

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio piloto para determinar si existe transferencia horizontal de genes entre *E. coli* aislada de lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) y *E. coli* aislada de aguas residuales domésticas, en la Isla San Cristóbal (Galápagos – Ecuador).

Sofía Verónica Barrera Suárez

Verónica Barragán, MSc. Microbiología, Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Quito, diciembre de 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Estudio piloto para determinar si existe transferencia horizontal de genes entre bacterias de lobos marinos y bacterias humanas, en la Isla San Cristóbal (Galápagos – Ecuador).

Sofía Verónica Barrera Suárez

Verónica Barragán, MSc.
Directora de la tesis
Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba P., Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis
Director del Instituto de Microbiología
USF

María De Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis
Coordinadora Biotecnología
Vicedecana COCIBA, USFQ

Stella de la Torre, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, diciembre de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Sofía Verónica Barrera Suárez

1725437360

Quito, diciembre de 2014

Dedicatoria

Mi esfuerzo es dedicado para mis papis, Rodrigo y Nora. Son mi motivación, inspiración y apoyo. Gracias por todo su cariño y por enseñarme a ser feliz. Son mis grandes amigos y sin ustedes no lo hubiera logrado. Los quiero mucho.

Para todas las personas de ciencia, descifremos juntos este universo.

Agradecimientos

A la Universidad San Francisco de Quito, por darme la oportunidad de estudiar en esta Universidad clasificación A y por brindarme tantas oportunidades.

Agradezco a Verónica Barragán, tutora de tesis, profesora, amiga y colega. Gracias por presionarme a dar más y enseñarme que siempre existe tiempo para alcanzar tus metas. Gabriel Trueba por su guía a lo largo de esta investigación. A todos las personas del laboratorio de Microbiología, por su ayuda y apoyo. A las chicas del ECODES por enseñarme la técnica.

Al Parque Nacional Galápagos y al Galápagos Science Center y sus representantes por su aporte constante en investigación.

A Stella de la Torre, Decana del COCIBA y María de Lourdes Torres Directora de carrera, por su inspiración y exigencia. A mis profesores de carrera, les agradezco por transmitirme su pasión por la biología y biotecnología.

De manera especial agradezco a mi familia, por su sacrificio y apoyo a seguir mis sueños. A mis amigos, por dejar una huella gigante en mi corazón y por los ánimos constantes que permitieron no rendirme.

A todos ustedes, gracias de corazón, no se los olvidaré.

Resumen

El lobo marino (*Zalophus wollewaeki*) forma parte de la fauna endémica de las Islas Galápagos. Debido a la presencia de asentamientos humanos en la Isla San Cristóbal y Santa Cruz, algunas colonias de lobos marinos viven dentro de las zonas pobladas de dichas islas. El presente estudio tuvo como objetivo buscar indicios del impacto que los asentamientos humanos, están causando sobre la salud de dichas colonias de lobos marinos, específicamente a nivel microbiológico. Para esto, se consideró la posibilidad de colonización cruzada de bacterias de origen humano hacia el intestino de lobos marinos y de transferencia horizontal de genes desde bacterias proveniente de agua residual doméstica hacia bacterias de lobo marino. Se comparó patrones de resistencia a 12 antibióticos en 163 *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla San Cristóbal, 58 *E. coli* aisladas de lobo marino de Isla Española y 69 aisladas de agua residual doméstica de Isla San Cristóbal. Se investigó la posibilidad de que las *E. coli* aisladas a partir de lobos marinos sean ecotipos diferentes a los aislados de humanos. También se utilizó MLST (Multilocus Sequence Typing) para genotipificar 9 *E. coli* aisladas de agua residual doméstica y 10 de heces de lobos marinos. Los resultados del presente estudio sugieren que las diferencias genéticas entre *E. coli* de origen humano y de lobo marino no son suficientes como para ser consideradas dos ecotipos distintos. Adicionalmente se encontró patrones de resistencias a antibióticos compartidos entre los aislados de lobo marino de Isla San Cristóbal y de agua residual. Este resultado sugiere una posible transferencia de genes entre *E. coli* de procedencia humana y *E. coli* de lobo marino.

Abstract

The sea lion (*Zalophus wollewaeki*) is part of the endemic fauna of the Galapagos Islands. Due to the presence of human settlements on San Cristobal Island and Santa Cruz Island, some sea lion colonies live in the inhabited areas of the islands. The aim of this study was to find evidence of the impact of human settlements on sea lion colonies health, specifically at a microbiological level. For this reason, the possibility of cross colonization of bacteria from human origin into the sea lions intestine and horizontal gene transfer from domestic sewage bacteria to sea lion bacteria was considered. Resistance patterns of 12 antibiotics were compared in 163 *E. coli* isolated from San Cristobal Island sea lions, 58 *E. coli* isolates from Española Island sea lions and 69 *E. coli* isolates from domestic wastewater of San Cristobal Island. The possibility that *E. coli* isolated from sea lion and *E. coli* isolated from domestic sewage were from different ecotypes was investigated. MLST (Multilocus Sequence Typing) was also used to genotype 9 *E. coli* isolated from domestic wastewater and 10 from sea lion feces. The results of this study suggest that genetic differences between *E. coli* from humans and from sea lions are not enough to be considered as two different ecotypes. Additionally, patterns of antibiotic resistance shared among isolates of San Cristobal Island sea lions and domestic sewage was found. This result suggests a potential gene transfer between *E. coli* from humans and *E. coli* from sea lions.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	14
1.1	Lobo marino <i>Zalophus wollebaeki</i>	14
1.1.1	Estado de los lobos marinos en las Islas Galápagos.....	14
1.2	Transferencia horizontal de genes.....	15
1.2.1	Consecuencia de la transferencia horizontal de genes.....	17
1.3	Ecotipos bacterianos.....	17
1.4	Análisis de MLST (Tipificación multilocus de secuencias) en <i>E. coli</i>	14
2.	Justificación.....	19
3.	Objetivos.....	20
3.1	General.....	20
3.2	Específicos.....	20
4.	Materiales.....	21
4.1	Recolección de muestras.....	21
4.2	Aislado e identificación de bacterias.....	21
4.3	Determinación de Fenotipo bacteriano.....	22
4.3.1	Antibiogramas.....	22
4.3.2	Pruebas para medir tolerancia a la salinidad.....	23
4.3.3	Pruebas de consumo a la lactosa.....	23
4.4	Genotipado de bacterias.....	23
4.4.1	Extracción de ADN.....	23
4.4.2	Amplificación de los genes de MLST de <i>E. coli</i> por PCR.....	23
4.4.3	Análisis de secuencias.....	24

	10
5. Metodología.....	25
5.1 Recolección de muestras.....	25
5.1.1 Localidad.....	25
5.1.2 Recolección de heces.....	25
5.1.3 Muestreo de aguas residuales.....	26
5.1.4 Rotulado de muestras.....	26
5.1.4.2 Muestras de heces.....	26
5.1.4.3 Muestras de agua residual.....	26
5.2 Aislamiento de bacterias.....	26
5.2.1 Muestras de agua residual.....	26
5.2.2 Muestras de heces de lobo marino.....	27
5.3 Congelación de cepas.....	27
5.4 Caracterización fenotípica de bacterias.....	27
5.4.1 Identificación de los aislados.....	27
5.4.2 Antibiogramas.....	28
5.4.3 Ensayo de tolerancia a la salinidad de <i>E. coli</i> humana y de lobo marino.....	29
5.4.3.1 Preparación de medios de cultivo con gradiente de concentración de sal.....	29
5.4.3.2 Cultivo de <i>E. coli</i> en medios de cultivo con gradiente de concentración de sal.....	29
5.4.3.3 Ensayos para determinar diferencias en supervivencia en agua sal de <i>E. coli</i>	30
5.4.4 Pruebas de consumo diferencial de lactosa entre cepas de <i>E. coli</i>	30
5.5 Genotipificación de bacterias mediante el análisis de MLST.....	30
5.5.1 Extracción de ADN de <i>E. coli</i> mediante método de DNazol.....	31

5.5.2	Amplificación de genes de MLST de <i>E. coli</i> mediante PCR.....	31
5.5.3	Secuenciación de genes amplificados y análisis mediante MEGA 5.1.....	32
5.5.4	Identificación de los ST obtenidos según la base de datos de MLST de <i>E. coli</i> ..	32
5.5.5	Análisis de eBURST con los ST obtenidos del análisis de MLST de las cepas de <i>E. coli</i> aislada de aguas residuales y de heces de lobo marino.....	33
5.6	Determinación del consumo de antibióticos en farmacias de Isla San Cristóbal.....	33
6.	Resultados.....	33
6.1	Caracterización de bacterias obtenidas a partir de heces de lobos marinos y agua residual doméstica.....	33
6.1.1	Análisis fenotípico.....	34
6.1.1.1	Bacterias aisladas a partir de heces de lobo marino utilizando el medio de cultivo MacConkey Lactosa y Chromocult.....	34
6.1.1.2	Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados.....	34
6.1.1.3	Comparación en la tolerancia a la salinidad entre cepas de <i>E. coli</i>	35
6.1.1.4	Pruebas de consumo diferencial de lactosa.....	36
6.2	Genotipificación de bacterias.....	36
6.2.1	Análisis de secuencias obtenidas a partir del MLST.....	36
6.2.2	Análisis de eBURST con los ST obtenidos del análisis de MLST de las cepas de <i>E. coli</i> aislada de aguas residuales y de heces de lobo marino.....	37
6.3	Reporte de antibióticos orales mas expendidos en Puerto Baquerizo Moreno.....	37
7.	Discusión.....	37
8.	Conclusiones.....	42
9.	Recomendaciones.....	43

10. Referencias.....	45
11. Tablas.....	51
12. Figuras.....	57
13. Anexos.....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antibióticos utilizados para pruebas de sensibilidad microbiana y medidas del diámetro del halo de inhibición para determinar resistencia.....	51
Tabla 2. Detalle de resistencias antibióticas y cálculo de X^2 para <i>E. coli</i> aislada de Lobos marinos de Isla San Cristóbal y de agua residual doméstica de Isla San Cristóbal.....	52
Tabla 3. Detalle de resistencias antibióticas y cálculo de X^2 para <i>E. coli</i> aislada de Lobos marinos de Isla Española y de agua residual doméstica de Isla San Cristóbal.....	53
Tabla 4. Resultado de mediciones de crecimiento de cepas de <i>E. coli</i> (en cm.) sobre el medio de cultivo de agar con gradiente de concentración de NaCl de 13% a 0%, tras 18 horas de incubación.....	54
Tabla 5. Resultado de mediciones de crecimiento de cepas de <i>E. coli</i> (en cm.) sobre el medio de cultivo de agar con gradiente de concentración de NaCl de 13% a 0%, tras 18 horas de incubación.....	55
Tabla 6. Alelos identificados para cada gen de MLST de <i>E. coli</i> de todas las cepas secuenciadas y ST asignados por la base de datos de MLST (http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli).....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la metodología utilizada A. Para marcaje de cajas con gradiente de concentración de sal y B. Medición de crecimiento bacteriano.....	57
Figura 2. Representación de resistencias antibióticas compartidas entre <i>E. coli</i> de los grupos muestreados.....	58
Figura 3. Cladograma realizado con secuencias de MLST de <i>E. coli</i> para bacterias aisladas de aguas residuales domésticas, de lobo marino de Isla San Cristóbal y de Isla Española.....	59
Figura 4. Gráfico de eBURST con ST de las cepas de <i>E. coli</i> secuenciadas.....	60
Figura 5. Antibióticos expendidos en Isla San Cristóbal durante el 1-5 de Junio del 2013.....	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de MLST de <i>E. coli</i>	62
Anexo 2. Fechas, lugares y horas de colección de muestras de heces.....	63
Anexo 3. Fecha y lugar de colecta de agua residual en Isla San Cristóbal.....	63
Anexo 4. Metodología seguida para el aislamiento de <i>E. coli</i> a partir de heces de lobo marino.....	64
Anexo 5. Metodología seguida para el aislamiento de <i>E. coli</i> a partir de agua residual.....	65
Anexo 6. Concentraciones de reactivos utilizados para PCR- MLST de <i>E. coli</i>	66
Anexo 7. Detalle de análisis bioquímico de las cepas aisladas de heces de lobo marino.....	67
Anexo 8. Amplicones producto de la PCR de MLST de <i>E. coli</i> para las muestras seleccionadas...	75
Anexo 9. Análisis de eBURST realizado con los ST identificados para cada cepa de <i>E. coli</i> secuenciada.....	76

1. Introducción

1.1 Lobo marino *Zalophus wolfebaeki*

El lobo marino *Zalophus wolfebaeki* es endémico de las Islas Galápagos, pertenece a la familia de los Otáridos, orden Carnívora y clase Mammalia. Se encuentra mayormente distribuido en las Islas del centro y sur de Galápagos. Debido su necesidad de termorregulación, elige áreas aledañas al mar ya sean de roca volcánica o de arena (Wolf et al. 2005). Esta especie posee dimorfismo sexual, los machos son más robustos, grandes y con una cresta sagital craneana prominente (Tirira D., 2007). Las colonias poseen machos alfa que protegen al harén. El periodo de apareamiento va desde mayo a enero, de tal manera que las crías nacen de junio a marzo. Las hembras amamantan a sus crías hasta los tres años de edad. Las crías aprenden a nadar durante las dos primeras semanas de vida (Heath C, 2002). La alimentación se basa en peces, la sardina es consumida principalmente en un 99% (Paez D., 2008), sin embargo se han encontrado hasta 26 especies de peces distintas en estudios de análisis de vómito y heces (Dellinger et al., 1999). El lobo marino de Galápagos posee un rol importante en el ecosistema, entre ellos, funciona como transportador de nutrientes marinos hacia las zonas terrestres (Fariña et al., 2003).

1.1.1 Estado de los lobos marinos (*Zalophus wolfebaeki*) en las Islas Galápagos

Los otáridos en general, son particularmente vulnerables dado a que estos mamíferos demuestran poliginia y dispersión en parches y entre Islas (Leah et al., 2001). La población de *Zalophus wolfebaeki* (lobo marino de las Islas Galápagos) ha declinado drásticamente desde 1960, para ese año se estimaba una población de más de 50000 individuos (Lévèque R., 1963), en 1970 la población decae aún más hasta aproximadamente 16000 individuos (Alava et al., 2011), cantidad aproximada que se mantiene en la actualidad. Según la 'IUCN Red List of Threatened Species™', esta especie se encontraba clasificada hasta 1996 como vulnerable, en la actualidad se la considera en peligro de extinción (Aurioles, D., 2003).

Las amenazas que enfrenta el lobo marino de Galápagos tienen diversos orígenes. Se ha reportado que los gatos ferales y perros matan cachorros de lobo marino (Aurióles, D., 2003). De igual manera, los cambios abruptos en la alimentación generados por el fenómeno de El Niño aumentan drásticamente la mortalidad de peces y provoca la pérdida de colonias completas (Trillmich et al., 1991). Sus predadores naturales son los tiburones y orcas (Aurióles, D., 2003). Dado a que los lobos marinos de Galápagos están en contacto con perros y gatos, pueden contraer enfermedades virales y bacterianas a partir de estos animales (Smith et al, 2002; Harvell et al, 1999; Jensen et al., 2002). De igual manera otros mamíferos introducidos como las ratas pueden ser fuente de enfermedades (Gulland et al., 1996). Desde el 2006 las poblaciones de lobos marinos han decaído en número debido a las actividades humanas como la sobrepesca o enfermedades cuyos estudios no han sido profundizados (Drago et al., 2010).

