agua residual.

La recolección del agua residual se realizó en varios ríos de la ciudad de Quito (San Pedro, Machángara y Guayllabamba) y se almacenó en botellas de plástico para posteriormente inocular la muestra al biorreactor.

Estos ríos fueron escogidos por su alto índice de contaminación. (Machado, 2020)

Fase de laboratorio

Lavado y Secado del material Vegetal

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Una vez recolectadas las hojas y ramas de eucalipto, se lavaron con agua común y se dejaron secar en la sombra por aproximadamente una hora, para después meterlas a la estufa durante 24h a una temperatura de 80°C. Cabe aclarar que de acuerdo con *Iosu, (2010)* la temperatura de secado ideal es a 50°C, pero debido a temas de disponibilidad y tiempo se optó por usar una temperatura más alta a la indicada.

Una vez que el material vegetal estuvo seco se trituró usando una procesadora (con la finalidad de reducir el tamaño de las hojas), se pesó en la balanza analítica y se almacenó.

Ensayo para la extracción del aceite esencial de las hojas del Eucalyptus globulus.

La extracción del aceite esencial se realizó mediante destilación por arrastre con vapor de agua usando como solvente agua destilada, a una temperatura de extracción de 100 °C. Esta técnica fue seleccionada ya que, de acuerdo con *Cedeño, y otros. (2018)* de esa manera se obtiene mayor rendimiento que con la técnica de solventes orgánicos, esto es gracias a que el producto obtenido con el método de destilación usando solventes orgánicos es mucho más impuro y puede contener gran cantidad de trazas de solventes que pueden perjudicar la separación.

La tecnología empleada en la obtención de aceites esenciales se conoce como destilación por arrastre de vapor. La extracción ocurre cuando el vapor entra en contacto con las células de la planta, lo que provoca que estas se rompan, liberen su esencia y queden atrapadas en el vapor de agua que luego se condensan en el destilador. Se considera que el mejor rendimiento se obtiene mediante esta técnica, debido a que permite obtener un producto mucho más puro. (*Cedeño, y otros, 2018*).

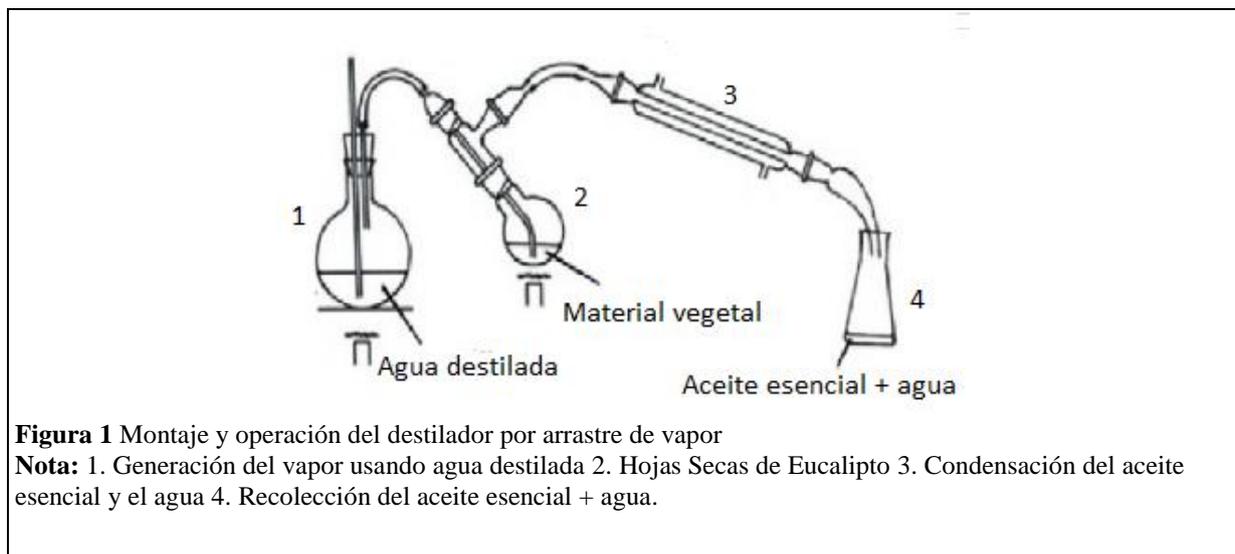
Para armar el destilador fueron necesarios los siguientes materiales y equipos:

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Tabla 1.- Equipos y materiales para la destilación (Tomado de: (Patiño, Augusto , & Jose, 2014, pág. 5)

Equipos	Materiales
Decantador	Material Vegetal (Hojas de Eucalipto)
Condensador	Agua Destilada
Mangueras de goma	
Matraz elermeyer	
Matraz tipo Balón de fondo redondo	
Plancha de calentamiento	
Probeta	
Tubos para destilación	
Perlas de ebullición	
Alargadera de 24/40	

Ilustración 1.- Montaje y operación del destilador por arrastre de vapor



Fuente: (Kasuma, 2016)

Una vez se logró obtener el aceite esencial fue necesario usar un decantador para separar el agua del aceite esencial. Finalmente, el aceite esencial se almacenó en el refrigerador a una temperatura de 4°C en un frasco de color ámbar para la conservación de sus propiedades.

