



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de fin de carrera titulado:

Identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos en especies bacterianas presentes en cuerpos de agua ornamentales de los parques “La Carolina” y “El Ejido” del norte y centro del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador.

Realizado por:

Daniela Tapia Neto

Directores del proyecto:

Dámaris Priscila Intriago Baldeón, MSc.

Ing. Manuel Andrés Herrera Yela, MSc.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 27 de agosto del 2025

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Daniela Tapia Neto**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° **1723520779**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Daniela Tapia Neto

C.I.: 1723520779

DECLARACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Declaramos haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Dámaris Priscila

Intriago Baldeón, MSc.

**Master of Science in Molecular
Medicine**

Ing. Manuel Andrés

Herrera Yela, MSc.

Magíster en Biología Computacional

LOS PROFESORES INFORMANTES

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

RUBÉN ALEXANDER MALDONADO ORBE

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa
oral ante el tribunal examinador.

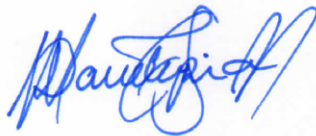
José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Rubén Alexander Maldonado Orbe, MSc.

Quito, 27 de agosto de 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.



Daniela Tapia Neto

C.I.: 1723520779

DEDICATORIA

Especialmente a mi querida abuelita, quien me crió con amor, paciencia y fortaleza y a
quien amo con todo mi corazón.

A mi hermana Diana, por ser compañera de vida y recordarme siempre que los logros se
disfrutan más cuando se comparten.

A mis padres y a mi tía Nancy, por brindarme las herramientas, el cariño, la confianza y
ejemplo, necesarios para alcanzar mis metas.

A mi querido amigo y novio Mateo, quien me apoya siempre.

A mí misma, por el esfuerzo, la disciplina y la determinación que hicieron posible este
logro.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la culminación de este trabajo.

En primer lugar, agradezco a mi familia, mis padres, mi abuelita, mi tía y mis hermanas por su amor incondicional, paciencia y apoyo constante, que me han acompañado en cada etapa de mi formación. A mis amigos y seres queridos, por alentarme en los momentos de mayor exigencia y recordarme la importancia de mantener el equilibrio entre la vida y el estudio.

Extiendo mi gratitud a mis tutores de tesis, MSc. Dámaris Intriago y MSc. Andrés Herrera, por su orientación, compromiso y valiosas observaciones que enriquecieron este proyecto. A mis profesores, Dr. MSc. Jaime Acosta y MSc. Alexander Maldonado quienes participaron y aportaron en este proyecto con su tiempo y conocimientos.

A mi compañero de laboratorio, Sebastián Saavedra, por compartir su tiempo y experiencia, contribuyendo al desarrollo de esta investigación.

Finalmente, agradezco a la Universidad Internacional SEK por brindarme los recursos, el espacio y las oportunidades necesarias para llevar a cabo este trabajo.

A todos ustedes, gracias por creer en mí y por ser parte de este camino.

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

SALUD GLOBAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Y con el financiamiento de la

Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Internacional SEK.

Identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos en especies bacterianas presentes en cuerpos de agua ornamentales de los parques “La Carolina” y “El Ejido” del norte y centro del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador.

Daniela Tapia Neto¹, Damaris P. Intriago-Baldeón (Tutora)^{1,2*}, Andrés Herrera-Yela (Tutor)^{1,2,3*}

¹ Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; daniela.tapia@uisek.edu.ec.

² Grupo de Investigación en Biomedicina Experimental y Aplicada, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; damaris.intriago@uisek.edu.ec; manuel.herrera@uisek.edu.ec.

³ Grupo de Investigación de Enfermedades Emergentes y Desatendidas, Eco-epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; manuel.herrera@uisek.edu.ec.

*Autores de Correspondencia: damaris.intriago@uisek.edu.ec; manuel.herrera@uisek.edu.ec.

Resumen: La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una amenaza creciente para la salud pública global y regional. En Ecuador, existen pocos estudios enfocados en cuerpos de agua ornamentales urbanos, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar genes RAM en bacterias Gram negativas presentes en estos ambientes de dos parques localizados en el Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador. Se realizaron muestreos en los parques “La Carolina” en el norte de Quito y “El Ejido” del centro de la ciudad, se cultivaron los microorganismos, se identificaron por medio de pruebas bioquímicas, se realizaron pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, se extrajo ADN y se realizó la secuenciación genómica de las cepas bacterianas seleccionadas. El análisis de identidad genómica determinó que una de las cepas corresponde a *Chryseobacterium indologenes* y la otra a *Pseudomonas protegens*. Se identificaron múltiples genes RAM, como MdtA, que confiere resistencia a β -lactámicos y EmrA que son específicos para la resistencia a la colistina, entre otros genes. También, se identificaron genes de factores de virulencia y elementos móviles. Los resultados indican que los cuerpos de agua actúan como reservorios ambientales de bacterias RAM, posiblemente influenciados por la actividad humana y animal en cuerpos de agua ornamentales en los parques analizados, y resaltan la importancia de los estudios de vigilancia en estos ambientes.

Palabras clave: vigilancia ambiental, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium indologenes*, *Pseudomonas protegens*, cuerpos de agua ornamentales, resistencia a los antimicrobianos (RAM).

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) represents a growing threat to global and regional public health. In Ecuador, there are few studies focused on urban ornamental water bodies, so the main objective of this study was to identify AMR genes in Gram-negative bacteria present in these environments in two parks located at the Metropolitan District of Quito, Ecuador. Samples were taken from “La Carolina” park at northern Quito and “El Ejido” park in the city center, microorganisms were cultured and identified using biochemical tests, tested for antimicrobial sensitivity, DNA was extracted, and genomic sequencing of selected bacterial strains was performed. Genomic identity analysis determined that one of the strains corresponds to *Chryseobacterium indologenes* and the other one to *Pseudomonas protegens*. Multiple AMR genes were identified, such as MdtA, which confers resistance to β -lactams, and EmrA, which is specific for colistin resistance, among other genes. Virulence factor genes and mobile elements were also identified. The results indicate that water bodies act as environmental reservoirs for AMR bacteria, possibly influenced by human and animal activity in ornamental water bodies in the analyzed parks, and highlight the importance of surveillance studies in these environments.

Keywords: environmental monitoring, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium indologenes*, *Pseudomonas protegens*, ornamental water bodies, antimicrobial resistance (AMR).

1. Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), también conocida como farmacorresistencia bacteriana, es un grave problema de salud pública a nivel global, debido a que causa múltiples complicaciones en la salud humana e incluso puede provocar la muerte (Davies et al., 2010; Dhingra et al., 2020). Esta problemática ocurre cuando las bacterias tienen la capacidad de sobrevivir o multiplicarse ante compuestos que comúnmente son letales o que inhiben su crecimiento (Dhingra et al., 2020; Ponce et al., 2015). Desde el punto de vista económico, los costos asociados a los tratamientos contra las infecciones causadas por bacterias resistentes son muy elevados, lo cual perturba la sostenibilidad de los sistemas de salud (Medina-Pizzali et al., 2021). En algunas ocasiones, el incremento en costos supera hasta en 100 veces el costo habitual de un tratamiento médico (Okeke et al., 2005; Ponce et al., 2015; Centers for disease and control, 2013).

La RAM es un fenómeno evolutivo natural impulsado principalmente porque los microorganismos se exponen a agentes antimicrobianos en concentraciones subletales, una situación muy común que está asociada con el uso inapropiado de antibióticos en la ganadería, la automedicación y el empleo incorrecto de los antibióticos por parte de los profesionales de la salud (Davies et al., 2010; Ponce et al., 2015; Medina-Pizzali et al., 2021). Bajo esta presión ambiental, las bacterias pueden adaptarse mediante mutaciones espontáneas o por transferencia horizontal de genes, promoviendo su rápida diseminación y una evolución a nivel comunitario (Munita et al., 2016; Lerminiaux et al., 2019; Dhingra et al., 2020). Los procesos biológicos que promueven la transferencia horizontal de genes son la conjugación, la transducción y la transformación (Didelot et al., 2009; Dhingra et al., 2020).

La conjugación ocurre cuando dos bacterias comparten material genético por medio de un pili sexual, el cual es una estructura similar a un apéndice propio de algunas bacterias (Jawetz, et al., 2011; Watson et al., 2013). Generalmente, la transferencia de genes por conjugación está mediada por elementos extracromosomales como los plásmidos o elementos genéticos móviles como los integrones (Munita et al., 2016; Devi et al., 2024). Por otro lado, la transducción está mediada por un bacteriófago que inserta su material genético en un huésped para convertirse en un profago, integrándose en el genoma y facilitando la transferencia de genes (Brown, 2016; Ermolaev et al., 2018). Por último, la transformación sucede cuando una bacteria, bajo condiciones de estrés, integra material genético exógeno que se encuentra libre en el ambiente (Lerminiaux et al., 2019). Las bacterias que presentan o adquieren genes de RAM utilizan diversos mecanismos para sobrevivir a la exposición a los antibióticos; entre los principales mecanismos, se encuentran la modificación de la molécula del antimicrobiano, la alteración de su diana, la reducción de la absorción del antimicrobiano combinada con la activación de bombas de expulsión activa, y los cambios en rutas metabólicas o estructuras celulares (Dhingra et al., 2020; Munita et al., 2016; Devi et al., 2024).

Diversos estudios han demostrado que los ecosistemas acuáticos son reservorios clave de resistencia (Fuhrmeister et al., 2023). En Ecuador, se ha reportado la presencia de bacterias multirresistentes en aguas de irrigación. En la investigación realizada por Corrales-Martínez et al. (2024), se identificó la presencia de *Enterobacter kobei* con genes blaOXA y blaKPC en agua de riego y sedimentos agrícolas. Mientras que, en el estudio de Montero et al. (2021), realizado en 17 provincias del Ecuador, se analizó 37 muestras de agua de irrigación y diferentes vegetales provenientes de diversas fincas agrícolas. Se encontró que del total de las muestras de agua, el 58% contenían *Escherichia coli*, con el fenotipo BLEE (β -lactamasa de Espectro Extendido), lo que destaca el rol del agua de irrigación en la transmisión de bacterias RAM (Montero et al., 2021). Los genes con mayor prevalencia fueron blaCTX-M (97,98%) y blaSHV (28.13%); adicionalmente, se identificó al gen blaOXA en el 1% de las muestras analizadas (Montero et al., 2021).

A pesar de estos hallazgos, la información sobre la RAM en el país sigue siendo limitada, principalmente debido a la ausencia de sistemas eficientes de vigilancia para esta problemática, por lo que la falta de datos genera una visión fragmentada y poco representativa de la situación real (Ponce et al., 2015; Acosta et al., 2024). La información disponible en instituciones o centros de vigilancia corresponde mayoritariamente a infecciones asociadas con la atención sanitaria (IAAS) y aunque existen estudios a nivel comunitario, éstos han sido realizados con muestras de alimentos, aguas de riego, aguas residuales, heces de mascota, etc. (Fusaro et al., 2024; Ortega-Paredes et al., 2018; Ortega-Paredes et al., 2019; Zurita et al., 2013). Por lo cual, la información relacionada con las infecciones comunitarias que involucran a cepas bacterianas resistentes procedentes de cuerpos de agua ornamentales sigue siendo deficiente (O'Neill, 2016).

Los cuerpos de agua ornamentales no sólo son un elemento estético, sino que también constituyen ecosistemas dinámicos que reflejan las interacciones existentes entre los seres humanos y los animales en su entorno inmediato (Nascimento et al., 2016). A diferencia de otros cuerpos de agua, su ubicación en zonas urbanas densamente pobladas los convierte en entornos importantes para evaluar la calidad del manejo ambiental y los riesgos sanitarios asociados con las comunidades de seres vivos que los rodean. Además, éstos pueden actuar como reservorios y puntos de propagación de microorganismos con genes de RAM, facilitando la transferencia horizontal de estos genes entre

diferentes especies bacterianas, y pueden revelar valiosa información sobre el estado sanitario de la comunidad y las fuentes de contaminación recurrentes (Ponce et al., 2015; Nascimento et al., 2016).

Dentro de este contexto, este estudio se centró específicamente en bacterias Gram negativas debido a su papel crítico como reservorios y diseminadores de genes de resistencia. Estas bacterias presentan una doble membrana que actúa como barrera física frente a muchos antimicrobianos y poseen mecanismos intrínsecos y adquiridos altamente eficientes, como bombas de eflujo, inactivación enzimática y modificación de dianas (Jawetz, et al., 2011; Devi et al., 2024). Además, microorganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* están frecuentemente implicados en infecciones nosocomiales difíciles de tratar, y han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2024) en su lista de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos. En esta lista, *A. baumannii* y las bacterias *Enterobacterales* multirresistentes se categorizan como críticas, mientras que, otras especies como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella spp.* y *Neisseria gonorrhoeae* se encuentran clasificadas como alta prioridad (OMS, 2024).

Por lo tanto, el **objetivo de este estudio** fue identificar genes de resistencia a los antimicrobianos en especies bacterianas Gram negativas aisladas de cuerpos de agua ornamentales de los parques “La Carolina” y “El Ejido” del norte y centro del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador, mediante análisis microbiológicos y secuenciación genómica, para la caracterización de su perfil de resistencia y potencial impacto en la salud pública.

1.1 Hipótesis

Los cuerpos de agua ornamentales de los parques “La Carolina” y “El Ejido” del norte y centro del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador, contienen especies bacterianas Gram negativas con múltiples genes de resistencia a los antimicrobianos, resultado de una posible presión selectiva derivada de la actividad humana y la contaminación ambiental.

2. Materiales y Métodos

2.1 Preparación de medios de transporte de las muestras de agua y medios de cultivo.

2.1.1 Preparación del medio de transporte de las muestras de agua y solución tampón.

Se preparó caldo peptona como medio de preenriquecimiento para garantizar la viabilidad de los microorganismos y una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 10%, como tampón para inactivar la acción bactericida del cloro presente en las muestras de agua (Leal, 2012). Las soluciones fueron autoclavadas y vertidas cuidadosamente en los envases que fueron utilizados para la toma de las muestras, los cuales son envases estériles de polipropileno con un volumen de 150 mL. En cada envase, se colocaron 5 mL de caldo peptona y 0.1 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, de acuerdo a la normativa utilizada en Ecuador para el análisis microbiológico de aguas residuales (Apha Awwa, 2005; Apha Awwa Wef, 2023).