1.2 Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes es un proceso en el que un fragmento de ADN es transferido de una célula a otra por mecanismos no reproductivos, y puede ocurrir entre individuos de una misma o diferente especie. Este proceso ocurre con mayor frecuencia en procariotas y principalmente se produce por tres mecanismos: transducción, transformación y conjugación (Tortora G., 2007).

En la transducción, el ADN de una bacteria es acarreado a otra a través de un virus. En este proceso, un bacteriófago (virus que infecta bacterias) incorpora ADN bacteriano en las partículas virales y luego lleva este ADN a otras bacterias. De esta manera al infectar otra bacteria insertará en su genoma genes bacterianos nuevos. Los genes adquiridos, confieren a la bacteria nuevas características, entre éstas, patogenicidad y resistencia a agentes antimicrobianos (Gabashvili et al., 1997).

El siguiente mecanismo de transferencia de genes es la transformación. Como producto de la muerte celular, el ADN puede quedar libre en el ambiente. La transformación consiste en la

captación de este ADN a través de la pared celular bacteriana, este ADN puede luego ser incorporado en el genoma bacteriano (Chen et al., 2004). Dicho proceso puede darse naturalmente o ser inducido en laboratorio para generar bacterias recombinantes (Griffiths et al., 2000).

Un mecanismo más de transferencia horizontal de genes entre bacterias es la conjugación. Este proceso está asociado a plásmidos (molécula de ADN extracromosomal pequeña, generalmente circular, con la capacidad de auto-replicarse). La capacidad de una bacteria para transferir un plásmido es conferida por el mismo plásmido (Holmes et al., 1996); de esta manera, la bacteria que posea este plásmido, será la donadora o F⁺ y la que no posea el plásmido será la receptora F⁻, gracias al factor F o factor de fertilidad (Griffiths et al., 2000). Luego de la conjugación, tanto la bacteria donadora como la receptora conservan una copia del plásmido. Este proceso puede transferir una gran cantidad de información genética mediante plásmidos de varias megabases) (Krebs et al., 2011).

1.2.1 Consecuencias de la transferencia horizontal

Existe evidencia de que la transferencia horizontal de genes es un proceso que ocurre constantemente en ciertas bacterias, ya sean ambientales o miembros de la microbiota de organismos multicelulares (Wolska K., 2003). Por ejemplo, el 17% del genoma de *E. coli* ha sido adquirido mediante la transferencia de genes provenientes de otras bacterias (Lawrence et al., 1998).

La transferencia horizontal juega un rol muy importante en la evolución bacteriana. Los genes adquiridos pueden conferir características como resistencias ante antibióticos, resistencia a estrés, nuevas capacidades metabólicas, patogenicidad, etc. (Carattoli A., 2009; Thomas et al., 2005). Como ejemplo tenemos el caso de *Yersinia pseudotuberculosis*, la cual genera una enfermedad intestinal (Baker C., 2009). Se ha demostrado que esta bacteria dio origen a *Yersinia pestis* al adquirir ADN, transformándose en el agente causal de una enfermedad sistémica y mortal, la peste bubónica (Chain et al., 2004). Este ejemplo evidencia como las bacterias pueden adquirir genes exógenos y desarrollar una mayor capacidad patogénica. Evidencia del surgimiento de nuevos patógenos mediante intercambio de material genético es también el caso de *Escherichia coli* entero-hemorrágica humana

(EHEC), bacteria que causa enfermedad gastrointestinal severa y hemorrágica en humanos. La evolución de este patógeno fue consecuencia de un intercambio de genes entre bacterias de bovinos y bacterias de origen humano. El primer paso en este proceso fue el ingreso de cepas de *E. coli* entero patogénicas (EPEC) provenientes de humanos en bovinos. Dentro del nuevo reservorio, estas bacterias entraron en contacto con *E. coli* provenientes de bovinos, adquiriendo los genes que codifican para las toxinas stx1 y stx2, usadas por las bacterias presentes en bovinos para la protección contra protozoarios bacteriódvoros intestinales (Lainhart et al., 2009). Es así que las EPEC evolucionaron hacia un patógeno más agresivo al adquirir genes de bacterias procedentes de bovinos.

La adquisición de resistencia a agentes antimicrobianos es de gran interés médico. Debido al incremento en el uso de antibióticos de los últimos 50 años, una gran cantidad de bacterias patógenas ha desarrollado resistencia debido a la presión selectiva a la que están expuestas (Levy S., 2002). Una de las maneras por la que los genes de resistencia a agentes antimicrobianos pueden diseminarse es gracias a los mecanismos de transferencia horizontal. Actualmente 70% de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes a al menos uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas (Behra-Miellet et al., 2003). Se cree que mucha de esta resistencia es producto del uso inadecuado de antibióticos tanto en humanos como en animales domésticos, concentración de la población en centros urbanos, el inadecuado control de las infecciones en los hospitales y el movimiento humano alrededor del mundo (Avom et al., 2000).

1.3 Ecotipos bacterianos

Un ecotipo bacteriano es una población que se ha especializado en un nicho ecológico determinado. Éste también se define como una variedad genéticamente distinta al resto de la misma especie, que se ha adaptado a una condición ambiental específica. Muchas veces los distintos ecotipos bacterianos exhiben diferencias fenotípicas como cambios en la fisiología (Molles M., 2005).

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa presente en el tracto gastrointestinal de mamíferos (Finegold et al., 1983). A pesar de ser una bacteria usada ampliamente en investigación, no se conoce mucho a cerca de su ecología. Se puede pensar que debido a la diferencia en alimentación y fisiología de cada especie hospedadora, *E. coli* evolucionará en ecotipos diferentes. La teoría de nicho-nutriente de Freter postula que la cantidad de nichos en el intestino es definida por la disponibilidad de nutrientes en el mismo. Es decir, especies bacterianas individuales, poseen afinidad por nutrientes específicos contenidos en la comida ingerida. Por lo tanto, el balance de las especies bacterianas en el intestino de un hospedador dependerá de la variedad de nutrientes ingeridos y el tamaño de la población bacteriana dependerá de la concentración en la que se encuentre el nutriente requerido por esta especie en particular (Freter R., 1983).

Se conoce que los intestinos de humanos y mamíferos marinos son colonizados por *E. coli* (Higgins R., 2000; Liste et al., 2004), sin embargo se desconoce si *E. coli* proveniente de humano puede colonizar el intestino de los lobos marinos. Uno de los factores determinantes para la colonización de *E. coli* al intestino del lobo marino, es la supervivencia de la bacteria en el mar. Estudios previos demuestran que el crecimiento de *E. coli* se detiene cuando está expuesta a 3.5% de sal (salinidad marina), sin embargo, puede tolerar por varios días salinidades tan altas como 20 y 30% (Hrenovic et al., 2009).

1.4 Análisis de MLST (Tipificación multilocus de secuencias) en *E. coli*

En la actualidad, el análisis de secuencias de ADN de los organismos ha permitido estudiar la genética poblacional de las bacterias y tener un mejor entendimiento de su capacidad de diseminación. Una de las técnicas moleculares de genotipificación bacteriana es el MLST (por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la caracterización de especies microbianas mediante la secuenciación de varios genes conservados dentro de la especie pero suficientemente diferentes como para discriminar diferentes genotipos (Pérez et al., 2013). El MLST ha sido utilizado para identificar la clonalidad de cepas bacterianas y hacer seguimientos epidemiológicos (Maiden et al.,

1998). Para este propósito, una región de aproximada de 400 a 800 pb de cada gen es amplificada y secuenciada. Las secuencias son luego comparadas con una base de datos de MLST de *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), lo que permitirá determinar la secuencia tipo (ST) de cada aislado. Para el caso de *E. coli*, el MLST analiza secuencias parciales de los genes: *adhA* (adenilato cinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (DNA girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato dehidrogenasa), *mdh* (malato dehidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato dehidrogenasa), *recA* (ATP/GTP binding motif) (Wirth et al., 2006). Posteriormente, los resultados se representan en un cladograma realizado a partir de las diferencias presentadas en la secuencia de los genes.

El presente estudio tiene como fin contribuir con la conservación del lobo marino de las Islas Galápagos ampliando el conocimiento sobre el impacto generado por seres humanos a nivel microbiológico. Se analiza la posibilidad de colonización cruzada entre *E. coli* aislada de lobos marinos y *E. coli* aislada de agua residual doméstica. Además busca evidencia de transferencia horizontal mediante antibiogramas entre los aislados mencionados. Finalmente mediante el uso de MLST se analiza si existe diferencias genéticas entre *E. coli* aislada de aguas residuales domésticas y de heces de lobos marinos.

2. Justificación

En las Islas habitadas por humanos dentro del Archipiélago de Galápagos, las colonias de lobos marinos *Zalophus wollebaeki* se encuentran en contacto constante con aguas residuales domésticas. De esta manera, bacterias entéricas humanas entran en contacto directo con los lobos marinos. Existe la posibilidad de que este contacto genere colonización cruzada, de las bacterias provenientes de aguas residuales domésticas hacia el intestino de los lobos marinos. La interacción de bacterias provenientes de humanos con las bacterias provenientes de lobos marinos, podría promover transferencia horizontal de genes que codifican para resistencia a agentes antimicrobianos y factores

de patogenicidad. Este hecho podría conducir a la aparición de nuevos patógenos en los lobos marinos.

Se eligió a *Escherichia coli* para realizar este estudio debido a varios factores: 1. Es una bacteria de la cual se tienen extensas referencias; 2. Es fácilmente cultivable; 3. Existen medios de cultivo específicos para su identificación y aislamiento; (Madigan et al., 2006) 4. Es una bacteria que está presente en los intestinos de animales de sangre caliente (Finegold, 1983).

Las Islas Galápagos son un punto turístico de gran importancia a nivel mundial, pero sobre todo es un tesoro natural que debe ser protegido. El surgimiento de un nuevo patógeno podría tener efectos fatales sobre las poblaciones de lobos marinos, afectando directamente al ecosistema de las Islas. Este trabajo es pionero en estudiar el impacto que puede provocar la contaminación de agua marina, con heces fecales humanas, sobre los animales marinos de las Islas Galápagos.

3. Objetivos

3.1 Generales

- Buscar evidencia que sugiera la posibilidad de transferencia horizontal de genes entre cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales domésticas y cepas de *E. coli* aisladas de heces de lobos marinos.
- Determinar si existe colonización cruzada de *E. coli* entre humanos y lobos marinos

3.2 Específicos

- Determinar si los aislados de *E. coli* de lobo marino son un ecotipo diferente a los aislados de humano (provenientes de aguas residuales domésticas).
- Analizar las diferencias genotípicas entre cepas *E. coli* aisladas de lobo marino y cepas de *E. coli* provenientes de agua residual doméstica.

- Caracterizar fenotípicamente las cepas de *E. coli* aisladas de lobos marinos y aguas residuales mediante antibiogramas, consumo diferencial de lactosa y medida de tolerancia diferencial a NaCl entre *E. coli* aislada de lobos marinos y de agua residual doméstica.

4. Materiales

4.1 Recolección de muestras

- Bolsas de hielo químico, Rubbermaid
- Cooler, Coleman
- Culture Swab™ Cary Blair, BD Biosciences
- Cajas plásticas estériles de muestras de heces
- Envases estériles plásticos de muestras de orina

4.2 Aislado e identificación de bacterias

- Bacto Agar, BD Difco™
- MacConkey Lactose Agar, Becton-Dickinson BBL
- ChromoCult® Coliform Agar, Merk
- Urea Agar Base, Becton-Dickinson BBL
- Simmons Citrate Agar, Becton-Dickinson BBL
- Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar), Becton-Dickinson BD
- SIM Medium, Becton-Dickinson BBL™
- Reactivo de Kovacs, Merck
- Cloruro de sodio, Merck
- Estándar de turbidez de la escala Mc. Farland 0,5 , BBL
- Galerías API® 20E, Biomérieux
- Galerías API® 20NE, Biomérieux

- Incubadora, MEMMERT B40
- Glicerol, HVO
- Brain Heart Infusion (BHI), Becton-Dickinson BBL
- Tubos de plástico con tapa rosca herméticos 2ml, Axygen.

4.3 Determinación de Fenotipo bacteriano

4.3.1 Antibiogramas

- Mueller Hinton Agar, BD Difco™
- Cloruro de sodio, Merck
- Estándar de turbidez de la escala 0,5 Mc. Farland, BBL
- Incubadora, MEMMERT B40
- Cultivo bacteriano de *E. coli* en fase logarítmica
- Discos de antibiótico, Becton Dickinson BBL:
 - Ampicilina 10 µg
 - Amoxicilina – Ácido Clavulánico 30 µg
 - Cefalotin 30 µg
 - Cefotaxima 30 µg
 - Ciprofloxacina 5 µg
 - Cloroamfenicol 30 µg
 - Estreptomina 300 µg
 - Gentamicina 10 µg
 - Sulfisoxazol 0,25 µg
 - Trimetoprim-Sulfametoxazole 25 µg
 - Tetraciclina 30 µg
 - Enrofloxacin 5 µg

4.3.2 Pruebas para medir tolerancia a la salinidad

- Cloruro de sodio, Merck
- Mueller Hinton Agar, BD Difco™
- Incubadora MEMMERT B40
- Tubos Eppendorf 1.5 ml, Axygen
- ChromoCult® Agar, Merk.
- Cultivo Bacteriano en fase logarítmica

4.3.3 Pruebas de consumo a la lactosa

- MacConkey Lactose Agar (MKL), Becton-Dickinson BBL
- Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar), Becton-Dickinson BD
- Cultivo Bacteriano en fase logarítmica

4.4 Genotipado de bacterias

4.4.1 Extracción de ADN

- Tubos Eppendorf, 1.5 ml, Invitrogen
- DNAzol ® Invitrogen
- Bacto Agar, BD Difco™
- NaOH 8mM, Orica Chemicals
- Etanol al 100% y al 70%, HVO
- Microcentrífuga, Eppendorf 5415D

4.4.2 Amplificación de los genes de MLST de *E. coli* por PCR

- ADN de cepas seleccionadas de humanos y lobos marinos de San Cristóbal y Española
- Agua para PCR, Gibco
- dNTP Mix, Invitrogen
- Taq ADN Polimerasa, Invitrogen

- Buffer incoloro de PCR, Invitrogen
- Cebadores MLST- *E. coli* mostradas en la sección de Anexos: Anexo 1, Invitrogen.
- Termociclador, MJ Research PTC 200
- Agarosa , Bio-Rad
- Cámara de electroforesis, C.B.S. Scientific CO
- Fuente de poder Fisher Scientific FB300
- TBE buffer 1X (Tris, ácido bórico y EDTA)
- PBS (Fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio)
- Bromuro de Etidio (Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio), Promega
- BlueJuice™ Buffer de carga 10X, Invitrogen
- Escalera 100 pb, Invitrogen
- Trans-iluminador: Caja Oscura Kodak EDAS 290 22
- Cámara Digital Kodak DC290 DC290ZOOM

4.4.3 Análisis de secuencias

- Secuencias provistas por Functional Biosciences, Wisconsin, EEUU
- Software para el análisis de secuencias MEGA5.0, Tamura et al, ©1993-2011
- Base de datos de MLST de *E. coli*, Universidad de Warwick.
- Software de análisis eBURST, Feil et al., 2004-2014

5. Metodología

5.1 Recolección de muestras

5.1.1 Localidad

Las muestras utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas en la Isla San Cristóbal e Isla Española localizadas en el Archipiélago de las Islas Galápagos – Ecuador. El permiso para la investigación y recolección de muestras fue emitido por el Parque Nacional Galápagos el 10 de enero del 2013 (permiso número PC-01-13 PR.CDS.ACI.P01.R02). Se obtuvo muestras de heces a partir de colonias de lobo marino que descansan en Playa de los Marineros, Playa de Oro, Malecón y Punta Carola en la Isla San Cristóbal; y en Bahía Gardner y Punta Suárez en Isla Española. Las muestras de agua residual doméstica fueron recolectadas en la bomba del Municipio de Puerto Baquerizo Moreno, a donde llega el agua residual doméstica de la mayoría de casas y hoteles de Puerto Baquerizo Moreno en la Isla San Cristóbal.