Elaboración del medio de cultivo.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

La formulación del medio de cultivo se realizó bajo las recomendaciones de Acevedo *et al.*, (2002). La cantidad de nutrientes se definió usando la siguiente ecuación (1):

Ecuación 1.- Ecuación para elaborar un medio de cultivo complejo

$$S_0 = SF + \frac{XF - X_0}{\frac{Yx}{s}}$$

Obtenido de: (Acevedo *et al.*, 2002).

Donde:

S₀: Concentración inicial del nutriente

SF: Concentración final del nutriente

XF: Concentración final de los microorganismos

X₀: Concentración final de los microorganismos en el cultivo antes de que empiece a operar

Y x/s: Rendimiento del sustrato en biomasa

Los nutrientes utilizados y las cantidades necesarias para el medio de cultivo utilizado para la aclimatación, alimentación del quimiostato y el sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos se pueden observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2.- Composición del medio de cultivo

Medio de cultivo (1L)	
Componentes	Cantidad
Fuente de carbono: Sacarosa	32,16 g
Fuente de nitrógeno: Extracto de Quínoa	0,6 mL
Buffer fosfato: KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
pH 7	

Nota: Para la preparación del extracto de quínoa pesar 21,25 g de quínoa, hervir en 30 ml, licuar y tamizar. Tomado de Acevedo *et al.*, (2002).

Elaborado por: (La autora, 2023).

Periodo de Aclimatación.

Para el periodo de aclimatación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL y en cada uno se colocó un 10% de inóculo (25 mL), el mismo que fue obtenido mediante una mezcla total de todas las muestras de ríos recolectadas y se completó con medio de cultivo hasta los 250 mL. Esta fase permitió el desarrollo de la comunidad bacteriana presente en los ríos, para posteriormente poder identificar la presencia de bacterias con multirresistencia a antibióticos.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

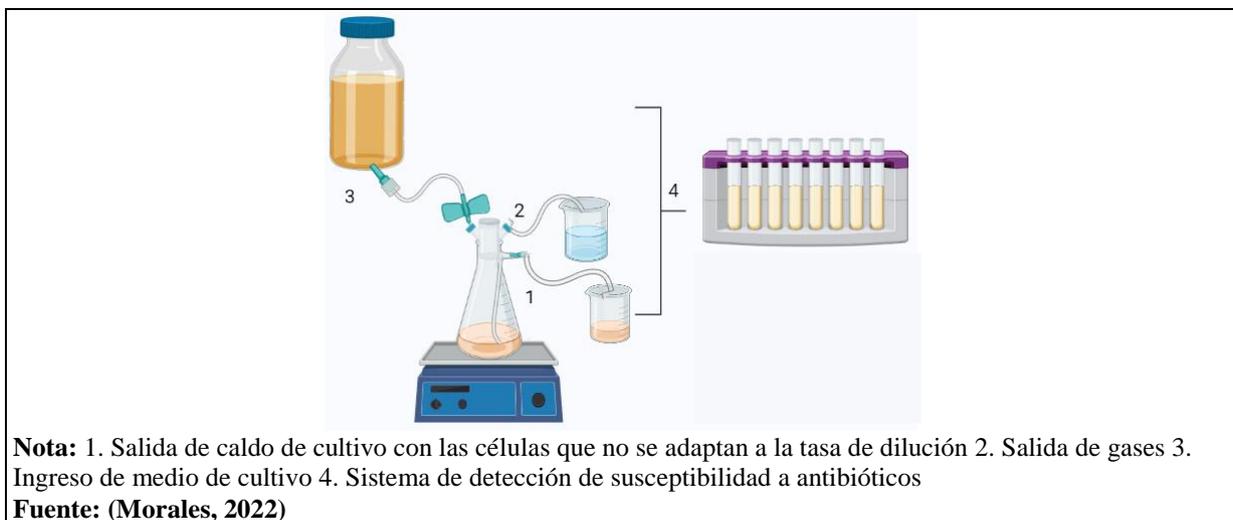
Los parámetros ambientales tomados en cuenta fueron: incubación a 30°C por 72 horas, sin agitación y teniendo en cuenta que es un cultivo anaerobio el matraz se aforó por completo.

Montaje, puesta en marcha y operación del sistema: Quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.

El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo en un quimiostato simple de una etapa. Las bacterias que ingresaron son las que estaban presentes en las aguas residuales recolectadas anteriormente y que provienen del periodo de aclimatación.

El quimiostato fue construido en condiciones anaerobias utilizando materiales de laboratorio, como: matraces de 500 mL con dos olivas a los costados, a las cuales se conectaron dos mangueras, la primera permitió la salida del caldo de cultivo (residuos) y la segunda estaba conectada a un matraz que contenía una solución saturada de Sulfato de cobre, esto para encapsular a los gases producidos por el ensayo. En las tapas de los matraces se colocó una oliva que permitía el ingreso constante del medio de cultivo provenientes de botellas de plástico de un galón. El montaje del quimiostato se observa en la **Ilustración 2**.