2.1.2 Preparación de medios de cultivo selectivos.

Para la siembra de las muestras, se prepararon medios de cultivo diferenciales y selectivos. Algunos fueron suplementados con antimicrobianos a una concentración equivalente al cuádruple del valor recomendado por los puntos de corte establecidos en el documento M100 (2-fold), como se indica a continuación:

- Agar MacConkey (MCK), utilizado para el cultivo de bacterias Gram negativas y la evaluación de su capacidad de fermentar lactosa (Bonnet et al., 2019).
- Agar EMB + Meropenem (16 ug/ml), usado para seleccionar bacterias *Enterobacterales* con potencial resistencia a carbapenémicos (Becton, Dickinson and Company, 2009). El meropenem es un antibiótico de amplio espectro de la familia de los carbapenémicos, cuyo mecanismo de acción es similar al de las cefalosporinas, pero que presenta mayor

resistencia a las β -lactamasas (Jawetz, et al., 2011); por lo que las bacterias que crecen en este medio de cultivo tienen carbapenemasas y/o una hiperexpresión de β -lactamasas (Davies et al., 2010; Munita et al., 2016).

- Agar MCK + Cefepime (64 ug/ml), para cultivar bacterias Gram negativas e identificar su capacidad de fermentar lactosa (Bonnet et al., 2019); además, selecciona bacterias resistentes a cefepime, que es un antibiótico de la familia de las cefalosporinas, es decir, su mecanismo de acción consiste en unirse a PBP (*penicillin binding protein*), inhibir la síntesis de la pared celular al interrumpir la transpeptidación del peptidoglicano y activar enzimas con función autolíticas de la pared celular (Jawetz, et al., 2011). Por lo tanto, las bacterias que crecen en este medio son resistentes a cefalosporinas, posiblemente por la producción de BLEE (Jawetz et al., 2011).
- Agar sangre + Colistina (16 ug/ml), para el crecimiento de bacterias más exigentes que requieren nutrientes específicos (Becton-Dickinson and Company, 2009). Este medio permite identificar a las bacterias por el tipo de hemólisis (Alhamadani et al., 2022). Adicionalmente, tiene colistina que pertenece a la familia de las polimixinas que actúan sobre la membrana externa de las bacterias Gram negativas, uniéndose específicamente al grupo fosfato del lípido A, uno de los componentes principales de estas membranas (Jawetz et al., 2011). Este mecanismo de acción destruye el transporte activo y la barrera de permeabilidad. Por lo cual, la resistencia a las polimixinas está relacionada con modificaciones en la permeabilidad de la membrana principalmente (Jawetz et al., 2011).

Cabe mencionar que durante el proceso de siembra de las muestras, también se realizó la incubación de cajas Petri que contenían los medios de cultivo antes mencionados, las cuales no fueron inoculadas; este procedimiento se llevó a cabo con el fin de establecer controles negativos que confirmen la esterilidad de los medios de cultivos que fueron preparados.

2.2 Etiquetado y manejo de muestras biológicas

Tomando en cuenta lo indicado en la normativa ecuatoriana (NTE INEN 2176:2013) para la toma de muestras en aguas, se planteó el siguiente sistema de reconocimiento, etiquetado y codificación de las muestras para facilitar la identificación y trazabilidad en todas las etapas de la experimentación. El formato del código fue el siguiente:

LQ.Px.Mx.Tx.Dx (Actividad o especificación), AA/MM/DD

Donde:

- **L:** Lugar de muestreo; Centro de Quito (CQ) o Norte de Quito (NQ).
- **P:** Punto específico de muestreo dentro de la zona (P1, P2).
- **M:** Número asignado a la muestra recolectada en ese punto (M1, M2, M3).
- **T:** Etapa o tratamiento experimental aplicado a la muestra, definido según el siguiente esquema:
 - **1:** Recolección de las muestras
 - **2:** Siembra en placa.
 - **3:** Obtención de cultivos puros.
 - **4:** Identificación bacteriana
 - **5:** Antibiógrama.
 - **6:** Pruebas complementarias
 - **7:** Extracción de ADN
 - **8:** Preparación de bibliotecas de ADN.
- **Dx:** Puede ser D1 ó D2 ya que toda la experimentación se hace por duplicado técnico.
- **Actividad o especificación:** registra actividades derivadas o intermedias o alguna aclaración que no forman parte de las fases principales enumeradas. Para esto, se utilizaron palabras claves de la actividad realizada (subcultivo, dilución 10^{-3} , etc.).
- **Fecha:** Fecha en la que se realizó el procedimiento en el formato día (en dos dígitos), mes (en dos dígitos) y año (dos últimos dígitos del año).

Con respecto a la especificación:

- En la etapa 1, que corresponde a la recolección de la muestra, en especificación, se colocó las siglas del nombre completo de la persona encargada del muestreo y la hora en que se realizó.
- En la etapa 2, se colocó el factor de dilución a la que corresponde la siembra. Se nombró colonias obtenidas después de la incubación con letras.
- En la etapa 3, se especificó cuál es la colonia madre identificada por la letra asignada.
- En las etapas 4, 5 y 6, se colocó la letra del cultivo puro al que pertenece.

A continuación, se presentan ejemplos del sistema de codificación:

CQ.P1.M2.T2.1 (10^{-3}), 24-12-01: Segunda muestra recolectada en el punto 1 del Centro de Quito, correspondiente a la siembra en placa, a partir de una disolución de 10^{-3} ; registrada el 1 de diciembre de 2024.

CQ.P1.M1.T3.D2 (A), 25-01-29: Primera muestra recolectada en el punto 1 del Centro de Quito, correspondiente a la obtención de cultivos puros, duplicado 2, a partir de la colonia A, realizada el 29 de enero de 2025.

CQ.P1.M1.T5.D2 (A), 25-02-28: CQ.P1.M1.T5.2 (CP4), 25-02-24: Primera muestra recolectada en el punto 1 del Centro de Quito, correspondiente a la realización del antibiograma, duplicado 2, a partir del cultivo puro A; registrada el 28 de febrero de 2025.

CQ.P2.M1.T4.1 (A), 25-02-26: Primera muestra recolectada en el punto 2 del Centro de Quito, correspondiente a la etapa de identificación bacteriana, a partir del cultivo puro A; realizada el 26 de febrero de 2025.

2.3 Muestreo y siembra en placa

Para realizar el muestreo, se seleccionaron los cuerpos de aguas ornamentales de los parques más concurridos del centro y norte del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador, los cuales fueron: parque “El Ejido” y parque “La Carolina”. Las muestras fueron recolectadas el día martes 11 de marzo de 2025, entre las 10H00 y 11H00. En cada parque, se tomaron tres ejemplares mediante un muestreo a criterio (Keith et al., 2017). Se tomaron 120 ml de cada una de las muestras de agua en el envase de recolección, dejando un espacio mayor a 2,5 cm entre la tapa del envase y la mezcla de agua, caldo peptona y solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Apha Awwa; 2023). La recolección se hizo en la zona litoral de los cuerpos de agua, donde predominan las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (Leal, 2012).

Las ubicaciones exactas de los puntos de recolección de las muestras de agua fueron registradas mediante la aplicación para móvil *Coordinates-GPS convertidor*:

(<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.myice92.coordinates>).

Los puntos geográficos del muestreo se describen en la **Figura 1**.



Figura 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en los parques “La Carolina” - Laguna “El Quinde” y parque “El Ejido” - fuente de agua [Coordenadas (Lat, Lng)] (Realizado por: Tapia N., 2025 - Imagen satelital de Google).

2.3.1 Selección a criterio de puntos de muestreo

El Parque “La Carolina”, ubicado en el norte del Distrito Metropolitano de Quito, es una zona de alta concurrencia donde se realizan actividades recreativas, comercio formal e informal, y hay la presencia constante de fauna urbana. El parque cuenta con la laguna “El Quinde”, que está rodeada por múltiples puestos de venta de comida, especialmente los

fin de semana. El muestreo se llevó a cabo el 11 de marzo de 2025, una semana después de las festividades de carnaval, la cual es una celebración en la que es común que las personas jueguen con agua e incluso ingresen a la laguna, lo cual representa una fuente adicional de contaminantes y microorganismos para la laguna. Con base en este contexto, se seleccionaron tres puntos de muestreo dentro de la laguna del parque.

El primer punto de muestreo dentro del parque estuvo ubicado junto a la zona de alquiler de botes (**ver Figura 2a**). En este sector, el agua presentaba acumulación de hojas, residuos sólidos y una ligera película oleosa en la superficie, probablemente relacionada con alimentos, ya que los botes son de pedales y no utilizan motores. Alrededor de unos 10 metros de este punto, se encuentra una construcción tipo casa que funciona como administración del servicio de botes y establecimiento de venta de comidas.

El segundo punto de muestreo dentro del parque se localizó aproximadamente a cinco metros de dicha construcción y es una salida de agua con circulación limitada, donde se acumulaban hojas, basura orgánica como alimentos, basura inorgánica e insectos. Esta zona, al estar parcialmente estancada, permite la fácil concentración de residuos y el crecimiento de microorganismos (**ver Figura 2b**).

El tercer punto de muestreo dentro del parque correspondió a una tubería por la que el agua fluye hacia el sistema de tratamiento y recirculación de agua de la laguna (**ver Figura 2c**). Este punto marca la etapa final del sistema de limpieza. Por lo tanto, es un punto crítico para evaluar la carga microbiana presente en el agua justo antes del proceso de saneamiento.

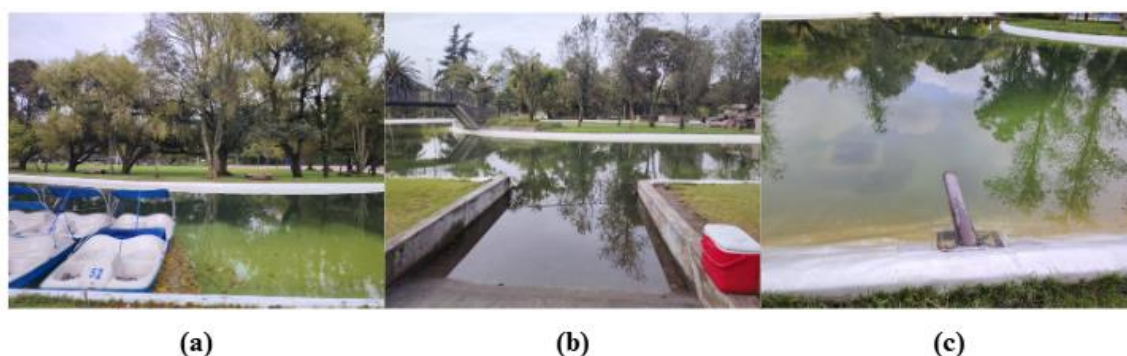


Figura 2. Puntos de muestreo en el parque “La Carolina- Laguna el Quinde” (a) Punto de muestreo número 1; (b) Punto de muestreo número 2. (c) Punto de muestreo número 3.

El segundo parque donde se realizó el muestreo de esta investigación fue el Parque “El Ejido”, un espacio urbano muy concurrido ubicado en el Centro del Distrito Metropolitano de Quito, el cual está cercano a instituciones importantes como la “Universidad Central del Ecuador” y la “Cruz Roja - Sede Centro”. La zona del parque “El Ejido” está caracterizada por una gran actividad comercial. Anteriormente, este parque contaba con una laguna que fue sellada debido al uso constante por parte de familias, niños y de personas en situación de calle como fuente recreacional o incluso para higiene y consumo (**ver Figura 3b**). Sin embargo, hay una fuente de agua, en la cual está bloqueado el sistema de llenado, para prevenir estas situaciones. Al momento del muestreo, la fuente se encontraba con agua por las lluvias recientes y adicionalmente, había sido utilizada durante las festividades de carnaval (**ver Figura 3a**). Cuando hay época de lluvias, esta fuente de agua es frecuentada por personas en situación de vulnerabilidad, incluidos niños, adultos y personas mayores. Según los testimonios recogidos de personas presentes en ese momento en el sector (entre ellos, trabajadores, comerciantes y transeúntes), es común que esta fuente de agua sea utilizada para bañarse, refrescarse o incluso como fuente de agua para el consumo humano. Además, es un cuerpo de agua al que ingresan usualmente animales domésticos y urbanos.

Durante el muestreo, se observó una alta carga de contaminación visible, incluyendo envases de alimentos, restos de comida, cartones, fundas plásticas, material vegetal y papeles. Esta interacción constante entre humanos, animales y el cuerpo de agua sin tratamiento ni control sanitario lo convierte en un sitio estratégico dentro del muestreo.

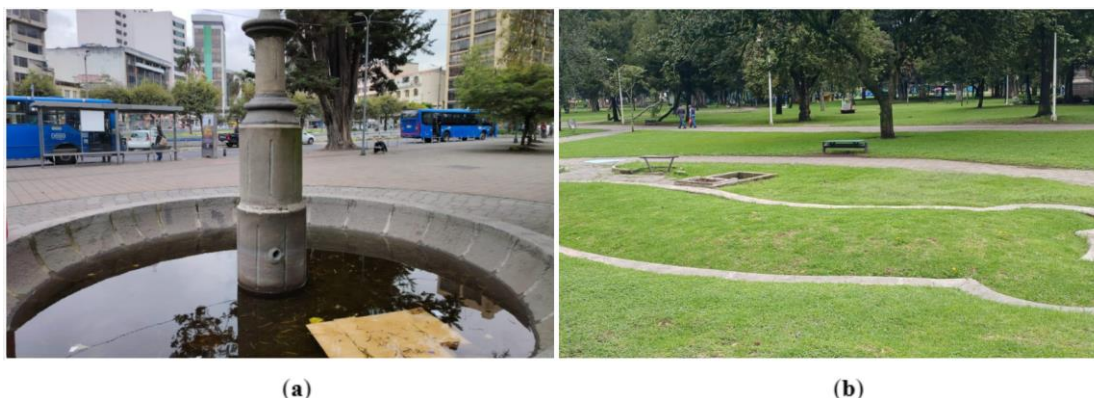


Figura 3. Parque “El Ejido”, al centro del DMQ. (a) Fuente de agua de donde se tomaron las 3 muestras para este estudio; (b) Cuerpo de agua ornamental sellado.