5.1.2 Recolección de heces de lobos marinos.

Se recolectó 60 muestras de heces en Isla San Cristóbal y 20 en Isla Española. Con la finalidad de asegurar muestras frescas, éstas fueron colectadas entre las 5 a 6 de la mañana a partir de la arena de en la playa en donde descansaba la colonia muestreada. Se utilizó un muestreo aleatorio no estratificado. Cada muestra fue depositada en una caja plástica utilizando una paleta estéril y transportada en un contenedor con hielo a 4°C hasta los laboratorios del Galápagos Science Center. Las muestras de lobo marino de Isla Española fueron colectadas de 7 a 9 de la mañana utilizando viales con medio de transporte Cary Blair y transportadas en un contenedor con hielo a 4°C hasta los laboratorios del Galápagos Science Center (GSC). El detalle de recolección de cada muestra se observa en el Anexo 2.

5.1.3 Muestreo de aguas residuales

Se tomó muestras de agua residual doméstica de la Bomba del Municipio de Puerto Baquerizo Moreno para aislar *E. coli* proveniente de heces humanas. En contenedores plásticos estériles, se recolectó 2 muestras de agua residual en cada visita a la Bomba del Municipio. Se aislaron 5 colonias de *E. coli* por cada frasco de agua residual colectada. En total se aislaron 70 colonias de *E. coli*. Las fechas y lugar de colección se detallan en el Anexo 3.

5.1.4 Rotulado de muestras

Todas las muestras fueron rotuladas como se especifica a continuación:

5.1.4.2 Muestras de heces

El número de la salida de colecta, que se encuentra detallada en el Anexo 2, “HM” para heces recolectadas en Playa de Marinos, “HO” para heces recolectadas en Playa de Oro, “HC” para Punta Carola, “HMA” para el malecón, “HEG” para Punta Gardner y “HEPS” para Punta Suárez. Número de muestra, lugar y fecha.

5.1.4.3 Muestras de agua residual

“AA” y “AB” para la primera y segunda muestra, respectivamente, de la misma salida, seguido por el número de identificación de la colonia de *E. coli* aislada.

5.2 Aislamiento de bacterias

5.2.1 Muestras de agua residual

Las muestras de agua residual fueron sembradas directamente en ChromoCult® mediante estriación humedeciendo el hisopo con el agua colectada. Se incubó 24 horas a 37 °C. Diez colonias con actividad β - D - glucoronidasa (MUG) positivas fueron sembradas en MacConkey lactosa (MKL) por estriación e incubadas por 24 horas a 37 °C. Se tomó una colonia lactosa positiva de cada colonia sembrada en MKL y se la pasó de nuevo a ChromoCult®, para comprobar que sean MUG

positivas. Se incubó 24 horas a 37 °C. Las diez colonias bacterianas seleccionadas fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas por no más de 20 horas a 37 °C, para después ser congeladas en BHI con glicerol al 10% a -20 °C.

5.2.2 Muestras de heces de lobo marino

Las heces frescas de lobo marino fueron sembradas en MKL e incubadas por 24 horas a 37 °C. Para aislar *E. coli* se tomó tres colonias lactosa positivas y se pasó a ChromoCult®, una vez comprobada la actividad de la β -D-glucuronidasa (colonias MUG positivas) se las pasó a Agar nutritivo para luego ser congeladas a -20 °C.

5.3 Congelación de cepas

Para congelar las cepas se preparó medio BHI (Brain Heart Infusion) con 10% de glicerol, y se autoclavó la mezcla. El medio fue transferido a tubos plásticos de 1.5ml y conservado en el refrigerador a -4 °C. Antes de congelar las cepas se sembró a cada una en Agar nutritivo, luego de 24 horas de incubación a 37°C se transfirió 1.5 ml del BHI con glicerol al cultivo. Con ayuda de un palillo estéril se desprendió a las bacterias en el medio BHI con glicerol, esta suspensión fue transferida a los tubos plásticos de 1.5ml. Una vez sellados los tubos fueron congelados a -20°C, cada tubo fue marcado con el código y fecha de congelación. Se puede observar un diagrama con la metodología de aislamiento y congelación de cepas en el Anexo 4 para muestras de heces de lobo marino y en el Anexo 5 para las muestras de agua residual.

5.4 Caracterización fenotípica de bacterias

5.4.1 Identificación de los aislados

Los aislados fueron identificados mediante el uso de tinción Gram y pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron: Presencia de citocromo c oxidasas mediante la prueba de oxidasa, determinación de producción de ureasa mediante el medio urea, la producción de citrato liasa mediante el consumo de citrato, la producción de sulfuro de hidrogeno, consumo de lactosa y

de sacarosa mediante el uso de TSI (Triple sugar iron), la producción de indol, reducción de sulfuro y motilidad mediante el uso de SIM y finalmente; la capacidad de producir β -D-galactosidasa (cliva al Salmon-GAL) y β -D-glucoronidasa (que reacciona con x-glucoronide) del medio ChromoCult®. Las bacterias oxidasa negativo que no se pudo identificar con estas pruebas fueron identificadas utilizando la galería API E (Cullimore R., 2000)

5.4.2 Antibiogramas

Los antibiogramas de los aislados fueron realizados mediante el uso del medio Mueller Hinton Agar (Merck). Para realizar los antibiogramas se utilizó el método de difusión de disco y de Kirby-Bauer, y una suspensión 0,5 McFarland en solución salina (Bauer et al., 1966). Los antibiogramas fueron realizados con los 12 antibióticos mencionados en la sección 4 de materiales. Después de incubar los antibiogramas por 18 horas a 37 °C, se midió el diámetro de los halos formados debido a la inhibición de crecimiento bacteriano. Para determinar la susceptibilidad o resistencia a antibióticos se tomó en cuenta las medidas determinadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute, (2007); los mismos se detallan en la Tabla 1. Los patrones de sensibilidad antimicrobiana fueron tabulados en una tabla de Excel (Microsoft Office). Para determinar diferencias significativas entre los tres grupos muestreados (Lobos Isla San Cristóbal vs. aguas residuales Isla San Cristóbal, lobos de Española vs. aguas residuales de Isla San Cristóbal y lobos de Isla San Cristóbal vs. lobos de Española) se utilizó la prueba de X^2 .

5.4.3 Ensayo para determinar la tolerancia a la salinidad de *E. coli* humana y *E. coli* de lobo marino

5.4.3.1 Preparación de medios de cultivo con gradiente de concentración de NaCl

Se procedió a realizar la preparación de agar nutritivo con una gradiente de concentración de NaCl mediante el método de Winberg (1959). Antes de realizar el procedimiento se señaló las cajas petri de plástico colocando una cruz que divide a la caja en cuatro cuadrantes iguales y un signo

positivo en el lado donde irá mayor concentración de sal. Se inclinó las cajas Petri de plástico elevando uno de los lados de la caja 4 mm sobre una mesa nivelada. Se preparó una botella con 160 ml de agar nutritivo y otra con 160 ml de agar nutritivo más 13% de NaCl. En las cajas previamente inclinadas se colocó con una probeta estéril 15 ml de agar nutritivo sin sal, se dejó solidificar en esta posición durante toda la noche. Al día siguiente, se colocó las cajas en posición horizontal y se procedió a verter la segunda capa de 15 ml de agar nutritivo con el 13% de NaCl utilizando una probeta estéril. Se esperó media hora para que el medio se solidifique y se procedió a sellar las cajas con Parafilm para colocarlas en la incubadora a 37°C por 10 horas para que ocurra difusión y se cree una gradiente de concentración.

5.4.3.2 Cultivo de *E. coli* en medios con gradiente de concentración de NaCl

Para determinar la tolerancia de los aislados frente a la salinidad, se procedió a sembrar en todas las cajas, 5 cepas de *E. coli*, 2 aisladas de aguas residuales, 2 cepas *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla San Cristóbal y una cepa de *E. coli* aislada lobos marinos de Isla Española. Para asegurar inóculos comparables de cada aislado se realizó una dilución al 0,5 McFarland y con un hisopo se sembró en el agar formando una línea recta a través del gradiente de NaCl (una sola pasada). Se realizó la siembra de cada caja por duplicado. Una vez transcurridas 16 horas de incubación se midió el crecimiento bacteriano a través del gradiente. El esquema de siembra y medición se ilustran en la Figura 1. Se utilizó la prueba de t de student para determinar diferencias en resistencia a la salinidad entre las cepas de *E. coli* analizadas.

5.4.3.3 Ensayos para determinar diferencias en tiempo de supervivencia de *E. coli* aislada de agua residual doméstica y *E. coli* aislada de lobos marinos en solución salina.

Este experimento fue realizado para determinar si existe diferencias en el tiempo en que las cepas de *E. coli* aisladas de agua residual (6 cepas) y *E. coli* aisladas de lobos marinos (6 cepas) sobreviven en agua de mar. Las cepas que se analizaron fueron elegidas al azar. Se colocó 200 µl de

cultivo fresco de cada aislado en 1ml de solución salina al 3.5% para luego ser incubados a 37 °C. Para cada aislado se preparó 11 tubos con dicho procedimiento y a día seguido se tomó un tubo de cada cepa e inoculó 10 µl de la solución en agar nutritivo. Las cajas de agar nutritivo fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, luego de este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) observadas. Finalmente y para verificar que no exista contaminación con bacterias ambientales, se realizó un traspaso de 5 de las colonias de cada cultivo a ChromoCult Agar y verificó que sean MUG positivas.

5.4.4 Pruebas de consumo diferencial de lactosa entre cepas de *E. coli* aisladas de lobos marinos y aisladas de agua residual

Este experimento se realizó para determinar si existen diferencias en el consumo de lactosa entre las cepas de procedencia humana (6 cepas) y las aisladas de lobo marino (6 cepas). Las cepas mencionadas fueron seleccionadas al azar y sembradas en TSI (Triple Sugar Iron) y en MacConkey Lactosa agar. Se observó el cambio de color en el medio de cultivo a las 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 24 horas de incubación. El cambio de color de rojo a amarillo indica la degradación de la lactosa en TSI mientras que en MKL se observa una coloración rosada.

5.5 Genotipificación de bacterias mediante el análisis de MLST.

Se procedió a realizar el análisis de MLST (Multilocus sequence typing) sugerido por Wirth et al., (2006), para la tipificación de *E. coli*. Este análisis utiliza secuencias de las regiones más conservadas de los genes *adh*, *fumC*, *mdh*, *icd*, *gyrB*, *recA* y *purA*.

5.5.1 Extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) de *E. coli* mediante método de DNAzol

La extracción de ADN fue realizada utilizando DNAzol (Invitrogen). Se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante. De manera aleatoria se seleccionó aislados de *E. coli* obtenidos a partir de aguas residuales de Isla San Cristóbal (10 cepas), lobos marinos de Isla San Cristóbal (5 cepas) y lobos marinos de Española (5 cepas). Cuatro colonias de estos aislados fueron

resuspendidas en 800 µl de PBS, y centrifugadas 5 min a 16110 x g. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 800 µl de PBS, se repitió la centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió en el volumen que quedaba, con ayuda de un vórtex. Se añadió 500 µl de DNazol e invirtió los tubos despacio para lisar las células. Se añadió 500 µl de etanol al 100%, invirtió de nuevo los tubos con cuidado y se dejó reposando por 3 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 9245,6 x g. Se eliminó el sobrenadante y colocó 1000 µl de etanol al 70%. Luego de centrifugar la mezcla se eliminó el sobrenadante y finalmente se añadió 300 µl de NaOH 8mM para luego ser congeladas. Antes de utilizar dicho ADN se dejó descongelar en hielo y centrifugó 5 segundos a 9245,6 x g, la fase acuosa fue recuperada con una micro pipeta.

5.5.2 Amplificación de genes de MLST de *E. coli* mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Las cepas de *E. coli* seleccionadas fueron analizadas individualmente utilizando los cebadores utilizados para MLST por Wirth T, et al. (2009). En cada reacción de amplificación se utilizó agua libre de DNAsas, solución tampón 1X (Promega), MgCl₂ µM, dNTPs 0.2 mM, 10 µM de cada cebador, 0.5 U de Taq polimerasa y 50 ng de ADN. Para mayor detalle de las concentraciones iniciales y cálculos de volúmenes requeridos, referirse al Anexo 6.

La amplificación del ADN mediante PCR fue realizada utilizando los ciclos que se describen a continuación. Para los genes *adk*, *mdh*, *icd*, *gyrB*, *recA*, *purA* se realizó, una primera fase de 2 minutos a 95 °C para la denaturación inicial seguida por un minuto a 95 °C, a continuación 30 ciclos de un minuto a 55 °C para la unión del cebador y 2 minutos a 72 °C para la extensión. Finalmente se realizó una extensión final de cinco minutos a 72 °C. Para el gen *fumC*, se realizó una variación de la temperatura de unión del cebador colocando un minuto a 60 °C (Wirth et al., 2006). Para comprobar la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% por 35 minutos a 80 Voltios.

5.5.3 Secuenciación de genes amplificados y su análisis mediante el programa MEGA

Los amplicones obtenidos a partir de la PCR fueron enviados a Funcional Biosciences (Wisconsin, EEUU) para ser secuenciados. Una vez obtenidos los archivos “.ab1” del secuenciador, se realizó un alineamiento de la secuencia forward y reverse para cada muestra, y se usó el programa MEGA5.0 (Tamura et al, 1993-2011). Se procedió a depurar las secuencias manualmente y posteriormente se realizó una comparación con la base de datos del Genbank (International Nucleotide Sequence Database Collaboration, 2007), se utilizó el programa BLAST. En base a estos resultados se logró determinar la identidad de los fragmentos secuenciados, mediante el porcentaje de cobertura, de similitud cada alineamiento y valor E, como parámetros para determinar el nivel de confianza de la identificación.

Adicionalmente se concatenó las secuencias de los 7 genes en el orden en el que se encuentran dentro del genoma, dichas secuencias fueron alineadas mediante el uso de la función “alinear por músculo” del programa Mega 5.1. (Tamura et al., 2001) Una vez alineadas las secuencias se construyó un árbol filogenético mediante el método Maximun composite likelihood. Este método de agrupación, se construye múltiples árboles posibles y es seleccionado el más probable a ser formado (Felsestain J., 1985). La alineación de secuencias fue basada en el modelo de parámetro-Kimura 2 (Kimura M., 1980).

5.5.4 Identificación de los ST obtenidos según la base de datos de MLST de *E. coli*

Se realizó una comparación con la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick (Wirth et al, 2006), para observar a que complejos clonales y ST pertenecen las cepas analizadas. Se introdujo en la base de datos los alelos de cada gen (ST) que no se encontraban reportados de cepas aisladas de lobos marinos y de agua residual.

5.5.5 Análisis de eBURST con los ST obtenidos del análisis de MLST de las cepas de *E. coli* aislada de aguas residuales y de heces de lobo marino.

Para comprobar las relaciones filogenéticas entre los aislados de *E. coli* corrió un análisis de eBURST (Feil et al., 2004). Para esto se accedió a la página de eBURST http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/. Se realizó una matriz con el código de los ST identificados para cada muestra y se ingresó estos datos en el programa eBURST.