Ilustración 2.-Montaje y operación del quimiostato simple de una etapa, y el sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.



EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Una vez construido el quimiostato, se montó sobre una planta de calentamiento a 35°C, con una agitación de 150 RPM. Como primer paso, el crecimiento de las bacterias se desarrolló en un cultivo por lote; es decir, sin entrada ni salida de fluidos, se aforó el matraz con 450 mL de medio de cultivo y 50 mL de inóculo proveniente del periodo de aclimatación para que las bacterias tengan un crecimiento óptimo, una vez llegada a la fase exponencial del cultivo se inició el flujo de entrada y salida de medio del biorreactor, esto es debido a que en esa fase las bacterias están en condiciones adecuadas para tolerar el estrés asociado al ingreso de una variable, en este caso sería el ingreso de medio al biorreactor. Una vez ingresado el flujo, el cultivo por lote pasa a ser un cultivo continuo. En el presente proyecto se trabajó con un flujo específico medio, es decir, se operó el quimiostato a una sola tasa de dilución [$D = 0.24 \text{ h}^{-1}$], teniendo en cuenta que una tasa de dilución media o alta son de mayor interés debido a que las bacterias con una velocidad específica de crecimiento rápido son las problemáticas a nivel de salud.

En el cultivo continuo se midió el tiempo de residencia para determinar que las bacterias ya llegaron a un estado estacionario (son necesarios tres tiempos), para ello se midió la concentración de la biomasa por el método de densidad óptica. Cuando los valores tomados fueron iguales o similares, se asumió que las bacterias ya habían llegado a un estado estacionario.

La detección de bacterias multirresistentes a antibióticos se llevó a cabo en tubos de ensayo los cuales contenían medio de cultivo, inóculo tomado de los quimiostatos y las diferentes dosis de cada antibiótico para 48 horas. Las dosis para el ensayo fueron tomadas usando la concentración mínima inhibitoria y la concentración de cada antibiótico como se evidencia en la **ecuación 2**, la información de la CMI de cada antibiótico fue extraída del “*Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)*”.

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Ecuación 2.- Ejemplo de cálculo de dosis de antibióticos

CMI: 24mg/mL

$$\frac{24 \text{ mg}}{\text{mL}} \times \frac{5 \text{ mL}}{100000 \text{ mg}} \times \frac{6000 \text{ uL}}{1 \text{ uL}} = 7,2 \text{ } \mu\text{L}$$

Notas: El dato de los 24 mg/mL se obtuvo del “*Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)*”.

Las dosis de antibióticos necesarias para este ensayo se pueden visualizar en la **tabla 3.**

Tabla 3.- Ensayo de detección de multirresistencia a antibióticos en comunidades bacterianas

Antibiótico	Clase	Medio de Cultivo (μL)	Inóculo (μL)	Dosis (μL)
Gentamicina	Amino glucósidos	3775	2000	225
Ceftriaxona	Cefalosporina	3520	2000	480
Amikacina	Amino glucósido	3997	2000	3
Ampicilina	Amino penicilina	3994	2000	6
Penicilina	Beta-Lactámico	3993	2000	7
Control	-	4000	2000	-

Nota: Los antibióticos fueron de uso inyectable y en su mayoría transparentes. Información tomada de (OMS, 2018) y (CLSI, 2022).

Elaborado por: (La autora, 2023).

Estos tubos fueron incubados por 48 horas, a 37°C y se evaluó el crecimiento celular usando la técnica de densidad óptica antes y después de la incubación. Con la densidad óptica se calculó la ΔOD para evaluar si hubo o no crecimiento bacteriano antes y después de la incubación. Y el índice de susceptibilidad se calculó dividiendo la ΔOD_{tubo} para la ΔOD_{control}.

Para determinar si la comunidad bacteriana fue o no susceptible al antibiótico, se tomó como escala de interpretación lo siguiente: si el índice es mayor o igual a uno no es susceptible y si es menor a uno quiere decir que es susceptible al antibiótico. La ventaja de esta metodología

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

es que permite un análisis de multirresistencia a antibióticos para comunidades bacterianas; cabe recalcar que la efectividad de este ensayo fue comparada anteriormente por *Morales, L., (2022)*.

Las ecuaciones utilizadas para evaluar la resistencia a los antibióticos se muestran en la **ecuación 3** y **ecuación 4**.

Ecuación 3.- ΔOD

$$\Delta OD = \frac{OD \text{ después de Incubar}}{OD \text{ antes de Incubar}}$$

(Morales, 2022)

Ecuación 4.- Índice de susceptibilidad

$$\text{Índice de susceptibilidad} = \frac{\Delta OD_{\text{tubo}}}{\Delta OD_{\text{control}}}$$

(Morales, 2022)

Bioensayo

Para este ensayo fue necesario exponer a las bacterias resistentes a antibióticos obtenidas de las aguas residuales de Quito al aceite esencial extraído de las hojas de eucalipto y evaluar si existió o no acción bactericida. Los aceites esenciales son considerados lípidos que no están relacionados con ácidos grasos, por lo cual son insolubles en agua, pero si volatilizables con vapor (Diaz & Martínez, 2013), con lo que, para lograr la extracción del aceite esencial, se optó por usar la técnica de destilación por arrastre de vapor mencionada anteriormente.