2.3.2 Siembra, procesamiento de las muestras y recuento celular

Una vez colectadas, las muestras fueron transportadas en una hielera a 4°C, hasta el laboratorio de microbiología de la UISEK, en un lapso de 2 horas. Para llevar a cabo el conteo de células viables, se realizó el método de plateo, para lo cual se realizaron diluciones seriadas de las muestras y se sembraron en placa la muestra madre y las diluciones, 10^{-3} y 10^{-5} ; para ello, se inocularon 100 μ l por duplicado en los medios mencionados anteriormente (Agar MCK y medios suplementados con antibióticos). Las muestras y sus diluciones se sembraron en los medios de cultivo mediante la técnica de siembra por extensión utilizando el asa de Drigalsky (Leal, 2012; Koch, 1881). Por último, se incubaron los medios de cultivo con las muestras a 37°C por 48 horas. A su vez, se almacenó la muestra madre en la refrigeradora a 4°C. Después de incubar las muestras, se contaron visualmente las colonias bacterianas formadas en el medio MCK sin suplementar con antibiótico y se registró el número de UFC/ml para cada muestra.

2.4 Obtención y selección de cultivos de cultivos axénicos

Las colonias bacterianas que crecieron en los medios suplementados con antibióticos fueron transferidas a nuevos medios de cultivo para obtener cultivos puros y fueron incubadas a 37°C por 24 horas. También, para identificarlas, se les asignó una letra del abecedario. Para confirmar la pureza de estos cultivos, se realizó inspección macroscópica, para verificar que todas las cepas presenten morfología homogénea. Adicionalmente, se hizo una inspección con microscopía, para lo cual se realizó tinción Gram y se observó la morfología y agrupación de los microorganismos utilizando el microscopio óptico (Gram, 1884; Curtis et al., 2008). En caso de existir cultivos mixtos, se volvió a repetir el procedimiento hasta conseguir cultivos axénicos. Se seleccionaron únicamente las bacterias Gram negativas.

2.5 Identificación bacteriana por medio de pruebas bioquímicas

A continuación, se prepararon los medios para realizar las pruebas bioquímicas. Los medios utilizados fueron MR-VP, SIM, Citrato de Simmons, Urea, Kliger y LIA (Koneman et al., 2017). Se sembraron las cepas por medio de punción y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se observaron y registraron los resultados y adicionalmente, se realizaron las pruebas bioquímicas de oxidasa e indol (Koneman et al., 2017; Jawetz et al., 2011). Los resultados obtenidos se analizaron para determinar el género bacteriano.

2.6 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad (antibiograma y pruebas complementarias) fueron realizadas conforme a los lineamientos establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2025 (CLSI, 2025, Ed. 35th), tomando como referencia el manual M100 para la estandarización de la metodología, selección de antibióticos y la interpretación de resultados.

2.6.1 Antibiograma - Método Kirby Bauer

Antes de llevar a cabo el antibiograma, se realizó un subcultivo de las cepas aisladas para trabajar con colonias frescas. Para realizar los antibiogramas, se utilizó el método Kirby Bauer reconocido como el método estándar por el CLSI. Se prepararon placas Petri de 150 mm con agar Mueller-Hinton (MH) y se elaboró una solución salina al 0.9%, la cual fue

esterilizada. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana a partir de las cepas de los cultivos puros en solución salina estéril. Se ajustó la solución a 0.5 en la escala de McFarland, lo que corresponde a 1.5×10^8 bacterias/ml (Dalynn Biologicals, s.f.; CLSI, 2025, Ed. 35th). Se sembró en el agar MH con un hisopo estéril con la técnica de siembra masiva y se colocaron los discos de antibióticos con una pinza esterilizada, siguiendo las indicaciones de las tablas 1A-1, 1A-2, 1B-1 y 1B-2 del manual M100 (ver la distribución de antibióticos en el **Anexo 1**). Se utilizaron antibióticos que se clasifican en el nivel 1 (*tier 1*). Se incubaron las placas Petri a 37°C por 18 horas y se procedió a medir el halo de inhibición presente alrededor de cada disco. Los resultados obtenidos se compararon con los puntos de corte establecidos en el manual M100 en las tablas 2A-1, 2A-2, 2B-1 y 2B-2. (CLSI, 2025, Ed. 35th). Se determinó si las cepas eran sensibles, intermedias o resistentes a cada antimicrobiano. Posteriormente, se seleccionaron las cepas que presentaron los perfiles de resistencia más relevantes, siendo el criterio de inclusión la resistencia a carbapenémicos y β -lactámicos.

2.6.2 Pruebas complementarias

Como prueba complementaria, se llevó a cabo la prueba de “Colistin Broth Disk Elution”, descrita en la tabla 3E del Manual M100 (CLSI, 2025). Para lo cual, se preparó caldo MH, el cual fue dispensado en tubos estériles, con un volumen de 10 ml por cada tubo. Una vez que el caldo y los discos de Colistin Sulfato 10 ug (CT 10) se encontraban a temperatura ambiente, se continuó con el procedimiento. En condiciones estériles, se distribuyeron uno, dos y cuatro discos en tres tubos diferentes, más un tubo control. Se realizó vortex y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se suspendieron de tres a cinco colonias puras en solución salina estéril para la preparación del inóculo, el cual debe tener una turbidez de 0.5 MacFarland. Se colocó 50 uL del inóculo en cada tubo y se mezcló el contenido de cada tubo utilizando el agitador Vortex. Posteriormente, se sembró el contenido de cada tubo con un asa estéril en medio de cultivo de sangre para hacer el control de pureza. Se incubaron las placas a 35°C por 20 horas. Adicionalmente, es importante mencionar que se realizó un blanco con solución salina (caldo MH y 50 uL de solución salina estéril). Todo este proceso se hizo solo para las cepas que fueron seleccionadas en la etapa anterior.

2.7 Extracción de ADN, cuantificación mediante fluorometría y evaluación de su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se extrajo el ADN genómico de las cepas bacterianas seleccionadas utilizando el kit comercial *GeneJET Genomic DNA purification kit*, siguiendo las instrucciones de su protocolo para bacterias Gram negativas (Thermo Fisher Scientific, 2024). La concentración de ADN de las muestras fue determinada utilizando el fluorómetro Qubit-4. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% empleando SYBR Safe y un ladder de ADN de 1 Kb; la corrida de electroforesis fue llevada a cabo durante 45 minutos a 100 V, lo cual permitió verificar la integridad del ADN extraído (Corrales-Martínez et al., 2024).

2.8 Secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS)

Las muestras de ADN fueron enviadas a la empresa BioSequence para su secuenciación; esta empresa sometió a las muestras a un proceso de tagmentación, seguido por la amplificación del ADN mediante PCR para generar librerías genómicas con el kit Illumina DNA Prep (Illumina, 2021). Las librerías generadas fueron evaluadas mediante un gel de electroforesis para verificar su calidad y fueron cuantificadas utilizando fluorometría. Al cumplir con los parámetros de calidad y cantidad fueron secuenciadas con la tecnología de Illumina mediante el principio de secuenciación por síntesis, con el sistema MiSeq (paired-end) de 2×150 pb (Illumina, 2024).

2.9 Análisis bioinformáticos

Los archivos de la secuenciación fueron analizados mediante la plataforma Galaxy. En primer lugar, los archivos fueron sometidos a un análisis de calidad con la herramienta *FASTQC*; posteriormente, se eliminaron las lecturas de baja calidad, utilizando la herramienta *Trimmomatic* con un umbral de calidad promedio de $\text{PHRED} \geq 30$ (Bolger et al., 2022). A continuación, se realizó un ensamblaje *de novo* con la herramienta *SPAdes*, empleando los valores de k-mer 21, 33 y 55 (Prjibelski et al., 2020) y se utilizó *Quast* para visualizar la calidad del ensamblaje. Adicionalmente, se utilizó *ABRicate tool* para la búsqueda de genes de resistencia, factores de virulencia y plásmidos, en donde se utilizaron las bases de datos *Resfinder*, *CARD*, *VFDB* y *Plasmidfinder*, respectivamente (Seeman, 2021). En todas se estableció un umbral de identidad mínima de 80% (Seeman, 2021). Después, se utilizó *Prokka* para realizar una anotación genómica. Para la identificación taxonómica de la bacteria, se aplicó la herramienta *MLST (Multilocus Sequence Typing)*; sin embargo, no se obtuvo un resultado concluyente. Por esta razón, se procedió a realizar un análisis

de similitud mediante *BLAST* utilizando un fragmento representativo de la secuencia genómica ensamblada, con el fin de determinar la especie bacteriana más cercana. Los resultados de la cepa X fueron confirmados con la herramienta *fastANI* (*Average Nucleotide Identity*) con los genomas de referencia para validar la asignación taxonómica, los cuales son CP018786.1, CP045734.1 (*C. indologenes*) y GCF_003729985.1 (*C. cucumeris*).

2.9.1 Clasificación de genes

Los genes identificados fueron agrupados funcionalmente en siete categorías principales, con base en su anotación y función biológica conocida o predicha. Las categorías fueron las siguientes:

- **Genes de resistencia a los antimicrobianos:** aquellos que codifican bombas de eflujo, enzimas inactivadoras (como β -lactamasas), proteínas que modifican la diana antibiótica o confieren resistencia por otras vías.
- **Factores de virulencia:** comprenden genes asociados con mecanismos de patogenicidad como toxinas, adhesinas, sistemas de secreción especializados (Tipo III, VI), y proteínas que permiten la invasión o evasión del sistema inmune.
- **Genes estructurales o de mantenimiento celular (*housekeeping genes*):** aquellos genes esenciales para la vida, incluyendo componentes del ribosoma (rRNA, proteínas ribosomales), enzimas de replicación (polimerasas, helicasas), tRNA y proteínas involucradas en el metabolismo.
- **Genes reguladores:** son aquellos que modulan la expresión de otros genes a nivel transcripcional o post-transcripcional. Incluyen factores sigma, represores, activadores, sensores de dos componentes y reguladores globales.
- **Genes relacionados con elementos móviles:** incluyen transposasas, integrasas, integrones, y otros elementos implicados en la movilidad horizontal de genes.
- **Genes de metabolismo secundario:** agrupan clústeres biosintéticos responsables de la producción de compuestos no esenciales para el crecimiento, como antibióticos, sideróforos, pigmentos o biosurfactantes.
- **Genes hipotéticos:** corresponden a anotaciones sin función conocida o que no permiten asignación funcional.

2.9.1.1 Subclasificación de genes de resistencia

Los genes de resistencia antimicrobiana identificados fueron clasificados en función de su mecanismo de acción en los siguientes grupos funcionales: eflujo activo, inactivación enzimática, modificación de membrana/LPS, resistencia a metales pesados y resistencia específica a determinados antibióticos. Adicionalmente, se identificaron genes reguladores, los cuales fueron categorizados por separado como genes de regulación, dado que no confieren resistencia directa, pero modulan la expresión de genes de resistencia. Esta clasificación se realizó mediante anotación funcional con base en literatura científica.

3. Resultados

3.1 Análisis microbiológico.

3.1.1 Recuento de coliformes totales.

De las tres diluciones preparadas por cada muestra (muestra madre, dilución 10^{-3} y dilución 10^{-5}), los resultados obtenidos mostraron crecimiento bacteriano únicamente en la muestra madre en todos los puntos muestreados, mientras que las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} no presentaron crecimiento microbiano visible.

El recuento de coliformes, para la fuente de agua del parque “El Ejido” del centro de Quito dio como resultado 10-460 UFC/ml, mientras que para la laguna “El Quinde” en el parque “La Carolina”, los resultados van desde 10-30 UFC/ml. Los datos obtenidos de manera individual por parque y punto de muestreo se pueden ver en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Recuento de coliformes totales de los parques “La Carolina” y “El Ejido” del norte y centro del DMQ.

Ubicación	Punto de muestreo	Recuento Duplicado 1	Recuento Duplicado 2
Norte de Quito Parque “La Carolina”	M1	10 UFC/ml	10 UFC/ml
	M2	30 UFC/ml	30 UFC/ml
	M3	30 UFC/ml	30 UFC/ml
Centro de Quito Parque “El Ejido”	M1	490 UFC/ml	430 UFC/ml
	M2	40 UFC/ml	40 UFC/ml
	M3	10 UFC/ml	10 UFC/ml

3.1.2 Recuento y observaciones morfológicas de las colonias obtenidas.

En cuanto a los medios de cultivo suplementados con antibióticos, se observó crecimiento bacteriano en los medios Sangre + Colistina en las muestras provenientes de los dos parques objeto de este estudio. Por otro lado, en los medios EMB + Meropenem, hubo crecimiento bacteriano únicamente en las muestras del parque “La Carolina”. Por último, en los medios MacConkey + Cefepime, no hubo crecimiento en ninguna de las muestras analizadas. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados del análisis microbiológico de las cepas aisladas en los medios suplementados con antibióticos, detallando el número de colonias observadas, su morfología a nivel macro y el resultado de la tinción Gram.

Tabla 2. Identificación macro y microscópica de bacterias aisladas de medios de cultivos suplementados con antibióticos.

Origen/ Medio de cultivo	Código	Cepa**	Morfología (Macro)	Morfología (Micro)/Gram
Parque “La Carolina”/ Sangre + Colistina	NQ.P1.M1.T3.D1	K	Colonia blanca, mucosa, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
		L	Colonia blanca, mucosa, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
		M	NA*	Coco/+
	NQ.P1.M2.T3.D1	J	Colonia blanca, centro ligeramente más opaco, mucosa, con borde definido, convexa, hemólisis beta.	Bacilo/-
		F	NA*	Coco/+
		G	Colonia blanca, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
	NQ.P1.M2.T3.D2	H	NA*	Bacilo/+
		I	Colonia blanca, ligeramente anaranjada, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
		I	Colonia blanca, ligeramente anaranjada, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
Parque “El Ejido”/ Sangre + Colistina	CQ.P2.M1.T3.D1	C	Colonia blanca, ligeramente anaranjada, bordes definidos, convexa, hemólisis gamma.	Bacilo/-
		D	NA*	Coco/+
	CQ.P2. M1.T3. D2	E	NA*	Bacilo/+
	CQ.P2. M3. T3.D1	Y	NA*	Bacilo/+
	CQ.P2. M3. T3. D2	A	NA*	Bacilo/+
		B	NA*	Bacilo/+
Parque “La Carolina”/ EMB + Meropenem	NQ.P1.M3.D2	X	Colonia blanca, ligeramente anaranjada, bordes definidos, mucosa, convexa.	Coco-bacilo/-

* Se registran con NA las colonias Gram positivas en la descripción morfológica-macro, ya que no son relevantes para esta investigación.