5.6 Determinación del consumo de antibióticos en farmacias de Isla San Cristóbal

Para poder relacionar la frecuencia de resistencias a antibióticos encontradas en cepas aisladas de lobos marinos y de aguas residuales domésticas con la cantidad de antibióticos expendidos en la Isla San Cristóbal, la semana del 1 al 5 de Junio del 2013 se recorrió las farmacias de Puerto Baquerizo Moreno realizando una encuesta sobre el inventario de ventas en una semana de los antibióticos ingeribles más expendidos. Se realizó un promedio para reportar la cantidad de antibiótico expendida por día, para cada farmacia. Las farmacias encuestadas fueron: La farmacia del Hospital Oscar Jandil, Farmacia “Sana Sana”, Farmacia “Cruz azul”, Farmacia “Su Farmacia” y Farmacia “San Cristóbal”. Posteriormente se realizó un promedio utilizando los datos colectados en las farmacias, de esta manera se obtuvo un estimado de la cantidad de tabletas expendidas por día en Puerto Baquerizo Moreno.

6 Resultados

6.1 Caracterización de cepas de *E. coli* obtenidas a partir de heces de lobos marinos y agua residual doméstica.

Se logró obtener un total de 70 aislados de bacterias *E. coli* a partir de agua residual doméstica, 61 aislados a partir de las 20 muestras de heces de lobo marino de la Isla Española y 185 aislados a partir 60 muestras de heces de lobo marino de la Isla San Cristóbal.

6.1.1 Análisis fenotípico.

6.1.1.1 Aislamiento de *E. coli* e identificación de otras bacterias aisladas en MacConkey Lactosa y Chromocult a partir de muestras de heces de lobo marino.

Se pudo determinar que de las 80 muestras de heces colectadas solamente el 54.4% poseía *E. coli*. De las 20 muestras de heces colectadas en Isla Española se identificó *E. coli* en el 50%, en el porcentaje restante de muestras se logró identificar a *Edwardsiella* sp. y bacilos gram negativos como flora cultivable predominante en medio MacConkey Lactosa. En cuanto a las 60 muestras colectadas en Isla San Cristóbal, el 56.75% contenían *E. coli*, el 51,35% *Edwardsiella tarda*, el 10.81% *Enterobacter* spp., el 8.10% *Klebsiella* spp., el 5.4% *Citrobacter* spp., y un 5.4% de las muestras presentaron bacilos gram negativos oxidasa positivos. El detalle de las bacterias aisladas de cada muestra colectada, se encuentra en el Anexo 7.

6.1.1.2 Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados.

Se encontró patrones de resistencia compartidos entre cepas *E. coli* aisladas de aguas residuales domésticas y de lobo marino como se puede observar la Figura 2. En las bacterias aisladas de aguas residuales, 40,58% presentaron al menos una resistencia y se observó hasta 9 resistencias en una misma cepa de *E. coli*. De bacterias aisladas a partir de heces de lobos marinos de Isla San Cristóbal, 32,92% registraron una o más resistencia a los antibióticos testeados, se registraron hasta seis resistencias en una sola cepa. En las *E. coli* aisladas de heces de lobos marinos de Isla Española, el 31,6% de cepas fueron resistentes a más de un antibiótico y se registró máximo hasta 3 resistencias en una sola cepa. Se encontró diferencias significativas en la resistencia a AM 10 µg ($p=0.0026^{**}$), C 30 µg, ($p=0.00054^{**}$), CIP 5 µg ($p=0.00164^{**}$), SXT 5 µg ($p=1.28 \times 10^{-10}^{**}$), GM 10 µg ($p=0.0156^*$), S 10 µg ($p=0.0022^{**}$), TE 30 µg ($1.994 \times 10^{-10}^{**}$), G 250 µg ($p=0.022$), ENO 5 µg ($p=0.0000026^{**}$) entre las *E. coli* aisladas a partir de lobos marinos provenientes de la Isla San Cristóbal y de agua residual doméstica de la misma isla. Estos resultados pueden ser observados en mayor detalle en la Tabla 2. En la comparación de patrón de resistencia a antibióticos entre *E. coli*

aisladas de lobos marinos y de aguas residuales domésticas de Isla San Cristóbal, Amoxicilina (AMC), Cefotaxime (CTX) y Gentamicina (GM) exhiben valores de p por encima de $\alpha=0.05$ (valor crítico). Sin embargo, en dos de ellos (AMC, CTX), estos valores están influenciados por el bajo número de resistencias encontradas.

En cuanto a la comparación entre las *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla Española y aguas residuales de Isla San Cristóbal se obtuvo diferencias significativas para los antibióticos AM 10 μg ($p=0.0065$), C 30 μg ($p=0.0077$), CIP 5 μg ($p=0.022$), SXT 5 μg ($p=0.00000832$), TE 30 μg ($p=0.000002$), G 250 μg ($p=0.006$), ENO 5 μg ($p=0.0027$). En la Tabla 3 se puede observar en mayor detalle los resultados de esta comparación.

Por último, en la comparación de *E. coli* aislada de lobos de Isla Española y de lobos de Isla San Cristóbal se obtuvo diferencias significativas para AM 10 μg ($p=0.0065$), C 30 μg ($p=0.0077$), CIP 5 μg ($p=0.022$), SXT 5 μg ($p=0.00000832$), TE 30 μg ($p=0.000002$), G 250 μg ($p=0.006$) y ENO 5 μg ($p=0.0027$). El detalle de estos datos se pueden observar en la Tabla 4.

6.1.1.3 Comparación en la tolerancia a salinidad entre *E. coli* aisladas de lobo marino y *E. coli* aisladas de agua residual.

Se realizó dos pruebas para determinar la tolerancia y supervivencia de *E. coli* con respecto a la salinidad. En la primera prueba, 3 cepas de *E. coli* aisladas de heces de lobo marino y 2 de aguas residuales fueron sometidos a un gradiente de concentración de 13% de NaCl. Los valores obtenidos (cm) fueron analizados utilizando la prueba estadística de t de student (Tabla 5). No se encontró diferencias significativas en la tolerancia al gradiente de salinidad entre las cepas aisladas de agua residual y de lobo marino ($p=0,68$).

La segunda prueba consistió en mantener 12 *E. coli* (6 de procedencia humana y 6 de lobos marinos) en solución salina al 3.5% y determinar cuánto tiempo toleraban los aislados en dicha

condición. Luego de 60 días de incubación, tanto las cepas de *E. coli* aisladas de lobo marino como agua residual no mostraban susceptibilidad a las concentraciones altas de NaCl.

6.1.1.4 Pruebas de consumo diferencial de lactosa.

No se obtuvo diferencias en cuanto al consumo de lactosa entre las cepas de *E. coli* aisladas de agua residual y de heces de lobo marino. Se determinó que todas las cepas probadas consumían lactosa (fenotipo A/A) luego de 6 a 8 horas, independientemente de su procedencia, este resultado fue corroborado en el medio de cultivo MKL.

6.2 Genotipificación de *E. coli* aislada de lobo marino y aguas residuales.

Las amplificaciones para todos los genes (*adhA*, *mdh*, *icd*, *gyrB*, *recA*, *purA*) se realizaron exitosamente, obteniendo el fragmento del tamaño esperado para cada gen (Anexo 8). Esto fue comprobado con electroforesis en agarosa y posterior secuenciación.

6.2.1 Análisis de secuencias obtenidas a partir del MLST.

En la Figura 3, se presenta el cladograma construido en base a las secuencias de los genes de MLST. En el árbol filogenético se puede observar, que las cepas aisladas de lobos marinos, se agrupan entre ellas a excepción de una la cepa Ec8LE. Esta *E. coli* proveniente de un lobo marino de Isla Española, se agrupa en el clado de las cepas aisladas de aguas residuales domésticas. Además, dentro del clado de las cepas aisladas de lobo marino, se observa una cepa aislada de agua residual doméstica Ec6HC.

En la base de datos de MLST de *E. coli* de la Universidad de Wawick (Atchman et al., 2014), se buscó los ST de las cepas aisladas para determinar la relación con sus hospedadores. Se determinó que los ST de las cepas EC7LSC (4218), EC10LE (4219) y EC19LSC (4220), son nuevos reportes. En la Tabla 6 se pueden observar en detalle los ST obtenidos para cada cepa.

6.2.2 Análisis de eBURST

El análisis de eBURST con los ST de los aislados de *E. coli* a partir de aguas residuales y de heces de lobo marino, muestra que existen dos grupos filogenéticos. El primer grupo señalado con color morado en la Figura 4 consiste en 4 aislados de *E. coli* a partir de agua residual doméstica agrupados en 3 STs (10, 48, 744). El segundo grupo señalado con color verde consiste en 5 aislados de *E. coli* aislados a partir de heces de lobos marinos agrupados en dos ST (1905 y 4229). Las demás cepas se clasificaron como “independientes”. Estos resultados, se pueden observar con mayor detalle en el Anexo 9.

6.3 Reporte de antibióticos orales más expendidos en Puerto Baquerizo Moreno.

Se pudo determinar que durante la semana de encuestas del 1 al 5 de junio del 2013, la Ciprofloxacina fue el antibiótico más expendido, aproximadamente se vende 171 tabletas diarias en Puerto Baquerizo Moreno. La Amoxicilina fue el segundo antibiótico más consumido con aproximadamente 169 tabletas expendidas diariamente, seguido por la Dicloxacina (65 tabletas por día), Ampicilina (53), Trimetoprim Sulfametoxasol (45), Claritromicina (45), Cefalotina (32), Cefuroxime (19), Acitromicina (16), Eritromicina (12), Tetraciclina (7), Clindamicina (7) y por último Gentamicina (5). Los datos obtenidos se detallan en la Figura 5.

7 Discusión

El lobo marino (*Zalophus wollebaeki*) cumple un importante rol ecológico en las Islas Galápagos (Fariña et al., 2003). Debido a esto y al riesgo de extinción de esta especie (Alava et al, 2011), es importante promover investigación científica que contribuya a la conservación del lobo marino. Dado que algunas colonias de lobos marinos en la Isla San Cristóbal se encuentran junto a zonas pobladas, es muy probable que las actividades humanas causen gran impacto sobre la salud de estos individuos. Más aún, si las aguas residuales domesticas son vertidas en zonas donde habitan numerosas colonias de lobos marinos. Durante esta investigación se observó indicios del impacto de

las actividades del ser humano sobre la población de lobos marinos a nivel microbiológico. La posibilidad de que bacterias de origen humano puedan transferir, hacia bacterias intestinales de lobo marino, genes que codifican resistencia antibiótica, fue determinada utilizando *E. coli* aislada a partir de heces de lobos marinos y de agua residual doméstica.

Para que *E. coli* proveniente de humanos transfiera genes hacia *E. coli* de lobos marinos mediante conjugación, se requiere contacto físico entre las dos bacterias. Esto implicaría, que *E. coli* de origen humano, debería colonizar exitosamente el intestino del lobo marino después de sobrevivir a la salinidad marina. En esta investigación, los ensayos de tolerancia a la salinidad con *E. coli* revelaron que no existen diferencias en cuanto a tolerancia a la salinidad entre *E. coli* aislada a partir de heces de lobo marino y *E. coli* aislada de agua residual doméstica. Los dos grupos de aislados toleran altas concentraciones de sal (mayores a la salinidad marina) y pueden sobrevivir por más de un mes sin nutrientes disponibles en solución salina al 3.5%. A pesar de que *E. coli* no es una bacteria halotolerante (Hrenovic et al., 2009), los resultados obtenidos corroboran otros estudios en los que *E. coli* puede tolerar por varios días, salinidades muy altas (Hrenovic et al., 2009).

Con el objetivo de determinar que puede existir colonización cruzada de *E. coli* de origen humano hacia el intestino del lobo marino, se procedió a identificar la presencia de ecotipos. Un ecotipo está definido como un grupo de organismos dentro de una misma especie que poseen adaptaciones genéticas a un hábitat o condiciones específicas (Cohan et al., 2007). En el caso de que la *E. coli* que habita en el intestino del lobo marino pertenezca a un ecotipo diferente, la colonización cruzada se vería limitada para *E. coli* proveniente de humano, ya que esta no tendría las características necesarias para sobrevivir en este hábitat. Luego del análisis genotípico, mediante MLST para la determinación de ecotipos (Francisco et al., 2012) se pudo detectar diferencias entre las cepas de *E. coli* analizadas. El árbol filogenético de la Figura 3, muestra una clara separación entre las *E. coli* aisladas de lobos marinos y *E. coli* aisladas de aguas residuales. Resultados similares se pudo observar con el análisis de eBURST, en cuyo caso se definieron dos grupos. El primer

grupo formado por cuatro *E. coli* aisladas de agua residual y un segundo grupo con cinco aislados de *E. coli* de heces de lobos marinos. Los resultados tanto del gráfico de eBURST como del árbol filogenético armado con las secuencias de los genes para MLST, sugieren que existen diferencias genéticas entre los aislados de *E. coli* de los dos grupos estudiados. Estas diferencias a nivel genético en bacterias generalmente se generan por dos rutas, deriva génica o selección periódica (Kopac & Cohan, 2011). La deriva génica tiene mayor fuerza sobre poblaciones pequeñas por ejemplo en el caso de endosimbiontes obligados que se transmiten, en números muy pequeños, entre hospedadores (Wernegreen et al., 1999). En la selección periódica una mutación adaptativa se vuelve predominante en el genotipo a nivel de población (Cohan et al., 2006). Con el análisis realizado, no se puede determinar con seguridad cuál de los mecanismos mencionados ha ocurrido para dar origen a las diferencias genéticas observadas entre las bacterias aisladas de lobos marinos y de aguas residuales.

A pesar de la agrupación que se presenta en el árbol filogenético de las bacterias de lobos marinos entre sí y las de aguas residuales en otro clado, también encontramos dos cepas que se agrupan de manera distinta. Una cepa de *E. coli* aislada de agua residual se agrupa en el clado de las *E. coli* aisladas de heces de lobos marinos y una cepa de *E. coli* aislada de lobo marino que se agrupa con las *E. coli* aisladas de agua residual. Estos resultados reflejan que las diferencias genéticas de algunas cepas de ambos orígenes, no son suficientes, ya que se agrupan juntas en este tipo de análisis filogenético (Felsestein, 2004). Al no existir muchas diferencias genéticas, probablemente estos dos grupos de *E. coli* no pertenezcan a dos ecotipos distintos. Por lo tanto, las condiciones a las que están expuestas las *E. coli* de lobo marino, no son tan diferentes a las que están expuestas las *E. coli* en humanos. Esto quiere decir que sería posible una colonización cruzada.

Otra de las pruebas que se realizó para determinar si *E. coli* aislada a partir de heces de lobo marino representaba un ecotipo diferente a la *E. coli* de origen humano, se basó en determinar diferencias al consumir lactosa. Debido a que en los lobos marinos la leche posee valores menores al 0.001% de lactosa (Pilson et al, 1963), se esperaba una menor capacidad en las cepas aisladas de

lobo marino para degradar este azúcar. Sin embargo, los resultados encontrados no muestran diferencias en cuanto al consumo de dicho azúcar entre los dos grupos analizados. Por lo tanto este análisis no permitió determinar que los aislados de *E. coli* a partir de heces de lobo marino son un ecotipo diferente al de origen humano.