El bioensayo se realizó por triplicado mediante un antibiograma modificado o prueba de difusión por discos, para ello se cultivaron las bacterias en cajas Petri que contenían medio Müller - Hinton con una concentración del 1,5% p/v de agar y se añadieron los discos que previamente fueron sumergidos en el aceite esencial a distintas dosis (10, 15 y 20 μ L), y dos discos adicionales los cuales fueron el control positivo (sulfato de cobre) y el control negativo

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

(Agua destilada) y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. (Montero M., et al, 2019). Después de las 48 horas se midió el diámetro de los halos formados con ayuda de una escuadra y finalmente se sacó un promedio de los mismos.

Análisis de Resultados

Los datos obtenidos se analizaron a través de estadística descriptiva. En el presente estudio se trabajó el quimiostato simple de una etapa por duplicado y en el caso del ensayo del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos se utilizaron tres réplicas por tratamiento para poder obtener el índice de susceptibilidad. Una vez obtenidos todos los datos de densidad óptica de ambos quimiostatos, se obtuvo el promedio y la desviación estándar con la finalidad de comparar el crecimiento o la inhibición bacteriana antes y después de la incubación. Finalmente, se determinó si había o no susceptibilidad a los antibióticos.

Por otro lado, para el ensayo de difusión por disco se utilizaron 3 réplicas por dosis, después de las 48 horas se midieron los halos de inhibición y se sacó un promedio para obtener la inhibición real de cada tratamiento.

Resultados

Aislamiento de comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en los ríos de la ciudad de Quito.

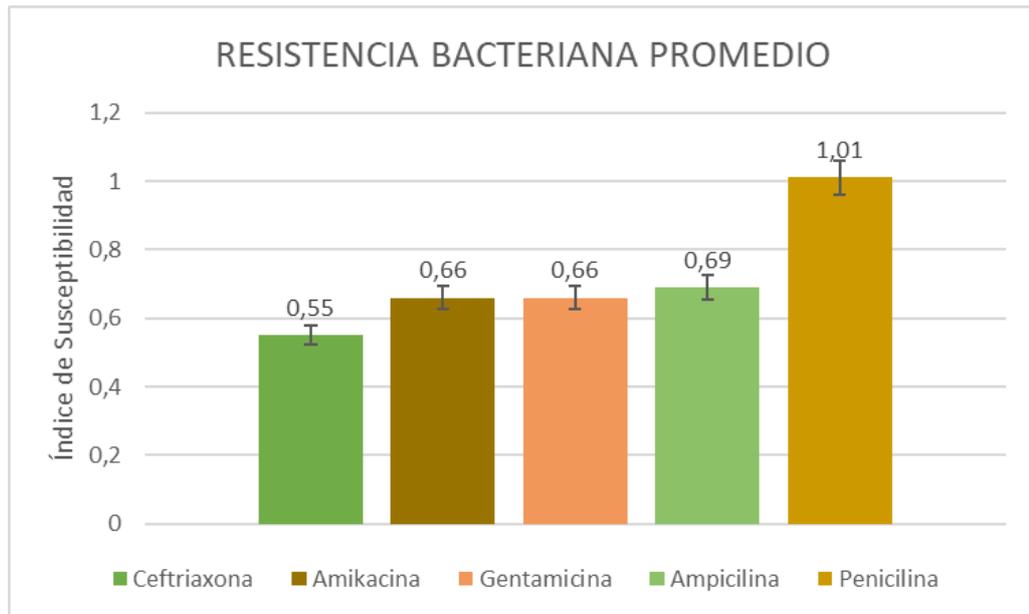
Montaje, puesta en marcha y operación del sistema: Quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.

Los sistemas de cultivo continuo o también conocidos como quimiostatos generan un entorno constante el cual obliga a las células bacterianas a crecer en una tasa de crecimiento constante. (Tonoyan *et al.*, 2019). Los resultados muestran que las

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

comunidades bacterianas no son susceptibles a la penicilina, con un índice de susceptibilidad de 1,01 según la escala de susceptibilidad a las 48 horas comparadas con el control, como se muestra en la **Ilustración 3**.

Ilustración 3.- Índice de susceptibilidad promedio



Elaborado por: (La autora, 2023).