**Letra del abecedario que se le asigna a la cepa para identificarla.

3.1.3 Selección, aislamiento e identificación bacteriana.

Después de excluir los aislamientos de bacterias Gram positivas que se encontraron únicamente en el medio Sangre + Colistina, se seleccionaron un total de 7 cepas bacterianas. A estas cepas, se les realizaron pruebas bioquímicas para identificarlas de forma presuntiva. Los resultados de estas pruebas se detallan en el **Anexo 2**. Por otro lado, los resultados de la identificación bioquímica se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Presunta identificación bacteriana a través de pruebas bioquímicas y observación macro y microscópica.

Identidad de la cepa	Código	Aislado con resistencia a	Presunto género bacteriano
C	CQ. P2. M1. T4.D1	Colistina	<i>Serratia</i>
I	NQ. P1. M3. T4. D1	Colistina	<i>Serratia</i>
G	NQ. P1. M3. T4. D2	Colistina	<i>Enterobacter</i>
L	NQ. P1. M1. T4. D1	Colistina	<i>Enterobacter</i>
J	NQ. P1. M2. T4. D1	Colistina	<i>Pseudomonas</i>
K	NQ. P1. M1. T4. D1	Colistina	<i>Enterobacter o</i>
X	NQ. P1. M3. T4. D2	Meropenem	<i>Citrobacter</i>
			<i>Acinetobacter</i>

Es importante mencionar que para obtener los cultivos puros de la cepa X (NQ.P1.M3.T3.D2), no se utilizaron medios McConkey ya que en ese medio no se presentó crecimiento bacteriano a pesar de ser una bacteria Gram negativa, por lo que el aislamiento y los subcultivos de esta cepa se realizaron en agar EMB, Cled y Sangre.

3.1.4. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

Los resultados de los antibiogramas evidenciaron que todas las cepas bacterianas analizadas fueron resistentes a ampicilina (AM). La mayoría de ellas mostró resistencia frente a este antibiótico y a colistina (CT). Sin embargo, la cepa identificada como X presentó multirresistencia a los antibióticos AM, amoxicilina+ácido clavulánico (AMC), cefazolina (KZ), ampicilina+sulbactam (SAM), cefotaxima (CTX) y meropenem (MEM). Por otro lado, la cepa denominada J fue resistente al MEM. La interpretación de la sensibilidad a los antimicrobianos analizada en el antibiograma se representa en la **Figura 4**. Es importante destacar que la cepa X mostró una marcada sensibilidad frente a ciprofloxacino, levofloxacino y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT). Con respecto a las pruebas complementarias de colistina, la cepa J mostró resistencia a la colistina, de igual forma que la cepa X, al crecer en el medio con 4 ug/ml de colistina.

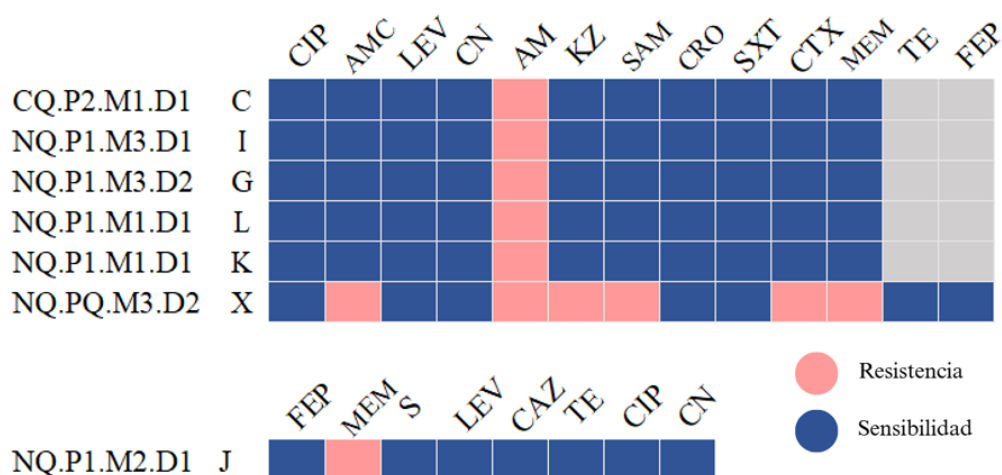


Figura 4. Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas analizadas.

3.2 Extracción, cuantificación y electroforesis en gel de agarosa del ADN obtenido a partir de las cepas bacterianas de interés.

Se extrajo ADN genómico de las cepas identificadas como J y X y se cuantificó por fluorometría con el uso del equipo Qubit-4. Los resultados obtenidos de la cuantificación fueron 19 ng/μL para la muestra de ADN de la cepa identificada como J y 57 ng/μL para la muestra de ADN de la cepa X. Posteriormente, se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (**Figura 5**). En ambas muestras, se observó una banda de ADN nítida y definida, sin presencia de barrido (*smear*), lo cual indica la integridad del ADN.

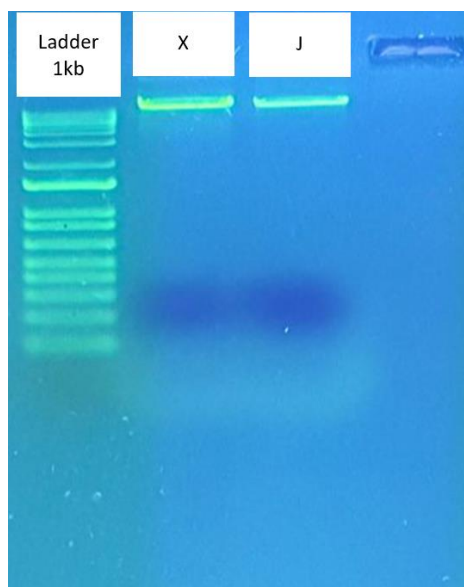


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de las cepas X y J.

3.3 Secuenciación genómica.

De acuerdo al informe de Biosequence, las muestras de ADN de las cepas X y J presentaron concentraciones de ADN genómico de 59 ng/μL y 28 ng/μL, respectivamente, ambas con integridad superior a 1500 pb, como se ve de igual forma en la **Figura 5**. A partir de estas, se generaron librerías con concentraciones de 13 ng/μL (X) y 12 ng/μL (J), con un tamaño promedio de inserto aproximado de 600 pb.

El proceso de secuenciación realizado mediante la plataforma Illumina MiSeq (2×150 pb) fue exitoso. La muestra de ADN de la cepa X alcanzó un valor de Q30 del 93.3% y un total de 425167 lecturas, mientras que la muestra de ADN de la cepa J obtuvo un valor de Q30 del 90.2% y 445449 lecturas, lo que indica una alta calidad en los datos obtenidos (**ver Anexo 3**).

3.4 Análisis bioinformático

3.4.1 Análisis básico de datos e identificación de especie bacteriana.

El análisis de calidad inicial utilizando *FASTQC*, mostró que no se identificaron secuencias de baja calidad en las muestras analizadas, con un porcentaje de GC de 36% para la cepa bacteriana X y 63% para la cepa bacteriana J. Posteriormente, mediante Trimmomatic, se eliminaron las lecturas potencialmente problemáticas y adaptadores, asegurando datos depurados para el ensamblaje genómico.

El ensamblaje *de novo* realizado con SPAdes generó un conjunto de secuencias que posteriormente fueron evaluadas mediante QUAST, mostrando la calidad del ensamblaje dando como resultado 108 contigs y un N50 de 132935 para X y 627 contigs y un N50 1338 para J. La herramienta ABRicate, utilizando las bases de datos *ResFinder*, *CARD*, *VFDB* y *PlasmidFinder*, permitió identificar genes de resistencia antimicrobiana en X, los cuales son: el gen blaCGB-1 con 82,82% de identidad y 100% de cobertura con el Accession number EF672680 (*Resfinder*), blaCGA-1, con 85,91% de identidad y 100% de cobertura; AF339733.1:436-1315 (*CARD*), y para J, no se reportó ningún gen con *Resfinder* ni *CARD*. Con respecto a *PlasmidFinder* no se encontraron plásmidos y en cuanto a factores de virulencia (*VFDB*), la bacteria J reportó los genes *fliG* (NP_249793, id: 86,69%; cov: 95.07%) y *hslB1/vipA* (NP_248773, id:87,32%; cov: 90.02%).

En cuanto a la identificación taxonómica, se aplicó MLST sin resultados concluyentes, por lo que se realizó un análisis de similitud BLAST utilizando un fragmento significativo del genoma ensamblado, logrando así determinar la especie más cercana con base en la similitud de secuencias. Para la cepa X, los alineamientos más relevantes corresponden al género *Chryseobacterium*. El mejor resultado se obtuvo con *Chryseobacterium indologenes* StR 03, con un 99.01% de identidad, 100% de cobertura y un valor E de 0.0, asociado al número de acceso CP045734.1. También, se identificaron coincidencias significativas con *Chryseobacterium* sp. WX (98.44% de identidad, 93% de cobertura; CP120710.1) y *Chryseobacterium* sp. PCH239 (97.84% de identidad, 93% de cobertura; CP073027.1), lo cual respalda la asignación de esta cepa a la especie *Chryseobacterium indologenes*.

Por otro lado, la cepa J presentó alineamientos óptimos con distintas cepas de *Pseudomonas protegens*, todas con 100% de identidad, 100% de cobertura y valores E de 0.0. Las cepas de referencia más cercanas fueron *P. protegens* PGNL1 (CP054874.1), *P. protegens* PGNR2 (CP054873.1) y *P. protegens* CHA0 (LS999205.1). Estos resultados permiten identificar con alta confianza a la cepa J como *Pseudomonas protegens*.

La identidad de la cepa X fue confirmada mediante la herramienta *fastANI*. Se obtuvo un valor de ANI del 91.94% (CP018786.1), 99.08% (CP045734.1) con *C. indologenes* y del 98.69% (GCF_003729985.1) con *C. cucumeris*, lo que indica que la cepa analizada corresponde a CP045734.1.

3.4.1.1 Comparación de la identificación por pruebas bioquímicas y moleculares

Como se mencionó anteriormente, la secuenciación reveló que las dos cepas bacterianas seleccionadas correspondieron al género bacteriano *Chryseobacterium* y a la especie bacteriana *Pseudomonas protegens*. Uno de estos resultados contrasta con las inferencias iniciales basadas en las pruebas bioquímicas que sugerían la presencia de *Acinetobacter* y, de forma acertada, *Pseudomonas*. En la **Tabla 4**, se comparan los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas con las características reportadas en la literatura para los géneros *Acinetobacter* y *Chryseobacterium indologenes* y *Chryseobacterium* sp.

Tabla 4. Concordancia entre los resultados esperados y los resultados obtenidos en pruebas bioquímicas.

	Gram	Morfología	Oxidasa	Urea	Citrato	Motilidad	Indol	H ₂ S	Gas	Referencia
Resultados obtenidos	-	Cocobacilo**	V*	-	+	-	+	-	+	NA
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Cocobacilo	-	+	+	-	-	-	-	(Koneman et al, 2017)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	Bacilo	+	-	+	-	+	V*	+	(Sakurada, 2008)
<i>Chryseobacterium</i> sp.	-	Bacilo	+	-	+	-	+	V*	+	(Sakurada, 2008)

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, se compararon las características de la cepa con las descritas para *Acinetobacter baumannii* y *C. indologenes*- *C. cucumeris*. La cepa presentó una coincidencia del 75% con *Chryseobacterium* (6 de 8 pruebas) y del 62.5% con *A. baumannii* (5 de 8 pruebas). Adicionalmente, se puede observar en la **Figura 6b** los resultados de la observación microscópica que dieron lugar a pensar que se trataba de *Acinetobacter*.

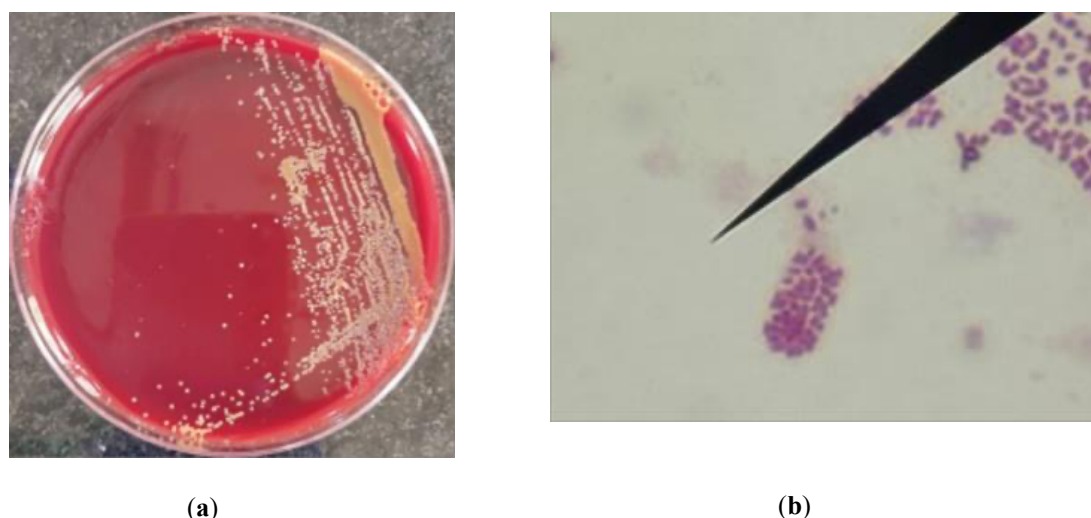


Figura 6. Cultivo y tinción de *Chryseobacterium* aislado de muestra ambiental. **(a)** Crecimiento de la cepa de interés en agar chocolate, con colonias bien definidas. **(b)** Tinción de Gram de la muestra, donde se observan estructuras compatibles con cocabacilos Gram negativos.