Para encontrar indicios de transferencia horizontal entre *E. coli* de origen humano y *E. coli* de lobo marino se procedió a buscar similitudes en los patrones de resistencia antibiótica entre estos dos grupos (Figura 2). Se observaron resistencias antibióticas en las *E. coli* de los tres grupos muestreados. Es interesante observar que entre las *E. coli* aisladas de agua residual y de lobos de Isla San Cristóbal existen resistencias compartidas para los antibióticos: C (3/159), CIP (2/159), SXT (3/159), ENO (1/159) y CTX (1/159), las mismas que no se encuentran en *E. coli* aislada de lobos marinos de Isla Española. Este hallazgo podría ser un indicio de transferencia horizontal de genes entre estos dos grupos de bacterias. Como se puede observar en la Tabla 2, las resistencias a antibióticos se presentan en pocas *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla San Cristóbal. Esta baja cantidad de resistencias a antibióticos es un resultado esperado ya que los lobos marinos no están en contacto directo con antibióticos. Al no tener la presión selectiva constante de un antibiótico, las bacterias tienden a eliminar los genes de resistencia a los mismos del acervo genético, para incrementar su éxito reproductivo (Koskiniemi et al., 2004).

Los aislados de *E. coli* de lobos marinos de Isla Española fueron tomadas como grupo control (debido a que las colonias de lobos marinos no se encuentran en contacto con desechos de origen humanos). Se esperaba que en este grupo no se presenten resistencias a antibióticos, sin embargo, se presentaron resistencias a AM (2/57), CF (10/57), GM (1/7), S (6/57), TE (1/57) y G (8/57). Dado a que *E. coli* no posee resistencia intrínseca a los antibióticos utilizados en el análisis de susceptibilidad, podríamos especular que estas resistencias fueron desarrolladas o adquiridas (Stock et al., 1998). Una posible explicación es que a pesar de que Isla Española no es habitada, si recibe visitas turísticas en Punta Suárez y Bahía Gardner, puntos donde se realizó el muestreo (PNG, 2013).

Puede ser que debido a esto se haya dado contaminación de estos lugares con genes de resistencia a antibióticos y este no sea un buen grupo control.

Considerando el número de bacterias resistentes a los antibióticos testeados (Tabla 2, 3 y 4), podemos argumentar que el grupo de aislados de *E. coli* de origen humano (aguas residuales) difiere del grupo de aislados de lobo marino de la Isla San Cristóbal en 9 de los 12 antibióticos. El haber encontrado un mayor número de resistencias a antibióticos en bacterias provenientes de humanos, era un resultado esperado, ya que los seres humanos están expuestos permanentemente a estos agentes que funcionan como una presión selectiva sobre las bacterias hospedadoras (Albrich et al., 2004).

A pesar de que, según la encuesta realizada, la Amoxicilina (AMC) es el antibiótico más vendido en Puerto Baquerizo Moreno (aproximadamente 169 tabletas diarias), no se encontró resistencias a este agente antimicrobiano en *E. coli* aislado de aguas residuales. Sin embargo se observó un aislado resistente a AMC proveniente de heces de lobo marino de Isla San Cristóbal. Este hallazgo pudo deberse a que se analizó un mayor número de *E. coli* proveniente de lobo marino de Isla San Cristóbal, por lo que es posible que este gen también se encuentre en *E. coli* de humanos y no haya sido detectado.

Otro resultado interesante fue el encontrar aislados de *E. coli* de heces de lobo marino de la Isla San Cristóbal con resistencia a Cefalotina (CF) en igual proporción (sin diferencias significativas) que en los aislados de origen humano ($p=0,775$). Dicho hallazgo abre las puertas a una segunda etapa de este proyecto: sería interesante profundizar en el análisis del gen que codifica para la resistencia a CF para determinar de manera certera si estamos observando evidencia de transferencia horizontal entre bacterias provenientes de humanos y de lobos marinos.

Retomando el análisis de MLST, este permitió realizar reportes de 3 cepas de *E. coli* con ST nuevos encontradas en lobos marinos, en la base de datos de MLST de *E. coli* de la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>): La cepa Ec7LSC con el ST 4218, la cepa EC10LE con el ST 4219 y la cepa EC19LSC con el ST 4220. También se reportó el aislamiento de

16 cepas de *E. coli* cuyas secuencias tipo (ST) ya han sido identificados previamente, en varias *E. coli* alrededor del mundo.

Finalmente, respecto a la presencia de *E. coli* en las muestras de heces de lobo marino, solamente se logró aislar *E. coli* en el 54.4% de las muestras de heces. Este porcentaje se encuentra cercano al 47.6% reportado por Carrasco S., en el 2011 en otros pinípedos. La baja presencia de *E. coli* el tracto digestivo del lobo marino podría atribuirse a que, a diferencia de los omnívoros y herbívoros, no poseen una cámara fermentadora (Gordon et al., 2003). Estimando porcentajes, el segundo tipo de bacteria, más abundante, aislada en muestras de heces de lobo marino fue *Edwardsiella tarda*. Esta bacteria es microbiota normal en peces (Verjan et al., 2005). Dado a que la alimentación de los lobos marinos se basa en peces (Dellinger et al., 1999), esto podría explicar que esta bacteria se encuentre en el intestino de los lobos marinos. Existen otros reportes del aislamiento de esta bacteria en heces de lobos marinos *Zalophus californianus* de Oregon- Estados Unidos (Coles et al., 1978).

8 Conclusiones

- En el árbol filogenético realizado a partir de las secuencias de MLST de *E. coli*, se observó agrupación de las *E. coli* aisladas de aguas residuales en un clado y de las *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla San Cristóbal e Isla Española en otro. Sin embargo, se encontraron dos cepas de *E. coli* que se agruparon en los clados contrarios. Este hallazgo puede sugerir colonización cruzada y como consecuencia la posibilidad de que ocurra transferencia horizontal de genes entre bacterias de origen humano y de lobo marino.
- Se encontró indicios de transferencia horizontal de genes debido a la presencia de similitudes en patrones de resistencia a antibióticos entre cepas de *E. coli* aisladas de lobos marinos de Isla San Cristóbal y de aguas residuales domésticas de Isla San Cristóbal. Sin embargo la investigación

debe ser profundizada analizando la secuencia de los genes que generan la resistencia antibiótica para observar si estos poseen el mismo origen.

- De las 19 cepas analizadas mediante MLST, se realizó 3 nuevos reportes de STs de *E. coli*, aisladas de lobos marinos y 16 que coinciden con genotipos (ST) previamente reportados en la base de datos de Warwick.
- La genotipificación por secuenciación de múltiples locus conservados (MLSTs) es un análisis rápido y económico para genotipificar aislados de *Escherichia coli*. En el caso particular de este estudio, se logró determinar la relación filogenética entre los aislados analizados.

9 Recomendaciones

- Se recomienda identificar y secuenciar los genes que confieren resistencias a antibióticos, de las *E. coli* que poseen patrones de resistencia a antibióticos compartidos, aisladas de lobos marinos y de aguas residuales. La comparación de estas secuencias corroborarían que se esté dando, efectivamente, un traspaso horizontal de genes entre las *E. coli* de lobos marinos y *E. coli* de humanos.
- El análisis de MLST para una mayor cantidad de cepas aisladas tanto de lobos marinos como de agua residual doméstica es necesaria para descartar el sesgo que se pueda producir en los resultados.
- Sería interesante ampliar el estudio a aislados *E. coli* de otros animales que viven en las Islas, como son las aves marinas, iguanas y tortugas terrestres. Esto permitirá determinar si existe evidencia de transferencia horizontal de genes desde bacterias de origen humano hacia otros animales de la fauna silvestre de las Islas Galápagos.
- Es indispensable concientizar que para la conservación de los ecosistemas de las Islas Galápagos se debe también tomar en cuenta el impacto que causa el ser humano con sus desechos orgánicos (heces y orina). Pues a pesar de no ser evidente, junto a estos desechos también son eliminadas

bacterias y residuos de medicamentos que pueden causar impacto en la salud de la fauna de las Islas.

10 Referencias

-
- Achtman M., Velayudhan V., Zhou Z. (2014). MLST Data bases at UOW, University of Warwick at: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>
- Alava J., Salazar S., Cruz M., Jimenez G., Villegas S., Paez D., Costa D., Ross P., Ikonomou M., Gobas F. (2011). DDT strikes back: Galapagos sea lions face increasing health risks, *Ambio* 40:425–430
- Albrich W., Monnet D., Harbarth S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerging Infect. Dis.* 10 (3): pp. 514-7.
- Amábile C., Chicurel C., Chicurel M. (1993). Horizontal Gene Transfer. *American Scientist*. Vol. 81. No. 4. July-August. pp. 332-341
- Baker C. (2009). Red Book: Atlas de enfermedades infecciosas en Pediatría. Primera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
- Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227-2238.
- Carrasco S., Burek K., Beckmen K., Oaks J., Davis M., Baker K., Mazet J. (2011). Aerobic oral and rectal bacteria of free-ranging Steller sea lion pups and juveniles (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. *J Wildl Dis.* Oct;47(4):807-20.
- Chain P., Carniel E., Larimer F., Lamerdin J., Stoutland P., Regala W., Georgescu A., Vergez L., Land M., Motin V., Brubaker R., Fowler J., et al. (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *PNAS*. September 21. Vol. 101. No. 38.

- Chen I., Dubnau D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2** (3): 241–9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS) .(2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. January. Vol. 27. No. 1. Wayne.
- Cohan F., Koeppel A., Krizanc D. (2006). Sequence-based discovery of ecological diversity within *Legionella*. *Legionella: State of the Art 30 Years after Its Recognition*. ASM Press. pp. 367–376. Washington DC.
- Cohan F., Perry E. (2007). A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*. vol. 17, pp. R373-R386.
- Cullimore R. (2000). *Practical Atlas for Bacterial Identification*, CRC Press.
- Drago, M. (2010). Dieta y dinámica poblacional del león marino del sur (*Otaria flavescens*) en Patagonia. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
- Dellinger J., Trillmich F. (1999). Fish prey of the sympatric Galápagos fur seals and sea lions: seasonal variation and niche separation. *Can. J. Zool.* **77**: 1204–1216.
- Eckburg P., Bernstein C., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S., Nelson K., and Relman D. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
- Fail E., Spratt S. (2014). eBURST V3, The Department of Infectious Disease Epidemiology Imperial College London disponible en: <http://eburst.mlst.net/>
- Feil E., Li B., Aanensen, D., Hanage W. and Spratt B. (2004). eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bact* **186**: 1518-1530.
- Farina, J., Salazar S., Wallem K., Witman J., Ellis J. (2003). Nutrient exchanges between marine and terrestrial ecosystems: the case of the Galapagos sea lion *Zalophus wollebaecki*. *Journal of Animal Ecology* **72**: 873-887.

- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Finegold S., Sutter V., Mathisen G. (1983). Human Intestinal Microflora in Health and Disease, ed. Hentges, D. J. Academic. New York. pp. 3-31.
- Francisco J., Cohan F., Krizanc D. (2012). Demarcation of Bacterial Ecotypes from DNA Sequence Data: A Comparative Analysis of Four Algorithms. Wesleyan University.
- Freter R. (1983) Human Intestinal Microflora in Health and Disease, ed. Hentges, D. J. Academic. New York. pp. 33-54.
- Gabashvili I., Khan S., Hayes S., Serwer P. (1997). Polymorphism of bacteriophage T7. *Journal of Molecular Biology*. **273** (3): 658.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felsenstein J. (2004). *Inferring phylogenies*. University of Washington. Seattle.
- Gordon D., Cowling A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects, *Microbiology*. 149, 3575–3586.
- Gulland F., Koski M., Lowenstine L., Morgan L., Spraker M., Calagross A. (1996). Leptospirosis in California Sea lions (*Zalophus californianus*) Stranded along the central Californian Coast. *Journal of Wildlife diseases*. 32(4) p. 572-580
- Harvell C., Kim K., Burkholder J., Colwell R., Epstein P., Grimes D., Hofmann E. Lipp E. (1999). Emerging Marine Diseases: Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science*. Vol. 285 3. September.
- Heath C. (2002). California, Galapagos, and Japanese sea lions *Zalophus californianus*, *Z. wolfebaeki*, and *Z. japonicus*. *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press. London. p 180–186

- Hendry A., Grant P., Rosemary Grant B., et al. (2006). Possible human impacts on adaptive radiation: beak size bimodality in Darwin's finches. *Proc Biol Sci* 273:1887-1894
- Higgins R. (2000). Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Can Vet J* 41:105-116
- Holmes R., Jobling M. (1996). *Baron's Medical Microbiology* . 4th edición. Univ of Texas Medical Branch.
- Hrenovic J., Tomislav I., (2009). Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. *EurAsia J BioSci* 3, 144-151
- International Nucleotide Sequence Database Collaboration, Nucleic Acids Research. (2013). *Jan;41(D1):D36-42* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Jasna H., Tomislav I. (2009). Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. *EurAsia J BioSci* 3, 144-151
- Jensen T., van de Bildt M., Dietz H., Andersen H., Hammer A., Kuiken T., Osterhaus A. (2002). Another Phocine Distemper Outbreak in Europe *Science*. New Series.Vol. 297. No. 5579 .Jul. 12, . p. 209
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Koskiniemi S., Sun S., Berg O., Andersson D. (2012). Selection-Driven Gene Loss in Bacteria. *PLoS Genet* 8(6). [Journal.pgen](http://www.plosone.org/journal/plosgenet).
- Lainhart W., Stolfa G., Koudelka G. (2009). Shiga toxin as a bacterial defense against a eukaryotic predator, *Tetrahymena thermophila*. *J Bacteriol* 191:5116-5122
- Lawrence, J. G. y H. Ochman. (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9413-9417.
- Lisle J., Smith J., Edwards D., et al. (2004). Occurrence of microbial indicators and *Clostridium perfringens* in wastewater, water column samples, sediments, drinking water, and

Weddell seal feces collected at McMurdo Station, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 70:7269-7276

- Madigan M., Martinko J. (2006). *Brock Biology of microorganisms*, 11th ed., Pearson Education.
- Mc Vey S., Kennedy M., Chengappa M. (2013). *Veterinary Microbiology*. Tirth edition. Wiley-Blackwell. Iowa
- Parque Nacional de Galápagos. (2013). Punta Suárez: Isla Española. Obtenido el 12 de octubre del 2014. Disponible en: http://www.galapagospark.org/sitio.php?page=punta_suarez.
- Paez-Rosas, D. (2008) Diversificación de dietas en tres colonias de lobos marinos *Zalophus wolfebaeki*, evaluada con análisis de excretas e isótopos estables de C y N. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. México.
- Pilson M., Kelly A. (1962) Composition of the Milk from *Zalophus californianus*, the California Sea Lion. *Science*. Jan 12;135(3498):104-5.
- Proaño C, Armas P, Trueba G. (en proceso de publicación) Lack of host specificity in gut colonization ability of human and chicken *Escherichia coli* isolates collected in a remote locality of Northwestern Ecuador.
- Rocha R., Lozano P., Martínez Y. (2006). *Mecanismos de patogenicidad e interacción Parásito- Hospedero II*. Editorial Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Primera edición. Puebla.
- Sandle G. (1998). Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal, *Gut* 1998 43: 294-299
- Smith W., Mazet J., Hirsh D. (2002). Salmonella in California wildlife species: prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. *J. Zoo and Wildl. Med.* 33:228-235.

- Stock I., Wiedemann B. (1999). Natural antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*, *Shigella*, *E. vulneris*, and *E. hermannii* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol 33. Issue 3.
- Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Texas Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York.
- Thomas C., Nielsen K. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:711-721
- Tirira D. (2007). *Mamíferos del Ecuador: Guía de campo*. Ediciones Murciélago Blanco. *Publicación Especial de los Mamíferos del Ecuador* 6. Quito.
- Tortora G., Funke B., Case C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Novena edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Yang J., Wang M., Cheng A., Pan K., Li C., Deng S. (2008). A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol*. May 14; 14(18): 2872-2876.
- Van Elsas J. , Semenov A. , Costa R., Trevors J. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the Environment: Fundamental and Public Health Aspects, *The ISME Journal*. 5, 173–183
- Verjan N. , Hirono I., Takashi A. (2005). Genetic Loci of Major Antigenic Protein Genes of *Edwardsiella tarda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 9th ser. 71, 5654-658.