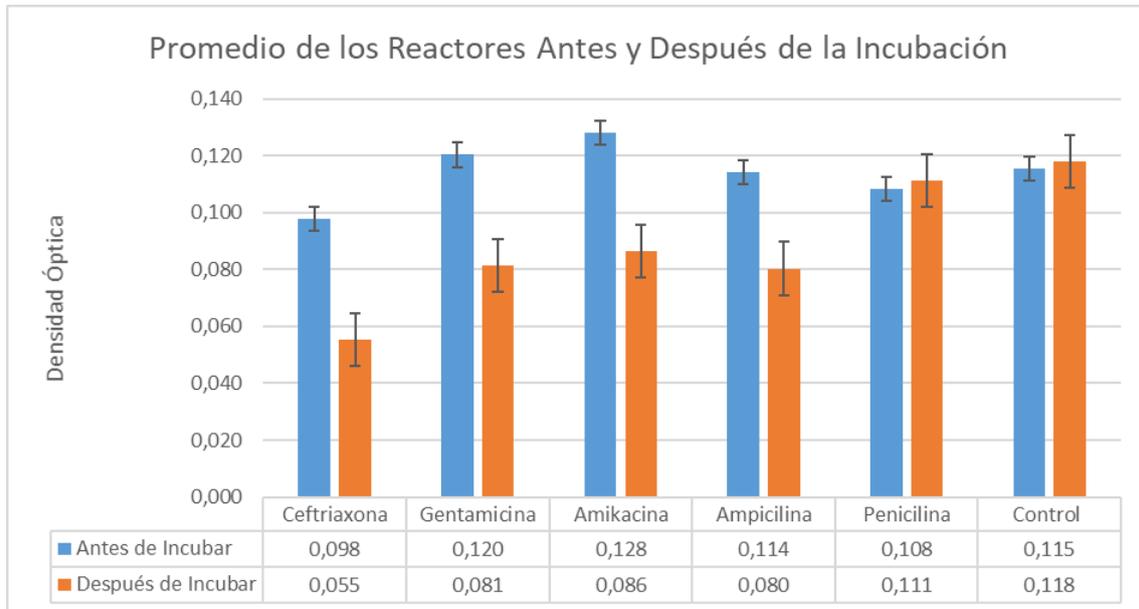
Análisis Estadístico

Una vez sacado el promedio entre ambos quimiostatos se graficaron los datos y se observó que únicamente el tubo que contenía penicilina tenía una cercanía al control antes y después de la incubación, lo cual es otro indicio de la presencia de bacterias RAM, adicional, se calculó la desviación estándar antes y después de la incubación y se evidenció una inhibición bacteriana en cuatro de los cinco antibióticos usados, lo cual indica que en la muestra de agua residual extraída de los ríos de Quito existe una susceptibilidad bacteriana a la ceftriaxona, gentamicina, amikacina y ampicilina, por otro lado, demostró que no es susceptible a la penicilina. Adicional; se observó una diferencia entre reactores lo cual nos indica que las réplicas no se parecen entre sí, sin embargo, se considera un comportamiento normal ya que muchas veces en los reactores

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

pueden existir variaciones de temperatura, agitación, entre otros. Lo mencionado anteriormente se puede observar en la **Ilustración 3** e **Ilustración 4**.

Ilustración 4.- Promedio de los reactores antes y después de la incubación.



Elaborado por: (La autora, 2022).

Proceso de extracción del aceite esencial de eucalipto usando la técnica de destilado por arrastre de vapor de agua.

Ensayo para la extracción del aceite esencial de las hojas del Eucalyptus globulus.

Los aceites esenciales son sustancias naturales volátiles, de composición compleja, con agradable aroma y son extraídos mediante múltiples técnicas. (Cedeño, y otros, 2018).

Usando el método de extracción por arrastre de vapor se logró obtener un aproximado de 3 mL de aceite esencial de eucalipto puro. Para ello se requirió un total de 0,982 kg de masa vegetal (hojas secas de eucalipto) y 11 litros de agua destilada.

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

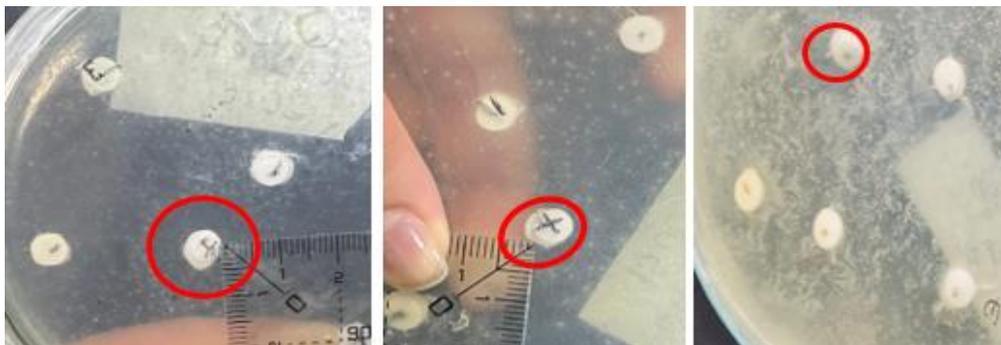
Determinación de la actividad bactericida del aceite esencial frente al crecimiento de comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en aguas residuales

Bioensayo

Una vez cultivadas las placas con el inóculo que contenía penicilina se colocaron los discos sumergidos en distintas dosis de aceite esencial, las placas se incubaron durante 48 horas, al cabo de ese tiempo se revisaron y se pudo evidenciar el halo únicamente en el control positivo; es decir, en el disco que contenía sulfato de cobre y no se observó ninguna inhibición usando el aceite esencial. Adicionalmente, se observó que el tamaño del halo dependía de la dosis que era incorporada en el disco (10, 15 y 20 μL). El halo que contenía la dosis de 20 μL tenía un diámetro de 0,6 cm a diferencia del halo que contenía la dosis 15 μL el cual presentaba un diámetro de 0,3 cm; sin embargo, la placa que contenía una dosis de 10 μL no mostró una inhibición significativa.