3.4.2 Análisis de genes

En la **Tabla 5**, se presenta la clasificación funcional de los genes identificados en las cepas bacterianas *Chryseobacterium indologenes*- *C. cucumeris* y *Pseudomonas protegens*, basada en su anotación genómica. En la cepa *Chryseobacterium indologenes*, se identificaron 4511 genes en total, de los cuales la mayoría correspondieron a genes hipotéticos o proteínas con función desconocida (55,89%), seguidos por genes estructurales y de mantenimiento (25,83%) y genes de metabolismo secundario (9,22%). Asimismo, se detectaron 136 genes relacionados con resistencia a los antimicrobianos (3,01%), 9 factores de virulencia (0,20%) y 2 genes relacionados con elementos móviles (0,04%). Por otro lado, en la cepa *Pseudomonas protegens*, se identificaron 862 genes en total, predominando también los genes hipotéticos (59,74%), seguidos por los estructurales (17,98%) y los relacionados con el metabolismo secundario (9,28%). Esta cepa presentó un menor número de genes de resistencia antimicrobiana (2,09%) en comparación con la otra bacteria, pero un número ligeramente mayor de factores de virulencia (2,09%) y genes móviles (0,46%). Los genes de regulación representaron el 5,81% y el 8,35% del total en *Chryseobacterium indologenes* y *Pseudomonas protegens*, respectivamente.

Tabla 5. Caracterización de genes encontrados en el genoma de forma manual en *Prokka*.

Clasificación	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Pseudomonas protegens</i>
Genes estructurales y mantenimiento	1166 (25,85%)	155 (17,98%)
Genes de resistencia a los antimicrobianos	136 (3,01%)	19 (2,20%)
Factores de virulencia	9 (0,20%)	18 (2,09%)
Genes de metabolismo secundario	416 (9,22%)	80 (9,28%)
Genes de regulación	262 (5,81%)	72 (8,35%)
Genes relacionados con	1 (0,02%)	3 (0,35%)

elementos móviles		
Genes hipotéticos o proteínas con función desconocida	2521 (55,89%)	515 (59,74%)
Genes totales	4511 (100%)	862 (100%)

En cuanto a los genes asociados con resistencia a los antimicrobianos, clasificados en los grupos anteriormente explicados, se evidenció que en ambas cepas predominan los genes de eflujo activo. En *Chryseobacterium*, se observó una notable diversidad de componentes de transportadores. Los genes de inactivación enzimática también estuvieron presentes en ambas, con enzimas como β -lactamasas, acetiltransferasas y otras que degradan. Además, se identificaron genes responsables de la modificación de la membrana externa y del lipopolisacárido, particularmente relevantes para la resistencia a colistina. Ambos genomas también mostraron genes de resistencia específica frente a ciertos antibióticos y la presencia de genes de resistencia a metales pesados. A continuación, se presentan en las **Tablas 6 y 7**, algunos de los genes de resistencia anotados de las bacterias de este estudio. También, hay que mencionar que en el genoma ensamblado de *Pseudomonas protegens* (cepa J), se encontró la presencia del gen OprD, el cual es un receptor que permite el ingreso de antibióticos carbapenémicos.

Tabla 6. Subclasificación de genes de resistencia a los antimicrobianos de *Pseudomonas protegens*.

Antimicrobiano	Confiere resistencia a
Bombas de eflujo	
Multidrug resistance protein MdtA	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos
Colistin resistance protein EmrA	Polimixinas
Toluene efflux pump membrane transporter TtgB	β -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, rifampicina, aminoglucósidos (en menor medida).
Inactivación enzimática/ Antibiótico específico	
Chloramphenicol acetyltransferase Cat	Cloranfenicol
Modificación de la membrana/LPS	
4-amino-4-deoxy-L-arabinose-phosphoundecaprenol flippase subunit ArnE	Polimixinas (especialmente colistina)
4-amino-4-deoxy-L-arabinose-phosphoundecaprenol flippase subunit ArnF	Polimixinas (especialmente colistina)
UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose--oxoglutarate aminotransferase arnB1	Polimixinas
Resistencia a metales pesados	
Metal cation efflux system protein CzcD	Cobalto, zinc, cadmio

Tabla 7. Subclasificación de genes de resistencia de *Chryseobacterium*.

Antimicrobiano	Antimicrobiano al que confiere resistencia
Antibióticos específicos	
Pentapeptide repeat protein MfpA	Fluoroquinonas
Bleomycin resistance protein ble-1	Bleomicina, Zeocina, Fleomicina
Antiseptic resistance protein qacA	Clorhexidina, Triclosán, Biguanidas, Fenoles
Fatty acid resistance protein FarB	β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, fluoroquinolonas
Colistin resistance protein EmrA	Polimixinas
Eflujo activo	
Outer membrane efflux protein BepC	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, rifampicina, sulfamidas (en menor medida).
Toluene efflux pump periplasmic linker protein TtgA	β -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, rifampicina, aminoglucósidos (en menor medida).
Efflux pump membrane transporter BepE	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, rifampicina (en menor medida), aminoglucósidos (en menor medida).
Outer membrane protein OprM	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, rifampicina (en menor medida), aminoglucósidos (en menor medida).
Multidrug efflux pump subunit AcrA	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, rifampicina, aminoglucósidos (en menor medida).
Multidrug resistance protein MdtA	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos
Multidrug resistance protein NorM	Quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos (en menor medida), cloranfenicol (en menor medida).
Efflux pump periplasmic linker BepF	β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos
Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB	Macrólidos
Multidrug resistance protein Stp	Tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, quinolonas
Multidrug export protein MepA	tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol
Multidrug resistance protein MdtC	tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol
Multidrug export protein AcrE	tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, β -lactámicos, cloranfenicol
Multidrug resistance protein D MdtD	tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas
Inactivación enzimática	
Metallo-beta-lactamase type 2 blaB1	β -lactámicos
Streptothricin acetyltransferase A	Estreptotricídicos
Extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1	β -lactámicos
O-acetyltransferase OatA	Lisozima
Beta-lactamase AmpC	β -lactámicos
Bacitracin transport ATP-binding protein BcrA	Bacitracinas
Resistencia a metales pesados	
Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcC	cobalto, zinc, cadmio
Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcB	cobalto, zinc, cadmio
Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	cobalto, zinc, cadmio
Nickel and cobalt resistance protein CnrB	nickel , cobalto
Modificación de membrana / LPS	
Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase arnC1/4	Polimixinas
Undecaprenyl-diphosphatase uppP	Bacitracina

Algunos de los genes de virulencia de J y X anotados con Prokka, se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Factores de virulencia presentes en *Pseudomonas protegens* y *Chryseobacterium indologenes*.

Bacteria	Factor de virulencia	Descripción funcional	Referencia
Cepa J- <i>Pseudomonas protegens</i>	Virulence sensor protein BvgS	Proteína reguladora que controla la expresión de múltiples genes de virulencia en respuesta a señales ambientales. Permite la adaptación de la bacteria al entorno del hospedero.	Ota et al., 2025
	Hemophore HasA	Proteína secretada que captura hemo del ambiente para facilitar la adquisición de hierro, un elemento esencial limitado dentro del hospedero.	Izadi-Pruneyre et al., 2006
	Outer membrane protein A (OmpA)	Proteína de membrana externa involucrada en adhesión, formación de biopelículas, evasión del sistema inmune y resistencia al ataque del complemento.	Confer et al., 2013; Barati et al, 2024
	Putative hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin-binding protein 2	Proteína que permite la captación de hierro directamente desde complejos de hemoglobina y haptoglobina, mecanismo adaptativo en infecciones.	Seale et al., 2006
	BrkA autotransporter	Autotransportador tipo V asociado a la evasión del sistema inmune, específicamente a la resistencia al sistema del complemento humano.	Fernandez et al., 1994
	Putative type II secretion system protein HxcR	Relacionado con la exportación de proteínas virulentas hacia el exterior de la célula, incluyendo toxinas y enzimas degradativas.	Ball et al., 2002
	Ferric-pseudobactin BN7/BN8 receptor	Receptor de sideróforos implicado en la captación de hierro férrico mediante pseudobactinas, lo que contribuye a la supervivencia en ambientes pobres en hierro.	Neff et al., 2024; Miethke et al., 2007
Cepa X- <i>Chryseobacterium indologenes</i>	Metal-pseudopaline receptor CntO	Receptor implicado en la captación de zinc en ambientes limitantes, como los tejidos del hospedero. Contribuye a la adquisición de nutrientes esenciales en condiciones de presión inmune.	Miethke et al, 2007
	Ferric aerobactin receptor	Receptor de sideróforos aerobactina, importante para captar hierro férrico en el entorno del hospedero. Clásico factor de virulencia en bacterias entéricas.	Neff et al., 2024; Miethke et al., 2007

Por último, los genes relacionados con elementos móviles se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Genes relacionados con elementos móviles en las cepas del presente estudio.

Cepa X- <i>C. indologenes</i>	Cepa J- <i>P. protegens</i>
IS1595 family transposase ISSpgl1	IS3 family transposase ISPsy29
	Tn3 family transposase TnXax1
	IS66 family transposase ISPsy43

Todos estos genes relacionados a elementos móviles son transposasas relacionadas con la recombinación génica (Partridge et al., 2018).

4. Discusión

En este estudio, el análisis de identidad genómica mediante *fastANI* reveló que la cepa aislada identificada como X comparte un 98.69% de identidad promedio de nucleótidos con la cepa de referencia *C. cucumeris* (GCF_003729985.1), superando el umbral del 95% y confirmando que corresponde a esta especie (Jain et al., 2018). Sin embargo, *C. cucumeris* fue descrita recientemente como especie independiente en 2017, a partir de un aislamiento vegetal, y hasta la fecha existe escasa información sobre su papel en contextos clínicos o ambientales con implicaciones sanitarias (Jeong et al., 2017; Kim et al., 2020). Aunque no se han reportado infecciones humanas directamente causadas por esta especie, su estrecha relación filogenética con *C. indologenes*, un patógeno oportunista bien documentado, así como la presencia de genes de resistencia antimicrobiana y posibles factores de virulencia en algunos genomas de *C. cucumeris*, sugieren que podrían tener relevancia clínica bajo determinadas condiciones, especialmente en entornos hospitalarios o en pacientes inmunocomprometidos. Además, en varias investigaciones ambientales y clínicas, se reporta únicamente la presencia de *Chryseobacterium* sp., sin precisar la especie, lo cual podría deberse a limitaciones metodológicas o a la relativamente reciente separación entre especies cercanas (Yadav et al., 2021). Es importante mencionar que también se obtuvo un ANI del 99,08% con la cepa CP045734.1, la cual se encuentra registrada como *C. indologenes* en el título de entrada de GenBank, pero está anotada como *C. cucumeris* en el campo taxonómico, lo que refleja una inconsistencia en la clasificación de esta cepa. Esto resulta ser ambiguo en la taxonomía, lo que refuerza la proximidad genética entre estas cepas.

Por ello, con respecto a *C. cucumeris*, se requieren más estudios que permitan establecer con mayor claridad su potencial patogénico, distribución ambiental y comportamiento en diferentes nichos ecológicos. En esta investigación, si bien se identificó una identidad ANI de 98,96% con *C. cucumeris*, también se observó un ANI del 91, 9% con *C. indologenes*. Debido a la escasez de investigaciones sobre *C. cucumeris* en ambientes no vegetales y la limitada caracterización clínica disponible, se decidió interpretar y discutir con hallazgos en referencia a *C. indologenes*, dado que esta última cuenta con un mayor respaldo bibliográfico en el contexto de la salud pública y resistencia antimicrobiana.

C. indologenes es una bacteria ambiental comúnmente hallada en suelos, aguas dulces, aguas residuales y sistemas de distribución de agua, por lo que tiene gran tolerancia a los procesos de cloración (Sakurada, 2008; Chang et al., 2023). En ambientes clínicos, se encuentra en superficies húmedas, en equipos e insumos médicos, como respiradores, humidificadores, tubos, mangueras, entre otros (Sakurada, 2008; Chang et al., 2023). Se ha aislado esta bacteria generalmente en infecciones de pacientes oncológicos, geriátricos, neonatos y personas inmunocomprometidas (Sakurada, 2008; Guiu et al, 2014; Mukerji et al., 2016; Izaguirre-Anariba et al., 2020).

Entre 1992-1994, esta bacteria fue reportada por primera vez como causante de bacteriemia en 12 pacientes (Hsueh et al., 1996). Desde la década de los 2000, ha sido reconocida como un patógeno oportunista, causante especialmente de infecciones como bacteriemias, neumonías asociadas a ventilación mecánica, ITU y meningitis, alcanzando tasas de mortalidad de hasta el 50% en pacientes con comorbilidades (Chang et al., 2023; Chaudhary et al., 2023). Una preocupación importante asociada a esta bacteria es su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, como carbapenémicos, cefalosporinas de tercera generación y polimixinas (Bercholz-Urinowsky et al., 2018; Zhang et al, 2021).

La resistencia a estos antibióticos se debe a la presencia de genes que codifican para β -lactamasas de clase A y metalo- β -lactamasas principalmente, aunque también cuentan con bombas de eflujo y otras enzimas modificadoras de antibióticos (Zhang et al., 2021). Sin embargo, aunque muestra resistencia a estos antimicrobianos, comúnmente ha presentado sensibilidad a CIP y LEV, como lo encontrado en las pruebas de sensibilidad de esta investigación (Bercholz-Urinowsky et al., 2018; Sakurada, 2008). Estos antibióticos representan opciones terapéuticas viables para el tratamiento de infecciones.

A pesar de que no se han reportado casos clínicos de infecciones causadas por *Chryseobacterium indologenes* en Ecuador, se identificó una tesis de grado que reportó su presencia en aguas termales del balneario “El Pisque”, ubicado en Cayambe, provincia de Pichincha (Tabango-Catucua, 2023). Este hallazgo sugiere que la bacteria puede estar presente en ambientes naturales del país, aunque no haya sido reconocida como agente etiológico en el contexto clínico nacional.

Además, *C. indologenes* ha sido reconocida a nivel regional como una especie de difícil identificación y caracterización en cuanto a sus mecanismos de resistencia (Gaggetti et al., 2020). En el marco del Programa Latinoamericano de Aseguramiento de la Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS), coordinado por la OPS, esta especie fue incluida entre las bacterias con baja concordancia en la identificación por parte de los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) entre 2007 y 2018. Este bajo desempeño destaca los desafíos técnicos que representa el diagnóstico preciso de esta bacteria en los laboratorios clínicos y ambientales de América Latina (Gaggetti et al., 2020).

Por otro lado, *Pseudomonas protegens*, la otra bacteria que fue encontrada en este estudio, es una especie bacteriana ampliamente distribuida en ambientes naturales, especialmente en suelos agrícolas, plantas, rizósferas y cuerpos de agua (Ruiz-Roldán et al., 2020; Luczkiewicz et al., 2015). Se caracteriza por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antifúngica, lo que la convierte en un agente clave en el biocontrol de fitopatógenos y en la promoción del crecimiento vegetal (Ramette et al., 2011; Cesa-Luna et al., 2020; Huang et al., 2022).