- Waldor M., Mekalanos J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*. Vol. 272 no. 5270 pp. 1910-1914
- Weinberg E. (1959). Gradient Agar Plates. *The American Biology Teacher*. Vol. 21. No. 8 (Dec., 1959). pp. 347-350.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H., and Achtman M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol.Microbiol.* 60(5), 1136-1151.
- Wernegreen J., Moran N. (1999). Evidence for genetic drift in endosymbionts (Buchnera): analyses of protein-coding genes. *Mol Biol Evol* 16: 83–97.
- Wolska K. (2003). Horizontal DNA transfer between bacteria in the environment. *Acta Microbiol Pol.* 52(3):233-43.

11 Tablas

Tabla 1. Antibióticos utilizados para las pruebas de sensibilidad microbiana de las *E. coli* aisladas de lobos marinos y de agua residual; y medidas del diámetro del halo de inhibición para determinar resistencia antibiótica.

Antibiótico		Diámetro resistencia* (mm)
Ampicilina (AM)	10 µg	≤ 13
Amoxicilina (AMC)	20 µg	≤ 13
Cefotaxime (CTX)	30 µg	≤ 14
Cefalotin (CF)	30 µg	≤ 14
Cloranfenicol (C)	30 µg	≤ 12
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤ 15
Trimetoprim Sulfametoxazol (SXT)	5 µg	≤ 10
Gentamicina (GM)	10 µg	≤ 12
Estreptomina (S)	10 µg	≤ 11
Tetraciclina (TE)	30 µg	≤ 14
Sulfisoxazol (G)	250 µg	≤ 12
Enofloxacina (ENO)	5 µg	≤ 16

* Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

Tabla 2. Detalle de resistencias antibióticas y cálculo de X^2 para *E. coli* aislada de Lobos marinos y de agua residual doméstica de la Isla San Cristóbal

Antibiótico	Frecuencias de resistencia a antibióticos		
	<i>E. coli</i> AR SCY†	<i>E. coli</i> L SCY‡	Valores p para Test X^2 con corrección de Yates. ($\alpha=0.05$)
AM	15/69	11/159	0.0026**
AMC	0/69	4/159	0.44
CTX	1/69	1/159	0.872
CF	9/69	17/159	0.775
C	10/69	3/159	0.00054**
CIP	8/69	2/159	0.00164**
SXT	22/69	3/159	1.284e-10 **
GM	5/69	1/159	0.0156**
S	13/69	8/159	0.0022**
TE	27/69	8/159	1.994e-10 **
G	26/69	35/159	0.022**
ENO	12/69	1/159	0.0000026**

**Valor altamente significativo, * Valor significativo. AR SCY†: Agua residual doméstica de la Isla San Cristóbal. L SCY‡: Lobo marino de la Isla San Cristóbal. AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina, CTX: Cefotaxime, CF: Cefalotin, C: Cloroamfenicol, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, GM: Gentamicina, S: Estreptomina, TE: Tetraciclina, G: Sulfisoxazol, ENO: Enrofloxacin. Parámetro de resistencia obtenido de Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

Tabla 3. Detalle de resistencias antibióticas y cálculo de X^2 para las *E. coli* aisladas de lobos marinos de la Isla Española y de agua residual doméstica de la Isla San Cristóbal

Antibiótico	Frecuencias de resistencia a antibióticos		
	<i>E. coli</i> L SCY†	<i>E. coli</i> L E ‡	Valores p para Test X^2 con corrección de Yates. ($\alpha=0.05$)
AM	15/69	2/57	0.0065**
AMC	0/69	0/57	1
CTX	1/69	0/57	0.924
CF	9/69	10/57	0.651
C	10/69	0/57	0.0077**
CIP	8/69	0/57	0.022**
SXT	22/69	0/57	0.00000832**
GM	5/69	1/57	0.31
S	13/69	6/57	0.295
TE	27/69	1/57	0.000002**
G	26/69	8/57	0.006**
ENO	12/69	0/57	0.0027**

**Valor altamente significativo, * Valor significativo. AR SCY†: Agua residual doméstica de la Isla San Cristóbal. L E‡: Lobo marino de la Isla Española. AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina, CTX: Cefotaxime, CF: Cefalotin, C: Cloroamfenicol, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetroprim-Sulfametoxazol, GM: Gentamicina, S: Estreptomina, TE: Tetraciclina, G: Sulfisoxazol, ENO: Enrofloxacina.

Tabla 4. Detalle de resistencias antibióticas y cálculo de X^2 para las *E. coli* aisladas de lobos marinos de la Isla San Cristóbal y de lobos marinos de la Isla Española

AM (2/57), CF (10/57), GM (1/7), S (6/57), TE (1/57) y G (8/57)

Antibiótico	Frecuencias de resistencia a antibióticos		
	<i>E. coli</i> L SCY†	<i>E. coli</i> L E ‡	Valores p para Test X^2 con corrección de Yates. ($\alpha=0.05$)
AM	11/159	2/57	0.546
AMC	4/159	0/57	0.525
CTX	1/159	0/57	0.592
CF	17/159	10/57	0.268
C	3/159	0/57	0.7005
CIP	2/159	0/57	0.96
SXT	3/159	0/57	0.7034
GM	1/159	1/57	0.96
S	8/159	6/57	0.26
TE	8/159	1/57	0.5
G	35/159	8/57	0.271
ENO	1/159	0/57	0.59

**Valor altamente significativo, * Valor significativo. L SCY†: Lobos marinos de la Isla San Cristóbal. L E‡: Lobo marino de la Isla Española. AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina, CTX: Cefotaxime, CF: Cefalotin, C: Cloroamfenicol, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, GM: Gentamicina, S: Estreptomina, TE: Tetraciclina, G: Sulfisoxazol, ENO: Enrofloxacin.

Tabla 5. Mediciones de crecimiento de las cepas de *E. coli* (en cm) sobre el medio de cultivo de agar con gradiente de concentración de NaCl de 0% al 13% después de 18 horas de incubación.

Caja replica	Cepas de <i>E. coli</i> sembradas en cada caja				
	AR1*	AR2*	LSCY1†	LSCY2†	LE 1‡
A	3.2	4	4.5	3.3	1.7
B	3.1	4.1	4.4	3.3	1.6
C	3.2	4.1	4.3	3.2	1.5
D	3.1	4	4.2	3.2	1.5
E	3.2	4.1	4.5	3.4	2
F	3.2	4.1	4.5	3.4	1.8

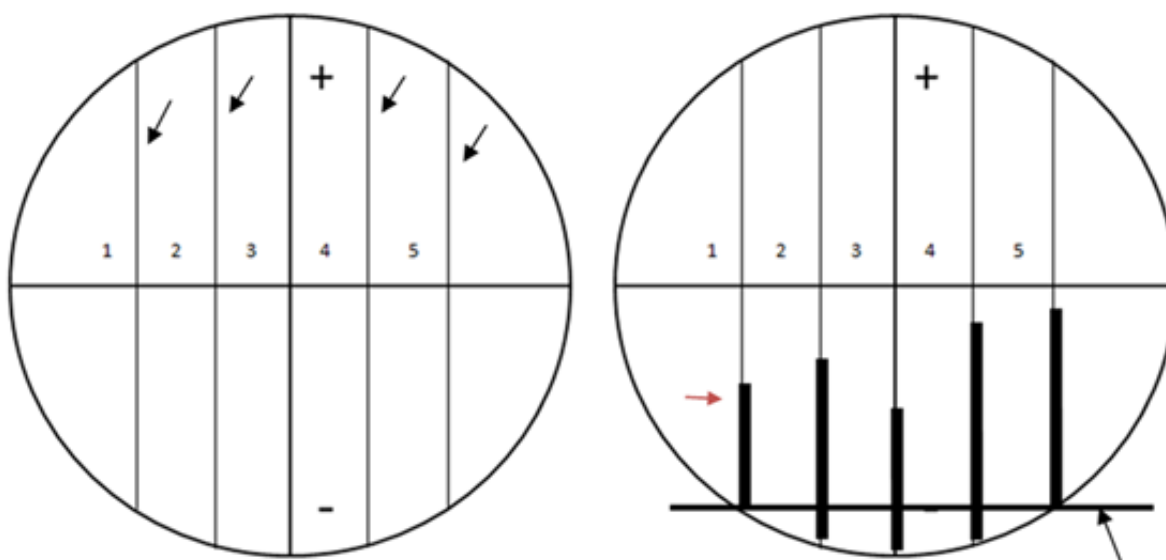
*AR: Cepas de *E. coli* aisladas de agua residual doméstica en la Isla San Cristóbal. † LSCY: Cepas de *E. coli* aisladas de heces de lobo marino de Isla San Cristóbal. ‡ LE: Cepas de *E. coli* aisladas de heces de lobo marino de la Isla Española.

Tabla 6. Número de identificación de ST y código de identificación de cada alelo de los genes de MLST de *E. coli*, asignados por la base de datos de MLST para las cepas de *E. coli* aisladas de heces lobos marinos y de agua residual.

Cepa‡	Alelos identificados*							ST†
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
Ec1 HSC	10	11	4	8	8	8	2	10
Ec2 HSC	10	11	135	8	8	8	2	744
Ec4 HSC	4	26	2	25	5	5	19	38
Ec6 HSC	53	40	47	13	36	28	29	131
Ec7 LSC	28	14	10	14	30	94	92	4218
Ec8 LE	9	65	5	1	9	13	6	162
Ec9 LE	53	303	47	13	23	25	109	1905
Ec10 LE	13	40	19	13	23	25	66	4219
Ec11 LE	76	24	49	36	16	37	25	4075
Ec12 LE	76	24	49	36	16	37	25	4075
Ec13 HSC	6	4	14	16	24	8	14	155
Ec14 HSC	4	26	2	25	5	5	19	38
Ec15 HSC	6	11	4	8	8	8	2	48
Ec16 HSC	10	11	4	8	8	8	2	10
Ec17 HSC	6	4	14	16	24	8	14	155
Ec19 LSC	53	303	4	13	23	25	109	4220
Ec24 LSC	53	303	47	13	23	25	109	1905
Ec25 LSC	53	303	47	13	23	25	109	1905
Ec26 LSC	53	303	47	13	23	25	109	1905

*A cada alelo de cada gen de MLST de *E. coli* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) se le asignó una identificación numérica de acuerdo con la base de datos de MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). †ST (Secuencia tipo) correspondiente a la combinación de los alelos de todos los genes de MLST para cada cepa. Los ST en naranja son primeros reportes. ‡Nomenclatura reportada en la base de datos de MLST, HSC: *E. coli* aisladas de agua residual de Isla San Cristóbal, LSC: *E. coli* aislada de heces de lobo marino de la Isla San Cristóbal, LE: *E. coli* aislada de heces de lobo marino de la Isla Española.

12 Figuras



Caja Petri marcada con un marcador permanente, dividiendo la caja en cuatro cuadrantes iguales y líneas paralelas a una de ellas (señaladas por las flechas), estas se encuentran numeradas según la cepa a sembrarse.

Caja rotulada presentando crecimiento bacteriano (señalado por la flecha roja). Se traza una línea de medida perpendicular al crecimiento bacteriano que vaya desde donde inicia el crecimiento de la primera y última cepa sembrada, esta línea se encuentra señalada por una flecha negra.

Figura 1. Representación de la metodología utilizada : A. Para marcaje de cajas con gradiente de concentración de sal y B. Medición de crecimiento bacteriano.

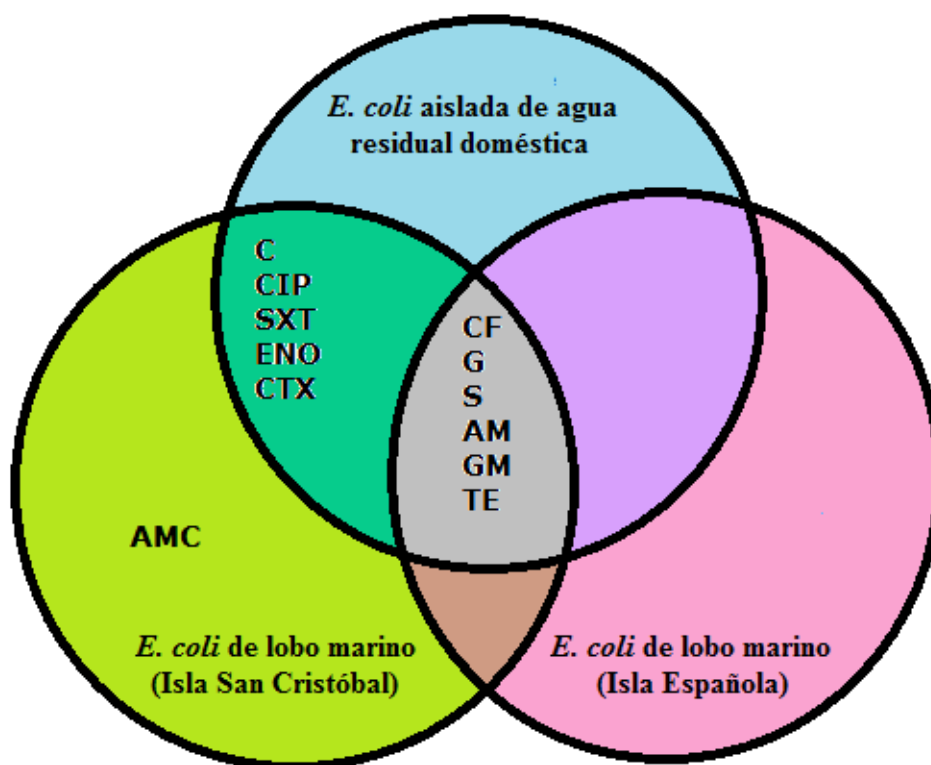


Figura 2. Representación de las resistencias antibióticas compartidas entre bacterias de los grupos muestreados.

*AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina, CTX: Cefotaxime, CF: Cefalotin, C: Cloranfenicol, CIP: Ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, GM: Gentamicina, S: Estreptomina, TE: Tetraciclina, G: Sulfisoxazol, ENO: Enrofloxacina.