Las medidas fueron obtenidas midiendo el diámetro de los halos con ayuda de una escuadra. Los halos obtenidos se pueden observar en la **Ilustración 5**.

Ilustración 5.- Halos formados del control positivo con dosis de 20, 15 y 10 μL , respectivamente.



Elaborado por: (La autora, 2023).

Notas: La primera imagen corresponde a la dosis de 20 μL , la segunda corresponde a la dosis de 15 μL y la última imagen corresponde a la dosis de 10 μL .

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Discusión de Resultados

En el país las aguas residuales generadas se descargan directamente en los ríos y el mar sin ningún tratamiento previo; en otras palabras, las aguas residuales tratadas son únicamente del 3,5% (*EPMAPS, 2022*), es por ello que las bacterias que presentan resistencia a antibióticos se han convertido en un problema de interés sanitario ya que los antibióticos son ingeridos de manera inadecuada o excesiva por el paciente y después regresan a los ríos de forma activa a través de las heces o la orina lo cual genera daños tanto a la salud de la persona como al ambiente. Es por esto que un uso adecuado de antibióticos es importante en el manejo de la resistencia, ya que habrá un menor desgaste del fármaco. (*Burnham, et al., 2017*).

Los antibióticos seleccionados para este trabajo fueron la gentamicina, ceftriaxona, amikacina, ampicilina y penicilina. Se eligieron por ser los que se encuentran en estado crítico; es decir, son antibióticos únicos para tratar infecciones bacterianas graves en humanos de acuerdo con la (*OMS, 2018.*), además de ser los más empleados en casos clínicos de infecciones producidas por bacterias; por otro lado, la presencia de no susceptibilidad hacia la penicilina hace un llamado a tener un control más riguroso en la venta y administración de estos medicamentos, así como en el tratamiento de aguas residuales.

La penicilina ha sido el tratamiento de elección para las enfermedades neumocócicas gracias a su excelente actividad bactericida y a las bajas concentraciones inhibitorias mínimas ($CMI \leq 0,01 \mu\text{g/ml}$); sin embargo, con el paso del tiempo el CMI de este antimicrobiano ha ido aumentando. Para efecto de este trabajo se utilizó una CMI de $24\mu\text{g/mL}$ (*CLSI, 2022*), lo cual nos indica que la resistencia a la penicilina ha ido creciendo de manera exponencial con el paso del tiempo (*Tubau, et al., 2003*), esto se debe a la producción de la enzima penicilinasas por parte de las bacterias lo que genera que se inactive la penicilina G, carboxipenicilina y la

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

ureidopenicilina presentes en los fármacos. (Castellano & Perozo, 2010). Adicionalmente, se cree que la razón por la cual no hubo susceptibilidad a la penicilina en el presente estudio es porque, de acuerdo con *Gómez, et al., (2015)* la penicilina es considerada un bactericida parcial debido a que su efecto bactericida ocurre en concentraciones 5 veces mayores a la CMI, lo cual representó un problema, ya que el ensayo de antibióticos se realizó usando la concentración mínima inhibitoria para el fármaco por lo que no se consideró elevar la dosis como sugiere *Gómez, et al., (2015)*.

Por estas razones y tomando en cuenta la inexistencia de tratamientos para eliminar bacterias resistentes a antibióticos presentes en aguas residuales se decidió generar un tratamiento de origen natural frente a esta problemática. El aceite esencial de eucalipto está constituido por terpenos con actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, insecticida y antiviral. (*Montero et al., 2019*); sin embargo, en la prueba de difusión por disco, no se pudo evidenciar acción antimicrobiana, lo cual nos permite suponer que el aceite esencial de eucalipto no es efectivo como tratamiento para comunidades bacterianas sino solo para cepas específicas (*Morocho, 2018*). Por otro lado, *Montero, M et al., (2019)*. indican que las dosis utilizadas fueron superiores (300, 600 y 900 μL) a las usadas en esta investigación (10, 15 y 20 μL), lo que sugiere que en este trabajo hubo una menor presión selectiva y por ende una inhibición nula por las dosis tan bajas de aceite esencial que se utilizaron, por otra parte, *Argote, et al., (2017)* sugieren realizar el ensayo en una caja de ELISA y usar el aceite esencial con un emulsionante (Tween 20) con las siguientes proporciones 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3 para mejorar la actividad bactericida y también para que sea más sencillo notar las inhibición bacteriana; nuevamente las dosis usadas fueron mayores a las dosis usadas en este trabajo.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Conclusiones