A pesar de su reconocida utilidad en la agricultura, estudios recientes han revelado que cepas ambientales de *P. protegens* pueden albergar genes asociados a la resistencia antimicrobiana, incluidos mecanismos de bombas de eflujo, modificación enzimática y alteración de dianas, lo que podría representar un riesgo potencial si se transfiere a contextos clínicos o si entra en contacto con patógenos humanos (Popa et al., 2011; Luczkiewicz et al., 2015; Silveiro et al., 2022). Además, su capacidad de persistir en ambientes acuáticos y su alta adaptabilidad ecológica sugiere que podría actuar como reservorio ambiental de genes de resistencia o participar en procesos de transferencia horizontal de genes de resistencia, especialmente con bacterias del mismo género (Popa et al., 2011; Von Wintersdorff et al., 2016). Un hallazgo relevante es el estudio de Ruiz-Roldán et al. (2020), en que se aisló *P. protegens* a partir de heces de animales de granja junto con otras *Pseudomonas spp.*, lo que sugiere una amplia distribución ecológica, incluyendo ambientes asociados a la ganadería, en donde existe una fuerte presión selectiva y transferencia de genes (Ponce et al., 2015; Medina-Pizzali et al., 2021).

A pesar de que no se considera un patógeno humano, su resistencia de genes, plasticidad metabólica y presencia en ambientes asociados a la actividad humana justifican su inclusión en programas de vigilancia ambiental para prevenir posibles eventos de transferencia horizontal de genes de resistencia (Luczkiewicz et al., 2015). Adicionalmente, *P. protegens* presenta una alta tolerancia ambiental, atribuida a su versatilidad metabólica, la producción de compuestos antioxidantes y su capacidad para formar comunidades microbianas complejas (Loper et al., 2012). Al igual que otras especies del mismo género, puede formar biopelículas, lo que le confiere una ventaja adicional frente a tratamientos químicos como la cloración (Ueda et al., 2015). Por esta razón, fue posible detectarla en el agua del parque “La Carolina”, pese a que dicho cuerpo de agua recibe tratamiento de cloración.

Los resultados del antibiograma de *Chryseobacterium indologenes* mostraron resistencia a β -lactámicos, como ampicilina, cefazolina y cefotaxima, mientras que presenta sensibilidad a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfamidas, tetraciclinas y cefalosporinas de generaciones más avanzadas, como cefepime y ceftriaxona. Estos resultados sugieren la presencia de mecanismos específicos de resistencia, específicamente de enzimas BLEE, las cuales confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera a tercera generación y monobactámicos, sin afectar a los carbapenémicos (Paterson et al., 2005). En las pruebas genotípicas, se identificó el gen blaPER-1, clasificado como una β -lactamasa de espectro extendido, respaldando esta interpretación (Bradford, 2001). La detección de enzimas BLEE es crítica en entornos clínicos debido a su asociación con brotes hospitalarios y porque comúnmente se participan en procesos de transferencia horizontal de genes mediante plásmidos (Bradford, 2001).

Adicionalmente, este perfil de resistencia es coherente con los genes identificados. La resistencia a β -lactámicos se sustenta en la presencia de múltiples genes de inactivación enzimática, incluyendo β -lactamasas de espectro extendido (blaPER-1), y metalobeta-lactamasas tipo 2, ambos asociados a resistencia a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, y de carbapenémicos por parte de las metalobeta-lactamasas (Bradford, 2001; Ghafourian et al., 2015). Además, la presencia de genes como BepC, BepE, AcrA, MdtA, MdtC, AcrE y OprM, relacionados con bombas de eflujo de amplio espectro, también puede haber contribuido a la disminución de la concentración intracelular de β -lactámicos (Poole, 2001; Posadas et al., 2007; Li et al., 2009).

La sensibilidad a fluoroquinolonas y tetraciclinas, a pesar de que se identificaron genes como NorM, MdtA, MfpA y MepA, podría explicarse por una expresión insuficiente de estos genes (Morita et al., 1998; Li et al., 2009). En cuanto a la colistina, la resistencia observada se explica por la identificación de genes como EmrA, asociado a sistemas de eflujo que pueden reducir la acumulación intracelular de polimixinas, y *undecaprenyl-phosphate-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase* arnC1-4, una enzima involucrada en la modificación del lipopolisacárido (LPS) (Li et al., 2009; Malhotra-Kumar et al., 2009). Esta modificación reduce la afinidad de la colistina por su blanco en la membrana externa bacteriana (Malhotra-Kumar et al., 2009).

Por otro lado, los resultados del antibiograma indicaron que la bacteria *Pseudomonas protegens* (cepa J) aislada en este estudio presenta resistencia a MEM y CT, mientras que tiene sensibilidad a antibióticos como FEP, CAZ, CIP, LEV, TE, S y CN. La resistencia a MEM puede explicarse por múltiples mecanismos, ya que en la cepa se han identificado la presencia de bombas de eflujo, como mdtA y ttgB, que están relacionadas con la expulsión de algunas familias de antibióticos, incluidos los Beta-lactámicos (Li et al., 2009; Terán et al., 2003). Además podría explicarse por una posible alteración funcional en la porina OprD, que es una proteína encargada de la entrada de los carbapenémicos, lo cual confiere una estrategia de resistencia a carbapenémicos como MEM (Quale et al., 2006). La alteración funcional de OprD es un mecanismo bastante conocido de resistencia y sobre todo estudiado en el género *Pseudomonas*. Esta mutación reduce de manera significativa la permeabilidad de la membrana externa (Wang et al., 2025).

Sin embargo, cabe mencionar que los genes *mdtA* y *ttgB* también están asociados con la expulsión de fluoroquinolonas y tetraciclinas, las cuales son familias de antibióticos a las cuales la bacteria presentó sensibilidad (Li et al., 2009). Esto se podría explicar porque no hay suficiente expresión de dichos genes o porque no se expresaron de forma activa bajo las condiciones del ensayo; por lo tanto, no hay una resistencia efectiva a estos compuestos. Además, como las fluoroquinolonas y tetraciclinas no dependen de OprD para su entrada, la mutación en esta porina (si es que la tuviera) no afecta su actividad.

Con respecto a la resistencia a CT, ésta puede explicarse por la presencia de los genes *arnE*, *arnF* y *UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose-oxoglutarate aminotransferase* (*arnB1*) que son parte del operón *arnBCADTEF* (Olaitan et al., 2014; Gunn, 2008). Dichos genes participan en la modificación del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Olaitan et al., 2014). Estas modificaciones disminuyen la afinidad de CT por su blanco e impiden su acción.

El análisis de los factores de virulencia reveló que ambas bacterias presentan una diversidad funcional que favorece su adaptación y posible interacción con hospedadores. En *C. indologenes*, se identificaron varios sistemas clave para la adquisición de nutrientes esenciales, como el receptor de aerobactina y el receptor CntO, que permiten captar hierro y zinc en ambientes limitantes (Izadi-Pruneyre et al., 2006; Miethke et al., 2007; Neff et al., 2023). Además, se detectaron proteínas relacionadas con la secreción de toxinas (HlyB) y la supervivencia intracelular (MgtC), que refuerzan el potencial patológico de esta bacteria (Belon et al., 2016; Koronakis et al., 1992).

Por su parte, *Pseudomonas protegens* mostró un perfil más enfocado en mecanismos de adhesión y evasión inmune. Se destacan proteínas como OmpA y el autotransportador BrkA, asociadas a la interacción con células del hospedero y resistencia al sistema del complemento (Fernandez et al., 1994; Pandey et al., 2020; Barati et al., 2024). Además, la identificación del gen *fliG*, relacionado con la motilidad flagelar, sugiere que esta bacteria posee capacidad de desplazamiento activo, lo cual puede favorecer la colonización y la formación de biopelículas (Tan et al., 2024). También, fue relevante la detección del gen *hsiB1/vipA*, parte del sistema de secreción tipo VI, implicado en la competencia bacteriana y posible inyección de efectores tóxicos, lo que le confiere ventajas en ambientes polimicrobianos (Lossi et al., 2012; Huang et al., 2024). Además, se identificó un sistema para la adquisición de hierro, como HasA, lo cual indica que esta bacteria también posee herramientas para sobrevivir en entornos con limitación de metales (Cornelis, 2010). Estos hallazgos refuerzan la idea de que *P. protegens* posee un repertorio virulento funcionalmente diverso y adaptado a condiciones de presión ecológica o clínica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta bacteria es incapaz de infectar a los seres humanos (Luczkiewicz et al., 2015).

Con respecto a los genes relacionados con elementos móviles, en ambas bacterias, se identificaron genes que codifican transposasas, proteínas clave en la movilidad genética, capaces de facilitar la inserción, duplicación o reordenamiento de segmentos genéticos. En *C. indologenes*, se detectó una transposasa de la familia IS1595 (ISSpg11), la cual ha sido reportada en bacterias ambientales y está asociada con la movilización de genes de resistencia o adaptación (Siguier et al., 2009). Por su parte, *P. protegens* presentó una mayor diversidad de elementos móviles, incluyendo transposasas de las familias IS3 (ISPsy29), Tn3 (TnXax1) e IS66 (ISPsy43), todas ellas reconocidas por su participación en la diseminación horizontal de genes, incluyendo factores de virulencia y resistencia (Partridge et al., 2018). La presencia de estos elementos sugiere un potencial de recombinación y plasticidad genética que podría facilitar la adaptación de estas bacterias a diferentes nichos ambientales o clínicos (Partridge et al., 2018).

Desde otro enfoque, aunque los análisis genéticos revelaron que *Pseudomonas protegens* presenta una proporción mayor de genes anotados como factores de virulencia (2,09%) en comparación con *Chryseobacterium indologenes* (0,20%), este hallazgo no implica necesariamente una mayor capacidad patológica, como se ve en su descripción. En bacterias ambientales como *P. protegens*, muchos de estos genes están relacionados con interacciones ecológicas, como la inhibición de fitopatógenos, la competencia por nichos o la colonización de raíces, y no con la producción de enfermedad en los seres humanos (Luczkiewicz et al., 2015). Esto se explica porque la presencia de factores de virulencia no siempre significa patogenicidad. Más bien, estos confieren la capacidad de un microorganismo para causar daño o interferencia en otros organismos no necesariamente humanos, mientras que la patogenicidad en humanos implica su habilidad específica para causar enfermedad en un hospedero humano (Casadevall, 1999). De esta manera, una bacteria puede expresar factores de virulencia sin representar un riesgo clínico directo.

Un ejemplo clave de esta diferencia es la capacidad de ambas especies bacterianas para formar biopelículas. *P. protegens* utiliza esta capacidad para establecerse en superficies naturales como raíces o residuos orgánicos, protegiéndose de condiciones adversas y compitiendo con otros microorganismos (Luczkiewicz et al., 2015). En cambio, *C. indologenes* forma biopelículas en ambientes hospitalarios, como en catéteres o redes de distribución de agua tratada, lo que le confiere una ventaja para persistir en dichos entornos, resistir la desinfección con cloro y contribuir a infecciones nosocomiales (Sakurada, 2008; Zhang et al., 2021; Chang et al., 2023).

Adicionalmente, *C. indologenes* posee un repertorio genético con mayor implicancia clínica. Se identificaron 136 genes de resistencia a los antimicrobianos (3,01%), incluidos genes de β -lactamasas como *bla CGA-1* y *blaCGB-1* (betalactamasas de espectro extendido), que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos, incluyendo

cefalosporinas, monobactámicos y penicilinas (Holmes et al., 2016). Estas características, junto con su capacidad para formar biopelículas en ambientes hospitalarios, justifican su clasificación como un patógeno oportunista.

Otra diferencia fundamental entre ambas especies bacterianas es su tamaño genómico y complejidad funcional. *P. protegens* posee un genoma más pequeño (862 genes anotados), pero con un mayor porcentaje relativo de genes reguladores y de virulencia, lo que probablemente refleja su especialización como bacteria antagonista en el suelo, adaptada a interacciones ecológicas complejas. En contraste, *C. indologenes* presenta un genoma considerablemente mayor (4511 genes), en el que predomina la asignación de funciones generales, estructurales y de mantenimiento celular, reflejando su versatilidad fisiológica para sobrevivir tanto en ambientes naturales como en entornos clínicos.

Cabe mencionar que, en este estudio, la estrategia de muestreo presentó varias limitaciones importantes. En primer lugar, se trató de un muestreo a criterio, no aleatorio, lo que puede introducir sesgos en la selección de los sitios (Arrogante, 2021). En segundo lugar, el número de muestras tomadas fue reducido, lo cual limita la posibilidad de hacer generalizaciones sobre los cuerpos de agua analizados. Es decir, no se abarcó una extensión representativa de los cuerpos de agua, en especial en el caso de la laguna "El Quinde" en el parque "La Carolina", que tiene un área grande y puede contener zonas con distintas características microbiológicas. Otro aspecto que se debe considerar es que no se tomaron muestras en diferentes momentos del día ni en distintos días, lo que impide observar posibles variaciones temporales.

Además, se muestreo únicamente en las zonas litorales y de profundidad media, principalmente porque los microorganismos que se buscaban, como aerobios o anaerobios facultativos de relevancia médica, suelen predominar en estas áreas (Leal, 2012). Por otro lado, debido a las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, no se incluyeron microorganismos anaerobios estrictos, ya que el laboratorio no contaba con la infraestructura necesaria para su aislamiento.

Como se mencionó en la sección resultados, la secuenciación reveló que las dos cepas bacterianas que fueron analizadas corresponden a las especies *Chryseobacterium indologenes* y *Pseudomonas protegens*, estando equivocada la identificación de la cepa identificada como X, que se pensó que pertenecía al género *Acinetobacter*. Esta interpretación se dio ya que no se consideró a *C. indologenes* como una opción diagnóstica debido a que su morfología típica es bacilar, mientras que la cepa observada se presentó como cocobacilar (**ver figura 6b**). Además, esta bacteria es poco frecuente, tanto en entornos clínicos como en entornos ambientales, lo que contribuyó a su exclusión inconsciente del análisis. Esta situación pone en evidencia las limitaciones de los métodos bioquímicos tradicionales, particularmente en el caso de bacterias poco comunes o con fenotipos atípicos (Arbefeville et al., 2024). La identificación definitiva mediante secuenciación genómica confirmó que esta bacteria corresponde a la especie *C. indologenes*- *C. cucumeris*, subrayando la importancia de complementar los análisis fenotípicos con herramientas moleculares para una caracterización precisa (Arbefeville et al., 2024).