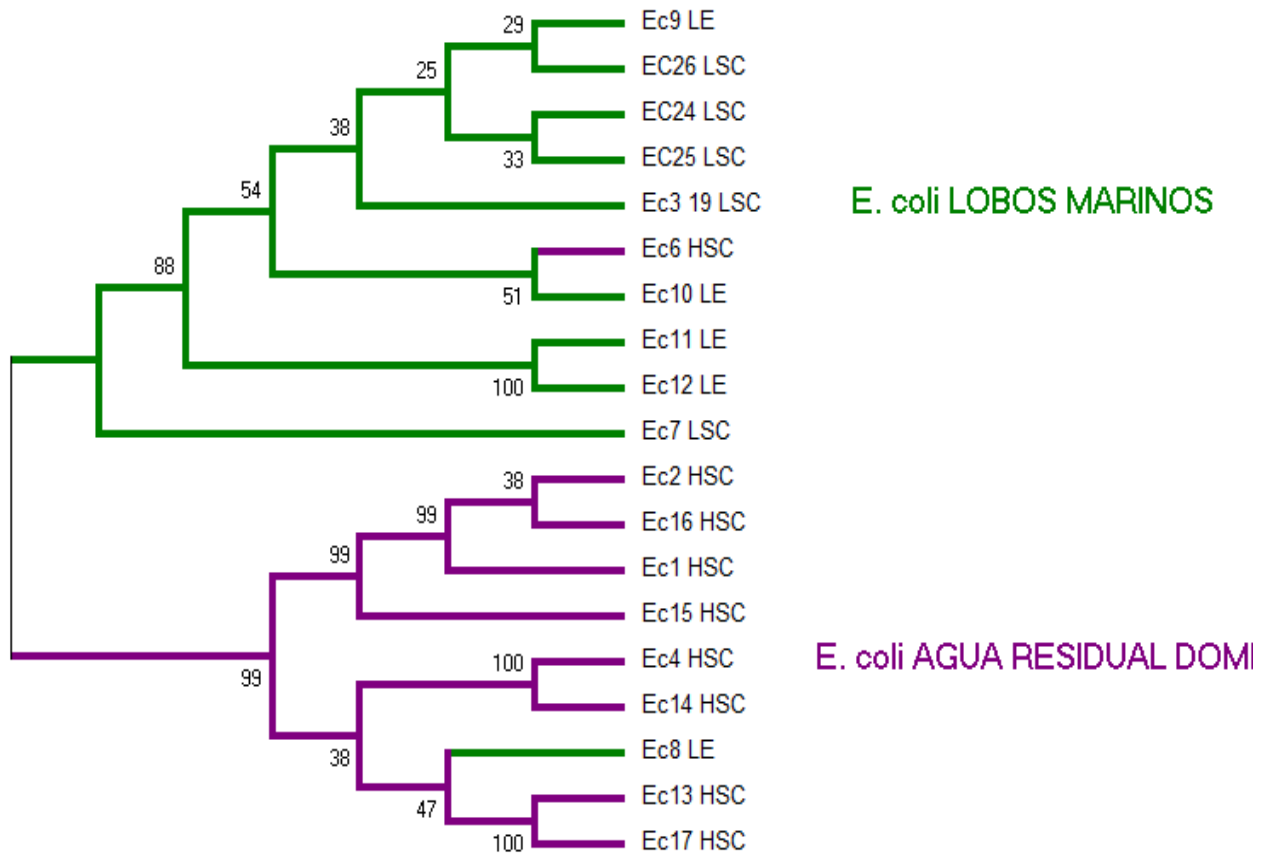


Figura 3. Árbol filogenético realizado en MEGA 5.1 (método Maximum likelihood) con secuencias de MLST de *E. coli* para bacterias aisladas de aguas residuales domésticas (HSC), de lobos marinos de la Isla San Cristóbal (LSC) y de la Isla Española (LE).



Figura 4. Análisis de eBURST con los ST de las cepas de *E. coli* usadas en el análisis de MLST.

*En letra morada se encuentran las cepas aisladas de agua residual doméstica, en verde se encuentran las cepas aisladas de heces de lobo marino, el detalle de las muestras se puede observar en la Tabla 6.

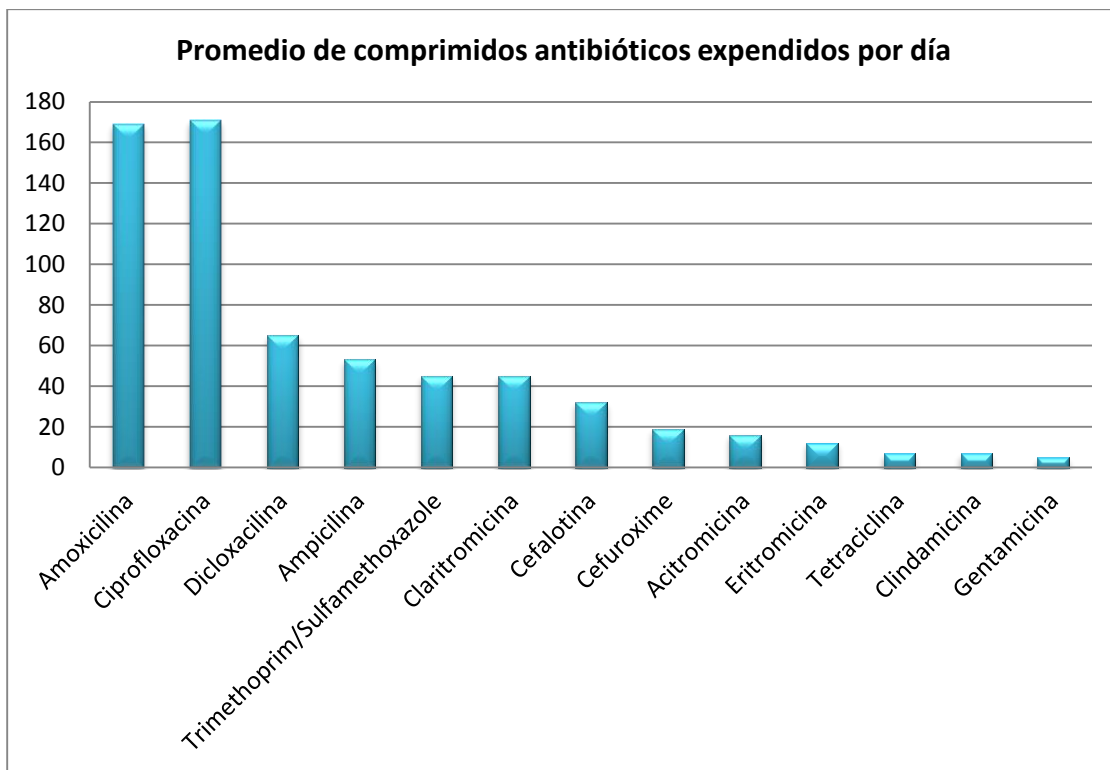


Figura 5. Antibióticos expendidos en la Isla San Cristóbal (Hospital Oscar Jandil, Farmacia “Sana Sana”, Farmacia “Cruz azul”, Farmacia “Su Farmacia” y Farmacia “San Cristóbal”) durante la semana del 1 al 5 de junio del 2013.

13 Anexos

Anexo 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de MLST de *E. coli*

Cebador	Secuencia
<i>mdh F</i>	5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3'
<i>mdh R</i>	5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-3'
<i>gyrB F</i>	5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3'
<i>gyrB R</i>	5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'
<i>adk F</i>	5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3'
<i>adk R</i>	5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'
<i>icd F</i>	5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3'
<i>icd R</i>	5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'
<i>recA F</i>	5'-CGCATTGCTTTACCCTGACC-3'
<i>recA R</i>	5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'
<i>purA F</i>	5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3'
<i>purA R</i>	5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'
<i>fumC F</i>	5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3'
<i>fumC RI</i>	5'-TCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3'

(Wirth et al., 2006)

Anexo 2. Fechas, lugares y horas de colección de muestras de heces.

Fecha	Lugar	Hora	Código*
21/01/13	Playa de los marinos†	5:30 am	C1
23/01/13	Playa de los marinos†	7:00 am	C1
25/01/13	Playa de los marinos†	6:00 am	C1
26/01/13	Bahía Garder, Punta Suárez‡	9:00 am	C1
1/02/13	Playa de los marinos†	6:00 am	C2
2/02/13	Playa de los marinos†	6:00 am	C2
10/02/13	Playa de los marinos†	6:00 am	C3
12/02/13	Playa de los marinos†	6:00 am	C3
15/02/13	Punta Carola†	6:00 am	C4
22/02/13	Playa de Oro†	5:30 am	C4.5
27/02/13	Bahía Garder, Punta Suárez‡	7:00 am	C2
1/03/13	Malecón†	6:00 am	C5
6/03/13	Playa de Oro†	6:00 am	C5.5
13/3/13	Malecón†	6:00 am	C6
18/3/13	Playa de Oro†	6:00 am	C6.5

† Punto de colecta en la Isla San Cristóbal. ‡ Punto de colecta en la Isla Española.

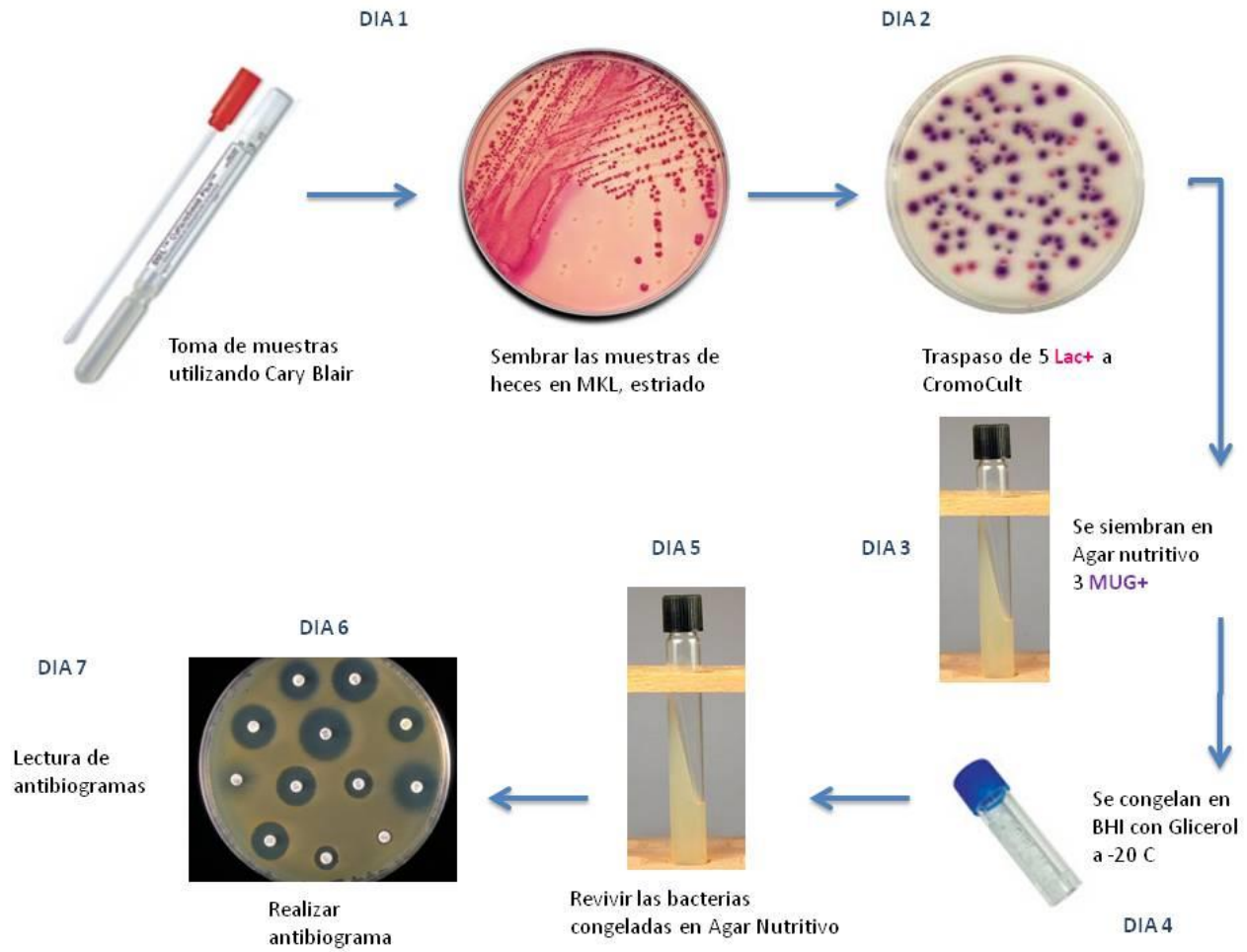
*Nomenclatura asignada para cada grupo de muestras, forma parte de la numeración de cada cepa.

Anexo 3. Fecha y lugar de colecta de agua residual en la Isla San Cristóbal

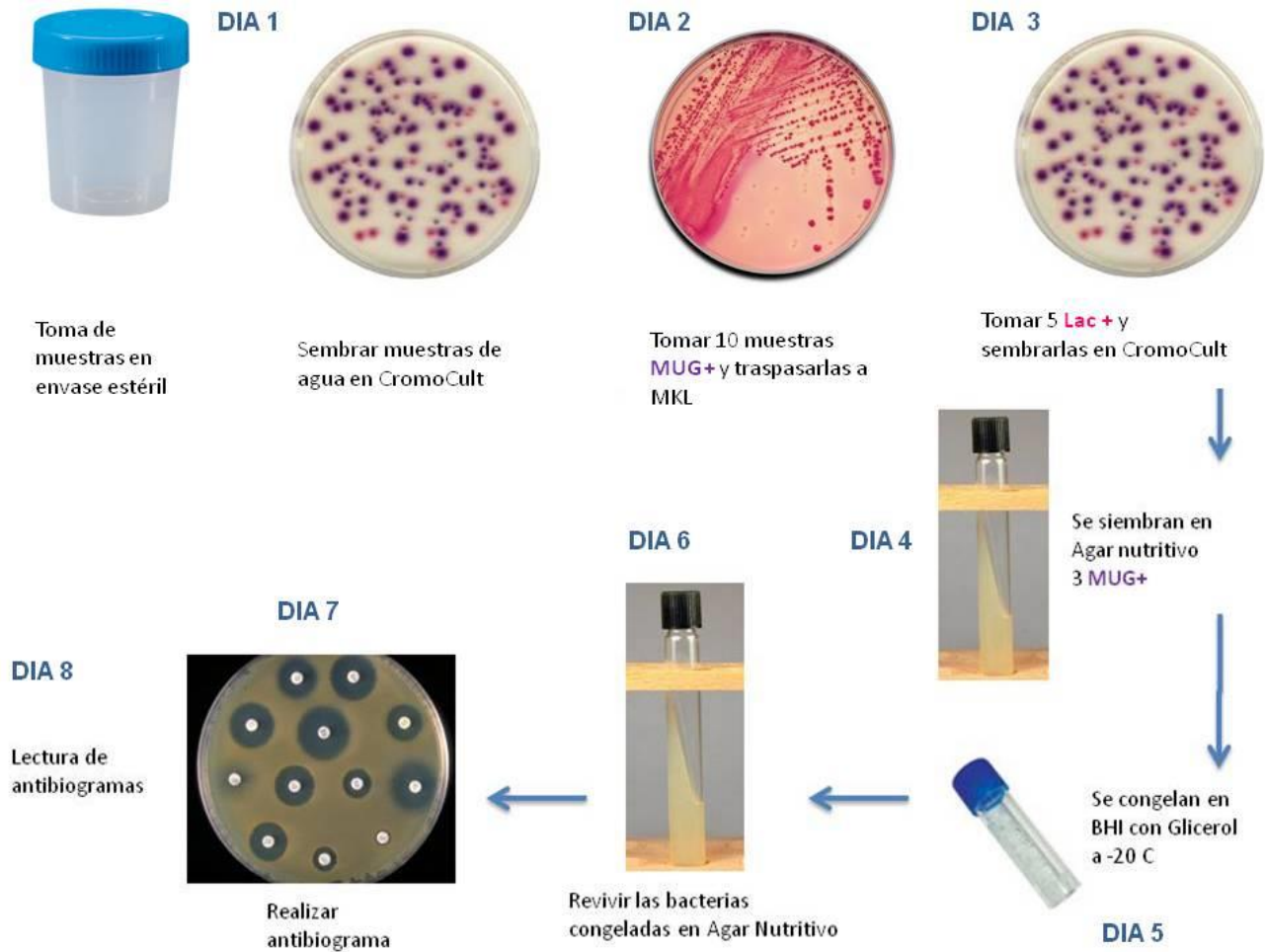
Fecha	Lugar	Código*
22/01/13	Bomba del Municipio	C0
28/01/13	Bomba del Municipio	C1
2/02/13	Bomba del Municipio	C2
10/02/13	Bomba del Municipio	C3
22/02/13	Bomba del Municipio	C4
6/03/13	Bomba del Municipio	C5
18/3/13	Bomba del Municipio	C6

*Nomenclatura asignada para cada grupo de muestras, forma parte de la numeración de cada cepa.