- La extracción del aceite esencial de eucalipto mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor resultó efectiva para extraer un compuesto puro.
- El quimiostato simple de una etapa seguido del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos muestra ser eficaz para detectar comunidades bacterianas anaerobias no susceptibles a antibióticos, ya que en este estudio se logró detectar varias comunidades bacterianas anaerobias con resistencia a la penicilina.
- Las dosis usadas de aceite esencial no fueron efectivas ya que son consideradas dosis muy bajas, por lo que no generan una presión selectiva y no producen una inhibición bacteriana.
- El aceite esencial de eucalipto utilizado como tratamiento frente a las comunidades bacterianas no susceptibles a antibióticos mostró no ser efectivo para inhibir dichas comunidades; por tanto, la hipótesis de que el aceite esencial obtenido de los residuos de hojas de eucalipto elimina las comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos presentes en aguas residuales de ríos de Quito no se cumplió.

Recomendaciones

- Para la destilación por arrastre de vapor se recomienda sustituir las perlas de ebullición por un material más pesado como trozos de cerámica para evitar que el agua pase directamente al matraz que contiene el material vegetal y pase únicamente el vapor de agua, también se debe tener en cuenta la acumulación de presión dentro del proceso para evitar accidentes por lo que se recomienda trabajar con un sistema semi-abierto.
- Trabajar con otro tipo de aceite esencial como sería el caso de aceites esenciales de frutos cítricos ya que su extracción también es económicamente sostenible y la cáscara

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

de las frutas genera un residuo agroindustrial que se puede aprovechar y de esa manera evaluar si es capaz de eliminar comunidades bacterianas multirresistentes a antibióticos o no.

- Se recomienda trabajar con dosis de penicilina 4 o 5 veces mayores que su concentración mínima inhibitoria con la intención de evaluar si a concentraciones más altas se elimina la resistencia a la penicilina en las comunidades bacterianas.

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Referencias

- Acevedo, R., Severiche, C., & Morales, J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos.
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluation of the inability capacity of essential oils in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *ISSN*.
- Barreto, E. (2020). VERTIMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Y SU INFLUENCIA EN LA CONTAMINACIÓN DEL RÍO HUALLAGA – HUÁNUCO 2019. 34. Obtenido de <https://www.iagua.es/blogs/hector-rodriguez-pimentel/aguas-residuales-y-efectos-contaminantes>
- Basilio, C., & Diego, V. (2021). EVALUACIÓN DE UN ECO-SISTEMA DE BIOFILTRACIÓN Y HUMEDAL PARA AGUAS GRISES DEL RECINTO “LA CABUYA”, CANTÓN BALZAR .
- Bonifaz, E. (2018). EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL DE ORIGEN HUMANO Y ANIMAL EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO GUAYLLABAMBA MEDIANTE INDICADORES VIRALES.
- Burnham, C., leeds, J., Nordmann, P., O’Grady, J., & Patel, J. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. *CORE*.
- Carey-Ann D. Burnham, Jennifer Leeds, Patrice Nordmann, Justin O’Grady, & Jean Patel. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. *CORE*.
- Castellano, M., & Perozo, A. (2010). Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus.
- Cedeño, A., Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., & Riera, M. (2018). Comparison of distillation methods for obtaining eucalyptus essential oil. *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*.
- Cedeño, A., Moreira, C., Jhonny , M., Muñoz, A., Pillasaguay, S., & Riera, M. (2018). COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DESTILACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO. *Colón Ciencias, Tecnología y Negocios Vol.6, No.1, 2019*.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

- Coral, K., & Moreta, A. (2020). Modelo Estadístico de ruido ambiental en la ciudad de Quito. *Novedades de ciencia e ingeniería*, 38-55.
- Diaz, J., & Martínez, J. (2013). CANTIDAD Y CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES EN HOJAS DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO *Eucalyptus* - EL MANTARO.
- Fernandez, F., López, J., Ponce, M., & Manchado, C. (2003). RESISTENCIA BACTERIANA.
- García, J. (2018). Propuesta metodológica de indicadores de evaluación de sustentabilidad de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas orientados al sector rural.
- German, C., & Aguilar, L. (2016). RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: MICROORGANISMOS MÁS RESISTENTES Y ANTIBIÓTICOS CON MENOR ACTIVIDAD. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII* (621) 757 - 763.
- Gómez, J., García, E., & Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica.
- Guiñez, G., Silva, G., Urbina, A., & Gonzales, M. (2016). ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens*.
- Iosu, L. (2010). INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE SECADO EN LA CALIDAD DE LAS HOJAS DE *Cymbopogon Citratus* D.C. STAF.
- Kasuma, H. (2016). Comparison of Two Isolation Methods for Essential Oils from Orange Peel (*Citrus auranticum* L) as a Growth Promoter for Fish: Microwave Steam Distillation and Conventional Steam Distillation.
- Leiva, J., & Del Pozo, J. (2017). Bacilos gramnegativos de crecimiento lento: grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella*. *Elsevier*.
- Litegebew, G., Aschalew, B., Eneyew, G., & Misrak, A. (2022). Ceftriaxone resistance among patients atGAMBY teaching general hospital. *Scientific Reports*.
- Llive, P. (2019). *Chavez Solutions*. Obtenido de <https://chavezsolutions.com/noticias-ambientales/aguas-servidas-un-riesgo-para-los-rios-del-pais/#:~:text=El%20Agua%20de%20Quito,-El%20agua%20de&text=Estas%20aguas%20residuales%20causan%20graves,resistan%20ante%20las%20nuevas%20condiciones>.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