5. Conclusiones

Este estudio demostró que los cuerpos de agua ornamentales que están presentes en los parques "La Carolina" y "El Ejido", ubicados en el norte y centro del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador, contienen bacterias Gram negativas que presentan múltiples mecanismos de resistencia antimicrobiana, incluso frente a antibióticos de última línea de defensa, como la colistina y el meropenem. Se identificaron las especies bacterianas *Pseudomonas protegens* y *Chryseobacterium indologenes*, mediante secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS), lo cual indica que estos ecosistemas acuáticos urbanos actúan como reservorios de bacterias y genes de resistencia.

Las dos especies bacterianas que fueron identificadas mediante este estudio representan un hallazgo muy importante desde el punto de vista de vigilancia y de salud pública. *Chryseobacterium indologenes* es considerada un patógeno oportunista, el cual ha sido detectado en infecciones de pacientes inmunocomprometidos. Al mismo tiempo, esta es una bacteria ambiental del agua y suelo, por lo que tiene una alta capacidad adaptativa. Por otro lado, *Pseudomonas protegens* es considerada una especie bacteriana ambiental no patógena, con funciones benéficas en el control biológico de plagas agrícolas; sin embargo, el hecho de que esta bacteria pertenece al género *Pseudomonas*, al que pertenecen bacterias patógenas importantes como *P. aeruginosa*, genera preocupación por su potencial como reservorio y vector de transferencia horizontal de genes de resistencia antimicrobiana. En ambas especies bacterianas, se identificaron genes asociados a mecanismos de resistencia como bombas de eflujo (*mdtA*), inactivación enzimática mediante β -lactamasas y tolerancia a metales pesados (*czcA*, *czcC*), lo que indica que estas bacterias están expuestas a diversos factores elicitors ambientales y a una probable presión selectiva antropogénica. Estos hallazgos ponen en evidencia la necesidad de incluir a los cuerpos de agua ornamentales en los sistemas de vigilancia.

6. Recomendaciones

A pesar de que este estudio aporta información importante sobre la presencia de bacterias multirresistentes en cuerpos de agua ornamentales presentes en parques del Distrito Metropolitano de Quito-Ecuador, su alcance no permite una representación completa del estado microbiológico de la ciudad. Las 6 muestras de agua que fueron analizadas provienen únicamente de dos parques urbanos y de puntos específicos presentes dentro de ellos. Por lo tanto, se recomienda ampliar la cobertura geográfica y el número de muestras en futuras investigaciones, con el fin de establecer patrones más representativos sobre la circulación de bacterias resistentes en la ciudad de Quito. De la misma forma, es fundamental comprender y analizar los procesos de gestión y tratamiento del agua de los cuerpos de agua ornamentales urbanos. Se recomienda investigar de manera más detallada el origen, tratamiento y destino del agua, así como posibles puntos de contaminación directa o indirecta. Adicionalmente, se recomienda incluir en futuros estudios el análisis de mutaciones en genes que codifican para proteínas consideradas como blancos moleculares de antibióticos, por ejemplo, porinas, enzimas diana o componentes ribosomales. La presencia de cambios en estas estructuras pueden alterar la afinidad del antimicrobiano, reducir su entrada o bloquear su acción. Para ello, se podrían utilizar herramientas bioinformáticas como la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs mediante alineamientos genómicos, o técnicas de modelado estructural y acoplamiento molecular (*docking*), que permitan predecir la interacción entre la proteína diana y el antibiótico. Este enfoque complementaría el análisis genotípico y fenotípico tradicional, proporcionando una visión más profunda.

Contribución de los Autores: Conceptualización, D.I. y A.H.; metodología, D.I. y A.H.; software, A.H y D.T.; validación, D.T., D.I. y A.H.; análisis formal, D.T, D.I y A.H.; recursos, D.I. y A.H.; curaduría de data, D.T.; escritura—preparación del borrador o draft original, D.T.; escritura—revisión y edición, D.T., D.I. y A.H.; visualización final, D.T., D.I. y A.H.; supervisión, D.I. y A.H.; administración y gestión del proyecto, D.I. y A.H.; adquisición de fondos, D.I. y A.H. Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Internacional SEK.

Agradecimientos: Al Dr. Jaime Acosta quien nos orientó y fue parte fundamental de este proyecto.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Comité de Ética en Investigación: No aplicable.

Referencias citadas.

1. Acosta, J., Satán, C., Suaste, K., Luna, C., & Rodríguez-Morales, A. (2024). Unmasking Carbapenemases molecular patterns in Ecuador: An analysis of Gram-negative bacteria, 2014-2022. Elsevier.
2. Alhamadani, Y. S., & Oudah, A. S. (2022). Study of the Bacterial Sensitivity to different Antibiotics which are isolated from patients with UTI using Kirby-Bauer Method. *Journal of Biomedicine and Biochemistry*, 1(2), 1-6. doi:10.57238/jbb.2022.19387
3. Apha Awwa, W. P. C. F. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA WEF AWWA.
4. Apha Awwa, W. P. C. F. (2023). Standard methods for the examination of water and wastewater. 24th ed. APHA WEF AWWA.
5. Arbefeville, S. S., Timbrook, T. T., & Garner, C. D. (2024). Evolving strategies in microbe identification—A comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 79(Suppl 1), i2-i8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac275>
6. Arrogante, O. (2021). Técnicas de muestreo y cálculo del tamaño muestral: Cómo y cuántos participantes debo seleccionar para mi investigación. *Enfermería Intensiva*, 33(1), 44-47. <https://doi.org/10.1016/j.enfi.2021.03.004>
7. Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 43(2), 475-485.
8. Barati, H., Fekrirad, Z., Nadoushan, M. J., & Rasooli, I. (2024). Anti-OmpA antibodies as potential inhibitors of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation, adherence to, and proliferation in A549 human alveolar epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 186, 106473.
9. Becton, Dickinson and Company. (2009). Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Sparks, Maryland, United States of America. Retrieved from https://fsl.nmsu.edu/documents/difcobbblmanual_2nded_lowres.pdf
10. Belon, C., & Blanc-Potard, A. B. (2016). Intramacrophage survival for extracellular bacterial pathogens: MgtC as a key adaptive factor. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 52.
11. Bercholz-Urinowsky, I. J., Ugalde-Resano, R., & Monge-Urrea, J. (2018). Bacteriemia relacionada con catéter permanente por *Chryseobacterium indologenes* en un paciente pediátrico con leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediátrica de México*. doi:<https://doi.org/10.18233/APM39No5pp283-2881675>
12. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2022). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170

13. Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* doi:10.1016/j.nmni.2019.100622
14. Bradford PA. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 14:https://doi.org/10.1128/cmr.14.4.933-951.2001
15. Brown, T. (2016). *Gene Cloning and DNA analysis* (Seventh ed.). Wiley Blackwell.
16. Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8), 3703–3713.
17. Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. CDC, US Department of Health and Human Services, Atlanta. Retrieved from <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
18. Cesa-Luna C, B. A.-A.-V.-G. (2020). Growth inhibition of pathogenic microorganisms by *Pseudomonas protegens* EMM-1 and partial characterization of inhibitory substances. *PLoS ONE*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240545
19. Chang, J., Kim, S., Kwak, Y. G., Um, T. H., Cho, C. R., & Song, J. E. (2023). Clinical and Microbiological Characteristics of *Chryseobacterium indologenes* Bacteremia: A 20-Year Experience in a Single University Hospital. *Infection & Chemotherapy*. doi:https://doi.org/10.3947/ic.2022.0133
20. Chaudhary, R., Kar, M., Jamwal, A., Dubey, A., Singh, R., Tejan, N., . . . Ghar, M. (2023). Characteristics of *Chryseobacterium* bacteremia, associated risk factors and their antibiotic susceptibility pattern at a university hospital: a descriptive, retrospective study. *Access Microbiology*. doi:10.1099/acmi.0.000594.v3
21. CLSI. (2025). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI supplement M100 (35th ed ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
22. Confer, A. W., & Ayalew, S. (2013). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary microbiology*, 163(3-4), 207-222.
23. Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1637-1645.
24. Corrales-Martínez, J., Jaramillo, K., Daniel A. Tadesse, C. S., Villavicencio, F. X., Sánchez-Gavilanes, L., Rivadeneira-Cueva, B., . . . Calero-Cáceres, W. (2024). Genomic characterization of a WHO critical priority isolate *Enterobacter kobei* ST2070 harboring OXA-10, KPC-2 and CTX-M-12 recovered from a water irrigation channel in Ecuador. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26379
25. Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Curtis Biología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
26. Dalynn Biologicals. (2014). *McFarland Standard*. Dalynn Biologicals. Obtenido de http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf
27. Davies, J., & Davis, D. (2010). Origin and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3): 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
28. Devi, S., Mythili, R., Dineshkumar, R., Sivaraman, G. K., Jayakumar, R., Prathaban, M., . . . Peijnenburg, W. J. (2024). Overview of Antimicrobial resistance and mechanisms: The relative status of the past and current. *The Microbe*. doi:10.1016/j.microb.2024.100083
29. Dhingra, S., Rhman, N. A., Peile, E., Rahman, M., Hassali, M. S., Islam, T., . . . Haque, M. (2020). Microbial Resistance Movements: An overview of Global Public Health Threats Psed by Antimicrobial Resistance and How Best to Counter. *Frontiers in Public Health*. doi:10.3389/fpubh.2020.535668
30. Didelot, X., & Falush, D. (2009). Chapter 2: Bacterial Recombination in vivo. En M. Hensel, & H. Schmidt, *Horizontal Gen Transfer in the evolution of Pathogenesis* (págs. 23-46). Cambridge University Press. doi:https://doi.org/10.1017/CBO9780511541520.003
31. Ermolaev, A. V., & Sorokina, T. S. (2018). On the history of the discovery of bacteriophages. *History of Medicine*, 5(1). doi:10.17720/2409-5834.v5.1.2018.08h
32. Fernandez RC, Weiss AA. (1994) .Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun*62:https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4727-4738.1994
33. Fuhrmeister, E. R., Harvey, A. P., Nadimpalli, M. L., Gallandat, K., Ambelu, A., Arnold, B. F., Brown, J., Cumming, O., Earl, A. M., Kang, G., Kariuki, S., Levy, K., Jimenez, C. E. P., Swarthout, J. M., Trueba, G., Tsukayama, P., Worby, C. J., & Pickering, A. J. (2023). Evaluating the relationship between community water and sanitation access and the global burden of antibiotic resistance: An ecological study. *The Lancet Microbe*, 4(8), e591-e600. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00137-4)
34. Fusaro, C., Miranda-Madera, V., Serrano-Silva, N., Bernal, J. E., Ríos-Montes, K., González-Jiménez, F. E., Ojeda-Juárez, D., & Sarria-Guzmán, Y. (2024). Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Street Foods: A Systematic Review. *Antibiotics*, 13(6), 481. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060481>
35. Gagetti, P., Pasteran, F., Ceriana, P., Prieto, M., Cipolla, L., Tuduri, E., ... & Corso, A. (2020). Evolución del desempeño de Laboratorios de Referencia de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44, e42. Obtenido de: doi:https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.42
36. Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015). Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Current issues in molecular biology*, 17(1), 11-22.
37. Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 185-189. Obtenido de <https://web.archive.org/web/20160610220109/http://www.asmus.org/ccLibraryFiles/FILENAME/0000000235/1884p215.pdf>
38. Guiu, A., Buendía, B., Llorca, L., Punter, R., & Girón, R. (2014). *Chryseobacterium* spp., ¿nuevo patógeno oportunista asociado a fibrosis quística? Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. doi:https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.003.
39. Gunn, J. S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in microbiology*, 16(6), 284-290.
40. Hirakawa, H., Suzue, K., & Tomita, H. (2022). Roles of the Tol/Pal system in bacterial pathogenesis and its application to antibacterial therapy. *Vaccines*, 10(3), 422.
41. Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187.

42. Huang Y, Liu J, Li J, Shan X and Duan Y (2022) Endophytic bacterium *Pseudomonas protegens* suppresses mycelial growth of *Botryosphaeria dothidea* and decreases its pathogenicity to postharvest fruits. *Front. Microbiol.* 13:1069517. doi: 10.3389/fmicb.2022.1069517
43. Huang, Z., Zhang, G., Zheng, Z., Lou, X., Cao, F., Zeng, L., ... & Li, J. (2024). Genomic insights into the evolution, pathogenicity, and extensively drug-resistance of emerging pathogens *Kluyvera* and *Phytobacter*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1376289.
44. Illumina, Inc. (2021). 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Data Sheet.
45. Illumina, Inc. (2024). BaseSpace Sequence Hub 16S Metagenomics app Software Release Notes. Data Sheet.
46. Izadi-Pruneyre, N., Huché, F., Lukat-Rodgers, G. S., Lecroisey, A., Gilli, R., Rodgers, K. R., ... & Delepelaire, P. (2006). The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25541-25550.
47. Izaguirre-Anariba D E, Sivapalan V (January 21, 2020) *Chryseobacterium indologenes*, an Emerging Bacteria: A Case Report and Review of Literature. *Cureus* 12(1): e6720. DOI 10.7759/cureus.6720
48. Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
49. Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelber, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S., & Ornston, L. N. (2011). *Microbiología Médica* (33, 104, 358 ed.). (Lange, Ed., & J. R. Pinto, Trans.) McGraw-Hill.
50. Jeong, J. J., Lee, D. W., Park, B., Sang, M. K., Choi, I. G., & Kim, K. D. (2017). *Chryseobacterium cucumeris* sp. nov., an endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root, and emended description of *Chryseobacterium arthrosphaerae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(3), 610-616.
51. Keith, L. (2017). *Environmental sampling and analysis: a practical guide*. Routledge.
52. Kim, S. G., Giri, S. S., Kim, S. W., Kwon, J., Lee, S. B., & Park, S. C. (2020). First Isolation and Characterization of *Chryseobacterium cucumeris* SKNUCL01, Isolated from Diseased Pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Korea. *Pathogens*, 9(5), 397. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050397>
53. Koch, R. (1881). *Zur untersuchung von pathogenen organismen*. Norddeutschen Buchdruckerei und Verlagsanstalt.
54. Koneman, E., Procop, G., Church, D., Hall, G., Janda, W., & Schreckenberger, P. (2017). *Koneman Diagnóstico Microbiológico* (7ta ed.). México DF: Wolters-Kluwer.
55. Koronakis, V., Stanley, P., Koronakis, E., & Hughes, C. (1992). The HlyB/HlyD-dependent secretion of toxins by Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology immunology*, 5(1-3), 44-53.
56. Leal, G. G. (2012). *Microbiología del agua. Conceptos y aplicaciones*, Primera Ed. Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería.
57. Lermineaux, N. A., & Cameron, A. D. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*, 65(1), 34–44. doi:<https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
58. Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69, 1555-1623.
59. Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis II, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., ... & Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>
60. Lossi, N. S., Manoli, E., Simpson, P., Jones, C., Hui, K., Dajani, R., ... & Filloux, A. (2012). The archetype *Pseudomonas aeruginosa* proteins TssB and TagJ form a novel subcomplex in the bacterial type VI secretion system. *Molecular microbiology*, 86(2), 437-456.
61. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K., & Fudala-Ksiazek, S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated. *Environ Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-015-5098-y
62. Malhotra-Kumar, S., Mazzariol, A., Van Heirstraeten, L., Lammens, C., De Rijk, P., Cornaglia, G., & Goossens, H. (2009). Unusual resistance patterns in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* harbouring erm (A). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(1), 42-46.
63. Medina-Pizzali, M. L., Hartinger, S. M., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A., Riveros, M., & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9837. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189837>
64. Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 413-451
65. Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-spectrum beta-lactamase producing-*Escherichia coli* isolated from irrigation waters and produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12, 709418.
66. Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(7), 1778-1782.
67. Mukerji, R. K. (2016). *Chryseobacterium indologenes*: an emerging infection in the USA. *BMJ Case Reports*. doi:<https://doi.org/10.1136/bcr-2016-214486>
68. Munita, J., & Arias, C. (2016). Mechanism of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum American Society for Microbiology Press*, 4(2). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
69. Nascimento, M., Rodrigues, J. C., Reis, L., Nogueira, I., Carvalho, P. A., Brandão, J., Duarte, A., & Jordao, L. (2016). Pathogens in Ornamental Waters: A Pilot Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(2), 216. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020216>.
70. Neff, S. L., Doing, G., Reiter, T., Hampton, T. H., Greene, C. S., & Hogan, D. A. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome analysis of metal restriction in ex vivo cystic fibrosis sputum. *Microbiology Spectrum*, 12(4), e03157-23.
71. Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z., JFK, Okeke, Okeke, . . . Okeke. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*, 5: 481-493.
72. Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643.