Anexo 4. Metodología seguida para el aislamiento de *E. coli* a partir de heces de lobo marino



Anexo 5. Metodología seguida para el aislamiento de *E. coli* a partir de agua residual.



Anexo 6. Concentraciones de reactivos utilizados para PCR- MLST de *E. coli*

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	vol. final Rx1
Agua			12.70 ul
Buffer	5 X	1 X	4.00 ul
MgCl ₂	25 mM	1.25 uM	1.00 ul
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.40 ul
Primer F	10 uM		0.40 ul
Primer R	10 uM		0.40 ul
Taq	5 U/ul	0.5 U	0.10 ul
ADN	50 ng		1.00 ul
Vol. Total		20 ul	20.00 ul

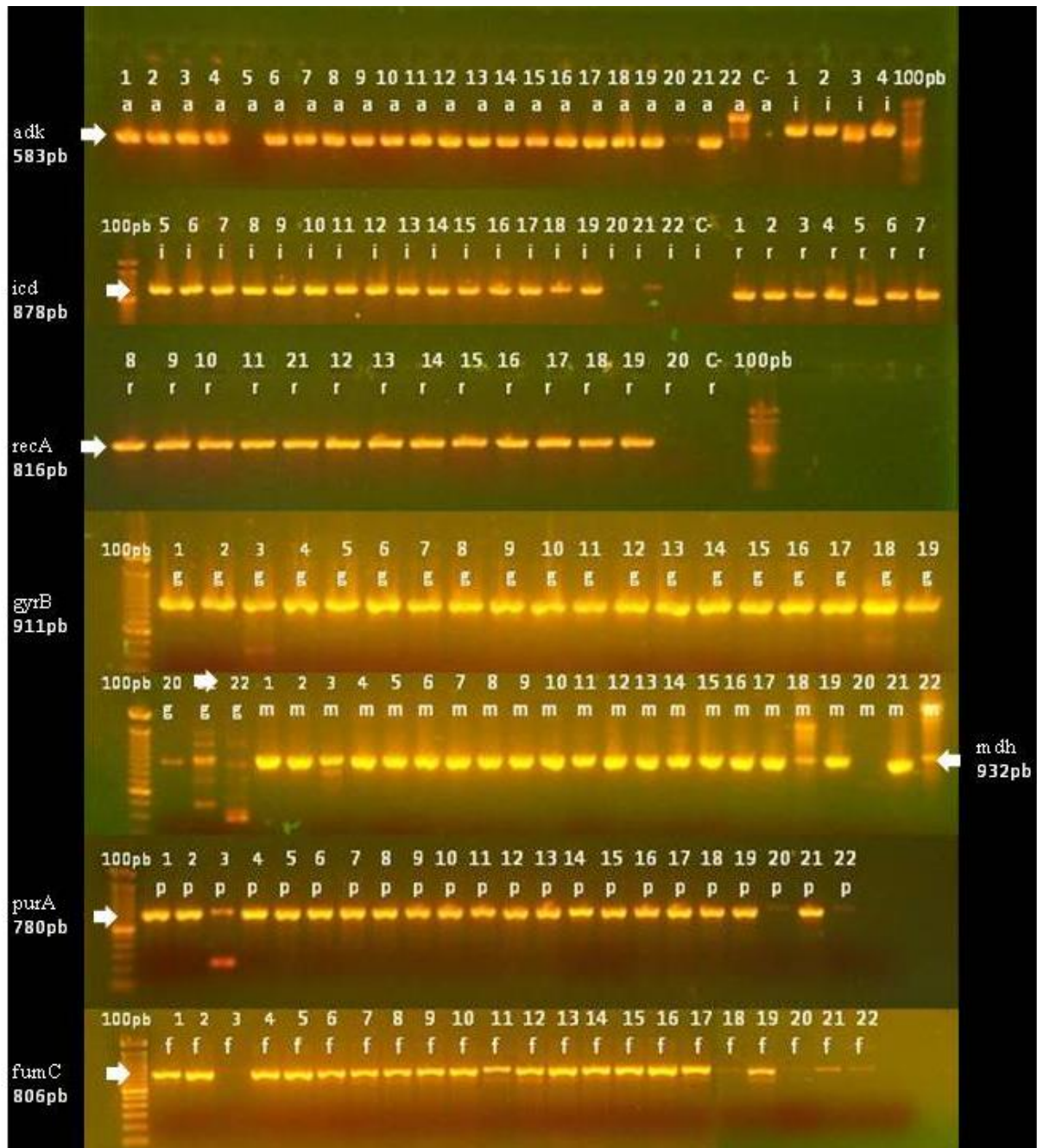
Anexo 7. Detalle de análisis bioquímico de las cepas aisladas de heces de lobo marino

Porcentaje de crecimiento y morfología en MKL						Morfología en Chromocult			INVIC					
27/02/2013	Lugar:	Española G- Bahía Gardner, PS- Punta Suárez				ID	Gram	I	C	U	S	TSI	O	
C2HEG 1 Diarrea														
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Bs transparentes	C2HEG 1.1	<i>Edwarsiella tarda</i>	Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A -		
C2HEG 2 Diarrea														
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Bs centro rosa pálido	C2HEG 2.1	<i>Muerta</i>	NC	Invic	bacilos G-				NC +		
C2HEG3 Diarrea														
Lac +	0.50%													
Lac -	95.50%	30%	Transparente B	C2HEG 3.2										
		70%	Puntiforme transparente	C2HEG 3.3	<i>Ox +, Bacilo G-</i>									
C2HEG4 Sólida														
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Transparente amarillas	C2HEG 4.1	<i>Edwarsiella tarda</i>	Invic	bacilos G-	+	-	-	-	A/A -		
C2HEG5 Sólida														
Lac +	1%	100%	Fuccias opacas	C2HEG 5.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						
				C2HEG 5.2	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						
Lac -	99%	100%	Transparentes Bs	C2HEG 5.3		Invic	bacilos G-					-		
C2HEG6 Semiblanda														
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Transparentes Bs	C2HEG 6.1	<i>Ox +, Bacilo G-, K/K</i>									
C2HEG7 Semiblanda														
Lac +	0%													
Lac -	100%	40%	Transparentes amarillas	C2HEG 7.1	<i>ASH</i>									
		60%	Transparentes Bs puntiformes	C2HEG 7.2	<i>ASH</i>									
C2HEG8 Semiblanda														
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Bs centro rosa pálido	C2HEG 8.1	<i>Ox +, Bacilo G-, K/K</i>			bacilo G -				K/K +		
				C2HEG 8.2	<i>Ox +, Bacilo G-, K/K</i>			bacilo G -				K/K +		
				C2HEG 8.3	<i>Ox +, Bacilo G-, K/K</i>			bacilo G -				K/K +		
C2HEG9 Blanda														
Lac +	0%													
Lac -	100%	90%	Transparentes Bs transparentes centro rosa	C2HEG 9.1	<i>Edwarsiella tarda</i>	Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A -		
				C2HEG 9.2	<i>Edwarsiella tarda</i>	Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A -		
				C2HEG 9.3	<i>Edwarsiella tarda</i>	Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A -		

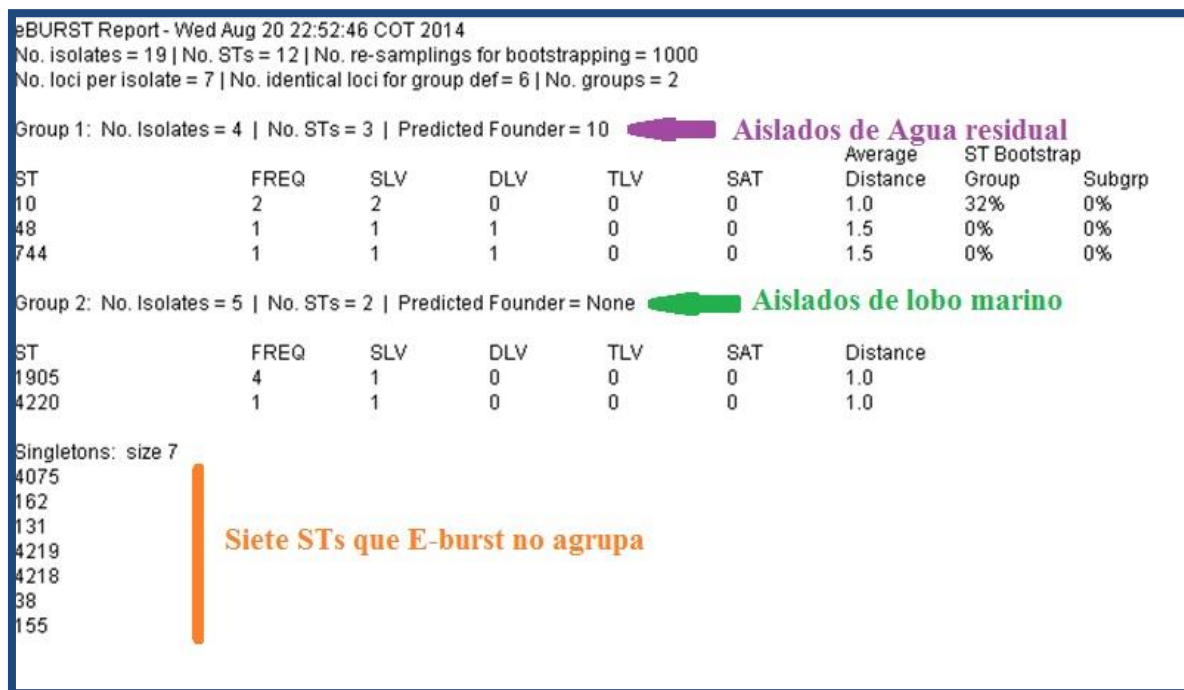
C2HEG10	Sólida													
Lac +	0%													
				C2HEG 10.1	<i>E. coli inactiva</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	-	K/A	-
		50%	Transparentes Bs	C2HEG 10.2	<i>E. coli inactiva</i>		Invic	bacilos G-	-	-	-	+	K/A	-
Lac -	100%	50%	Transparentes	C2HEG 10.3	<i>E. coli inactiva</i>		Invic	bacilos G-						-
C2HEG11	Blanda													
Lac +	0%													
		70%	Bs halo rosa pálido	C2HEG 11.1	<i>No se aislan</i>									
Lac -	100%	30%	Amarillas halo baboso	C2HEG 11.2	<i>No se aislan</i>									
C2HEPS1 2	Sólida													
				C2HEPS 12.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac +	30%	100%	Fuccia opaca	C2HEPS 12.3	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac -	70%	100%	Transparente amarillo	C2HEPS 12.2	<i>No se aislan</i>			bacilos G-						-
C2HEG13	Semiblanda													
				C2HEG 13.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
				C2HEG 13.3	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
				C2HEG 13.4	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac+	40%	100%	Fuccia opaca	C2HEG 13.5	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac -	60%	100%	B centro rosa	C2HEG 13.2	<i>Ox +, Bacilo G-, K/K</i>		Invic	bacilos G-						+
C2HEG14	Blanda													
				C2HEG 14.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
				C2HEG 14.2	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac +	40%	100%	Fuccia opaca	C2HEG 14.4	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac -	60%	100%	Transparente B	C2HEG 14.3	<i>Muerta</i>	NC		bacilos G-						+
C2HEG15	Blanda													
				C2HEG 15.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
				C2HEG 15.4	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac +	80%	100%	Fuccias brillantes	C2HEG 15.5	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
	20%	100%	Transparente B	C2HEG 15.3	<i>Muerta</i>	NC		bacilos G-						+
C2HEG16	Sólida													
				C2HEG 16.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
				C2HEG 16.2	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac +	100%	100%	Fuccia opaca	C2HEG 16.3	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
C2HEG17	Semiblanda													
Lac +	15%	100%	Fuccias brillantes halo blanco	C2HEG 17.1	<i>E. coli</i>	Morada	CC	bacilo G-						
		50%	Transparentes brillantes	C2HEG 17.2			Invic	bacilos G-	-	-	-	-	A/A	-
Lac -	85%	50%	Transparentes centro rosa pálido	C2HEG 17.3	<i>Sin identificación</i>		Invic	bacilos G-						-

Lac -	100%	100%	Redondas amarillas brillantes	C4.5 HO 1.1	<i>Edwardsiella tarda</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A	-
C4.5 HO2		Blanda												
Lac +	10%	80%	Fuccias halo blanco	C4.5 HO 2.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						
Lac -	90%	100%	Bs centro rosa pálido	C4.5 HO 2.3	<i>E. coli ?</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	-	K/A	-
C4.5 HO3		Blanda												
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Bs centro rosa pálido	C4.5 HO 3.1	<i>Enterobacter pyrinus</i>		Invic	bacilos G-	-	-	+	+	A/A	-
C4.5HO4		Blanda												
Lac +	0%													
Lac-	100%	100%	Bs centro rosa pálido	C4.5 HO 4.1	<i>Edwardsiella tarda</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	-	A/A	-
C4.5HO5		Sólida												
Lac +	0%													
Lac -	100%	100%	Bs centro rosa pálido	C4.5 HO 5.1	<i>Edwardsiella tarda</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A	-
C4.5HO6		Semiblanda												
Lac +		50%	Rosada opaca	C4.5 HO 6.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						
Lac +	1%	50%	Rosada halo blanco	C4.5 HO 6.2	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						
		98%	Bs centro rosa pálido	C4.5 HO 6.3	<i>Enterobacter pyrinus</i>		Invic	bacilos G-	-	-	+	-	K/A	-
Lac -	99%	1%	Bs	C4.5 HO 6.4	<i>Enterobacter pyrinus</i>		Invic	bacilos G-	+	+	+	-	K/K	+
01/03/2013		Lugar:	Malecón				ID	Gram	I	C	U	S	TSI	O
C5HMA 1		Blanda												
Lac +		80%	Fuccias brillantes	C5HMA 1.1	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
		20%	Salmón	C5HMA 1.3	<i>E. coli</i>	M	CC	bacilos G-						-
Lac -	50%	100%	Amarillas	C5HMA 1.4	<i>Ox +, Bacilo G-</i>									+
C5HMA 2		Sólida												
Lac +	0%													
		80%	Bs transparentes	C5HMA 2.1	<i>Edwardsiella tarda</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A	-
		10%	Bs	C5HMA 2.2	NC		Invic	NC						
Lac -	100%	10%	Bs centro rosa	C5HMA 2.3	<i>Edwardsiella tarda</i>		Invic	bacilos G-	+	-	-	+	K/A	-
C5HMA 3		Sólida												
Lac +	0%													
		95%	Amarillas	C5HMA 3.1	<i>Ox +, Bacilo G-</i>									+
Lac -	100%	5%	Bs centro rosa	C5HMA 3.2	NC		Invic	NC	-	-	-	+	K/A	-
C5HMA 4		Semiblanda												
Lac +	0%													
		35%	Amarilla halo difuso blanco	C5HMA 4.1	<i>Ox+, Bacilo G-, K/K</i>		Invic						K/A	+
Lac -	100%	35%	Bs	C5HMA 4.2	<i>Salmonella Grupo 1</i>		Invic							-

Anexo 8: Amplicones producto de la PCR de MLST de *E. coli* para las muestras seleccionadas.



Anexo 9: Análisis eBURST realizado con los ST identificados para cada cepa de *E. coli* secuenciada



* El detalle de las muestras se puede observar en la Tabla 6.