- Lopez, J. (2011). Evaluación de la eficiencia de un reactor anaeróbico de flujo ascendente y manto de lodos UASB para el tratamiento de aguas residuales – escala laboratorio.
- Machado, J. (13 de Febrero de 2020). Seis ríos de Quito presentan problemas de contaminación. *Primicias*.
- Montero, M., Morocho, M. J., Avilés, D., Carrasco, Á., & Erazo, R. (2019). Antimicrobial efficacy of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus* spp) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains.
- Montero, M., Morocho, M. J., Avilés, D., Carrasco, Á., & Erazo, R. (2019). Antimicrobial efficacy of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus* spp) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains. *scielo*.
- Montero, M., Morocho, M., Áviles, D., Carrasco, Á., & Erazo, R. (2019). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.
- Montero, M., Morocho, M., Áviles, D., Carrasco, Á., & Erazo, R. (2019). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto. 4.
- Morales, L. (2022). Evaluación de un nuevo sistema tecnológico para la detección de comunidades bacterianas anaerobias con multiresistencia a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento.
- Morocho, M. J. (2018). “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*”.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA.
- OMS. (2018). Antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana.
- OMS. (2020). Resistencia a los antimicrobianos.
- Patiño, L., Augusto, S., & Jose, M. (2014). Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero. *Ciencias Tecnológicas y Agrarias, Handbook*.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Paulina, L. (s.f.). *Chavez Solutions*. Obtenido de <https://chavezolutions.com/noticias-ambientales/aguas-servidas-un-riesgo-para-los-rios-del-pais/#:~:text=El%20Agua%20de%20Quito,-El%20agua%20de&text=Estas%20aguas%20residuales%20causan%20graves,resistan%20ante%20las%20nuevas%20condiciones>.

Rosa Leonor Acevedo Barrios, Carlos Alberto Severiche Sierra, José Del Carmen Jaimes Morales. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos*.

Tubau, F., Liñares, J., & Martín, R. (2003). RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Streptococcus pneumoniae*.

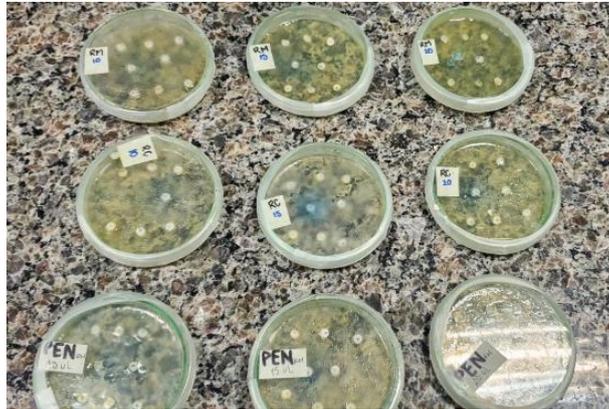
Velasquez, J. (2016). BIOGÁS A PARTIR DE LAS AGUAS RESIDUALES DERIVADAS DE PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN “AGUA DE NEJAYOTE”.

Zarza, L. (s.f.). *iagua*. Obtenido de <https://www.iagua.es/respuestas/que-son-aguas-residuales>

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

ANEXOS

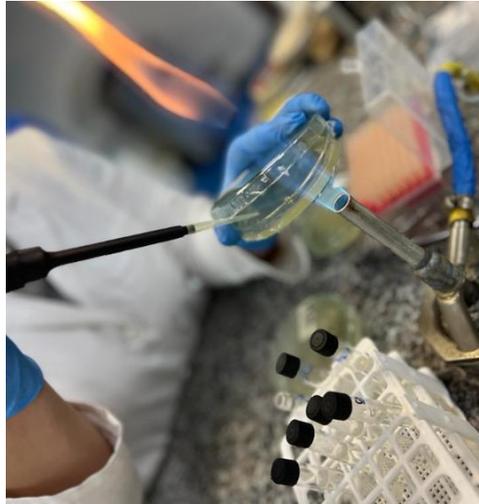
Anexos 1 Bioensayo



Elaborado por: (La autora, 2023).

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Anexos 2 Inoculación de la muestra del tubo de bacterias más penicilina



Elaborado por: (La autora, 2023).

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Anexos 3 Discos artesanales para la prueba de difusión por disco



Elaborado por: (La autora, 2023).

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Anexos 4 Aceite esencial de Eucalipto



Elaborado por: (La autora, 2023).

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE RÍOS DE QUITO

Anexos 5 Montaje del Destilador por la técnica de arrastre de vapor



Elaborado por: (La autora, 2023).