73. OMS-WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. (s. f.). Recuperado 6 de julio de 2025, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
74. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
75. Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-López, S., Espinel, N., & Zurita, J. (2018). *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring bla_{CTX-M-15} isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International Journal of Food Microbiology*, 41-45. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.037
76. Ortega-Paredes, D., Haro, M., Leoro-Garzón, P., Barba, P., Loaiza, K., Mora, F., ... Fernández, E. (2019). Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18: 263-268. doi:10.1016/j.jgar.2019.04.002
77. Ota, N., Nishida, T., Standley, D. M., Sherif, A. A., Iwano, S., Nugraha, D. K., ... & Horiguchi, Y. (2025). Lonidamine, a Novel Modulator for the BvgAS System of *Bordetella* Species. *Microbiology and Immunology*, 69(3), 133-147.
78. Pandey, N. K., Verma, G., Kushwaha, G. S., Suar, M., & Bhavesh, N. S. (2020). Crystal structure of the usher chaperone YadV reveals a monomer with the proline lock in closed conformation suggestive of an intermediate state. *FEBS letters*, 594(18), 3057-3066.
79. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), 10-1128.
80. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>
81. Ponce, L.-R. S., Arredondo-Hernandez, R., & Yodal, Y. L. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Médica de México*.
82. Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), 255-264.
83. Popa, O., & Dagan, T. (2011). Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 14(5), 615-623.
84. Po-Ren Hsueh, T.-R. H.-J.-J.-W. (1996). *Flavobacterium indologenes* Bacteremia: Clinical and Microbiological Characteristics. (O. Journals, Ed.) *Clinical Infectious Diseases*, 550-555. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4459671>
85. Posadas, D. M., Martín, F. A., Sabio y García, J. V., Spera, J. M., Delpino, M. V., Baldi, P., ... & Zorreguieta, A. (2007). The TolC Homologue of *Brucella suis* Is Involved in Resistance to Antimicrobial Compounds and Virulence. *Infection and immunity*, 75(1), 379-389.
86. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current protocols in bioinformatics*, 20(1). doi:<https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
87. Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., & Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(5), 1633-1641.
88. Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J.-M., Défago, G., Sutra, L., & Moënné-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(3), 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>
89. Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., de Toro, M., López, M., Toledano, P., Lozano, C., ... & Sáenz, Y. (2020). Antimicrobial resistance and virulence of *Pseudomonas* spp. among healthy animals: concern about exolysin ExlA detection. *Scientific reports*, 10(1), 11667.
90. Sakurada, A. (2008). *Chryseobacterium indologenes*. *Revista chilena de infectología*, 25 (6): 446.
91. Seale, T. W., Morton, D. J., Whitby, P. W., Wolf, R., Kosanke, S. D., VanWagoner, T. M., & Stull, T. L. (2006). Complex role of hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin binding proteins in *Haemophilus influenzae* virulence in the infant rat model of invasive infection. *Infection and immunity*, 74(11), 6213-6225. <https://doi.org/10.1128/IAI.00744-06>
92. Siguier, P., Gagnevin, L., & Chandler, M. (2009). The new IS1595 family, its relation to IS1 and the frontier between insertion sequences and transposons. *Research in microbiology*, 160(3), 232-241.
93. Silverio, M. P., Kraychete, G. B., Rosado, A. S., & Bonelli, R. R. (2022). *Pseudomonas fluorescens* complex and its intrinsic, adaptive, and acquired antimicrobial resistance mechanisms in pristine and human-impacted sites. *Antibiotics*, 11(8), 985.
94. T. Seemann. (2021) ABRicate. Melbourne-Australia. Available online: <https://github.com/tseemann/abricate>
95. Tabango-Catucumbamba, A. R. (2023). Cuantificación y aislamiento de bacterias heterótrofas y sus resistomas ambientales, en Las aguas termales del balneario El Pisque Cantón Cayambe, Provincia de Pichincha. Ecuador. Obtenido de REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/30549>
96. Tan, J., Zhang, L., Zhou, X., Han, S., Zhou, Y., & Zhu, Y. (2024). Structural basis of the bacterial flagellar motor rotational switching. *Cell Research*, 34(11), 788-801.
97. Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J. L., & Gallegos, M. T. (2003). Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3067-3072.
98. Ueda, A., & Saneoka, H. (2015). Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species. *Current Biology*. doi:10.1007/s00284-014-0749-7.
99. Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., Van Niekkerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., ... & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173.
100. Wang, M., Zhang, Y., Pei, F., Liu, Y., & Zheng, Y. (2025). Loss of OprD function is sufficient for carbapenem-resistance-only but insufficient for multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 25(1), 218.
101. Watson, J. D., Baker, T. A., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed ed.). (B. Wilbur, Ed.) United States of America: Pearson Education.
102. Yadav, V. S., Das, B. K., Mohapatra, S., Ahmed, M. N., Gautam, H., Kapil, A., Sood, S., Dhawan, B., & Chaudhry, R. (2021). Clinical correlation and antimicrobial susceptibility pattern of *Chryseobacterium* spp.: A three year prospective study. *Intractable & Rare Diseases Research*, 10(1), 37-41. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03085>

103. Zhang Y, L. D. (2021). Clinical and molecular characteristics of *Chryseobacterium indologenes* isolates at a teaching hospital in Shanghai, China. *Ann Transl Med.* doi:10.21037/atm-21-933
104. Zurita, J., Alcocer, I., Ortega-Paredes, D., Barba, P., Yauri, F., Iñiguez, D., & Mora, M. (2013). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *Journal of global antimicrobial resistance*, 1(4), 229–230. doi:10.1016/j.jgar.2013.06.001.

Anexo 1. Figuras de la distribución de antibióticos para las pruebas de sensibilidad (antibiograma).

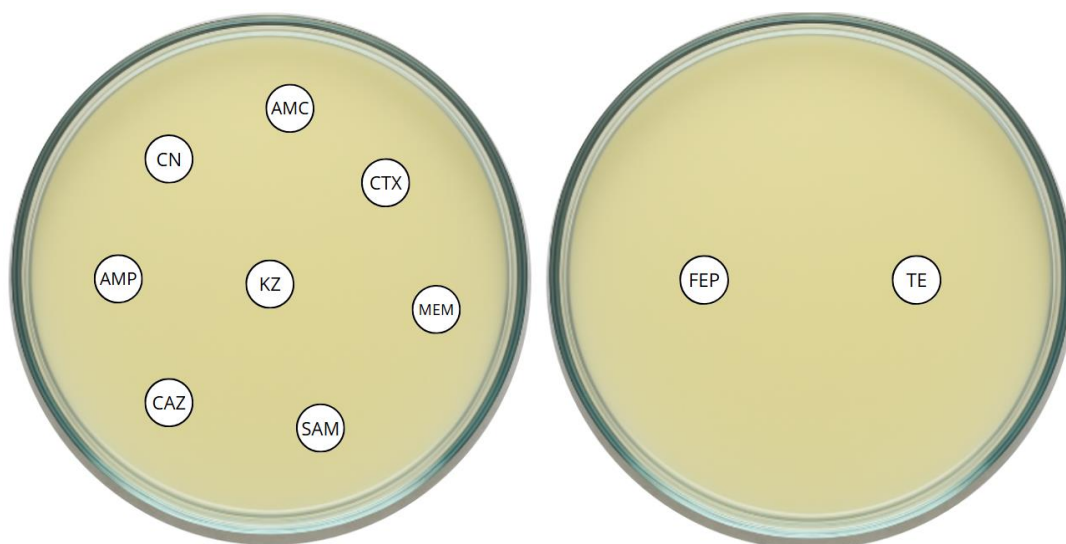


Figura 7. Distribución de antibióticos para sospecha de *Acinetobacter baumannii*.

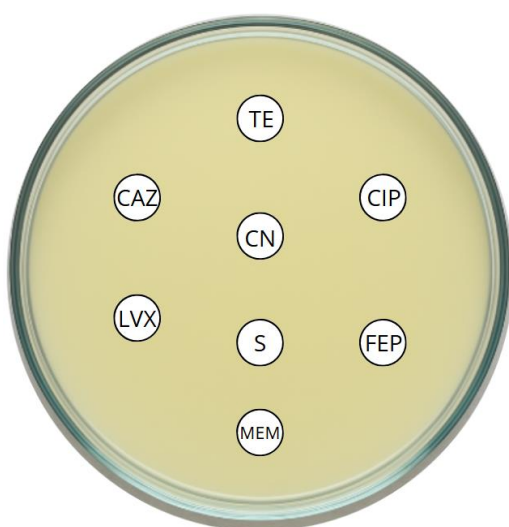


Figura 8. Distribución de antibióticos para sospecha de *Pseudomonas*.

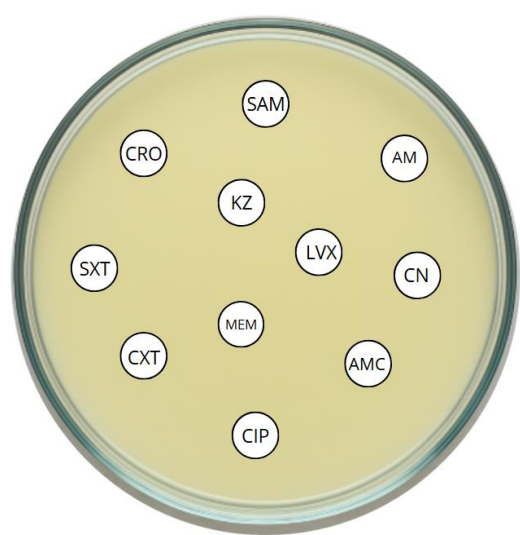


Figura 9. Distribución de antibióticos para sospecha de *Enterobacterales*.

Anexo 2

Tabla 10. Resultados de pruebas bioquímicas de bacterias Gram negativas aisladas a partir de muestras de agua.

NOMBRE COLONIA	OXIDASA	UREA	CITRATO	KLIGER	LISINA IRON	SIM (MOTILIDAD)	MRVP (RM)	MRVP (VP)	INDOL	H2S	GAS
C	-	-	+	R/A	K/A	-	+	-	-	-	+
G	-	-	+	R/A	K/A	+	+	-	-	-	+
I	-	-	+	R/A	K/A	-	+	+	-	-	-
J	+	-	+	R/R	K/K	+	-	-	-	-	-
K	-	-	+	A/A	K/A	-	+	-	-	-	-
L	-	-	-	R/A	A/A	-	+	-	-	-	+
X	V	-	+	R/A	K/A	-	-	-	+	-	+

Anexo 3

Figura 10. Reporte de secuenciación NGS - Biosequence.

Orden: **25042501**
 Fecha: 14/05/2025
 Página: 1 de 1



REPORTE DE SECUENCIACIÓN NGS N: 25042501

1. INFORMACIÓN DE CLIENTE:

Cliente: ANDRÉS HERRERA **Ciudad:** QUITO
Institución: Universidad Internacional SEK **Muestras:** 04
Teléfono: 0984066301 **Recepción:** 25-04-2025
Correo: manuel.herrera@uisek.edu.ec

2. ANALISIS REALIZADO:

El análisis de la secuenciación genética incluye:
 Secuenciación de ADN total

3. RESULTADOS:

MUESTRA ID	NOMBRE	MUESTRA		LIBRERÍA		SECUENCIACIÓN	
		Conc. (ng/μL)	Integridad (pb) > 1500 pb	Conc. (ng/μL)	Tamaño	Q30 > 70%	Lecturas
25042501-001-WGS	X	59	SI	13	~600	93.3	425167
25042501-002-WGS	J	28	SI	12	~600	90.2	445449
25042501-003-WGS	16	64	SI	14	~600	88.9	458417
25042501-004-WGS	12	98	SI	13	~600	94.6	509676

4. INTERPRETACIÓN:

No hay observaciones respecto a los resultados obtenidos

Realizado por:

Pablo Erazo
 Ingeniero en Biotecnología
 BIOSEQUENCE S.A.S

Validado por:

Paola Astudillo
 Bioquímica Farmacéutica
 BIOSEQUENCE S.A.S