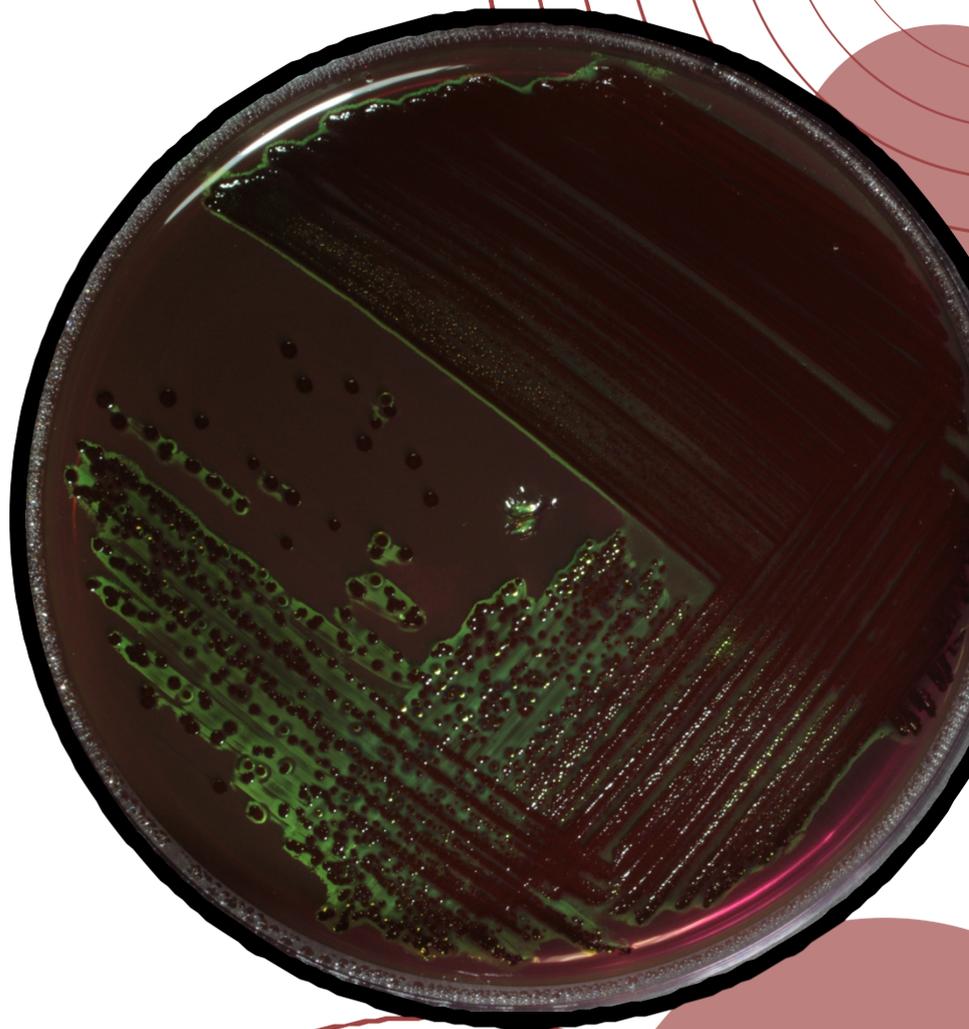


PRESENCIA Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE CEPAS DE COLIFORMES FECALES PROCEDENTES DE PROCESOS DE COMPOSTAJES INDUSTRIALES

Autora: Inés Fernández Luque
Director: José Joaquín Moreno Casco
Codirector: Juan Antonio López González
Departamento de Biología y Geología
Área: Microbiología
Titulación: Grado de Biotecnología
Facultad: Ciencias experimentales
Curso académico: 2018-2019



Índice

I. Introducción	pág. 1
1. Biotransformación mediante compostaje de residuos orgánicos	pág. 1
a) Fases del proceso de compostaje	pág. 2
b) Higienización en compostaje	pág. 4
2. Contaminación fecal en agricultura	pág. 6
a) Indicadores de contaminación fecal	pág. 6
b) Características y patologías asociadas a los coliformes fecales	pág. 7
3. Problemática actual de resistencia antibiótica	pág. 11
a) Mecanismos de resistencia	pág. 11
b) Agentes patógenos resistentes a los antibióticos	pág. 13
c) Prevención de resistencias	pág. 14
II. Objetivos	pág. 16
III. Materiales y Metodología	pág. 16
a) Compost del estudio	pág. 16
b) Medios de cultivo	pág. 18
c) Determinación de coliformes fecales	pág. 20
d) Obtención de la colección de coliformes fecales	pág. 21
e) Estudio de la resistencia antibiótica de los coliformes fecales aislados	pág. 21
f) Estudio estadístico	pág. 22
g) Diseño experimental	pág. 23
IV. Resultados y Discusión	pág. 24
a) Determinación de niveles de coliformes fecales en compost	pág. 24
b) Determinación de los niveles de coliformes fecales a lo largo del proceso de compostaje	pág. 28
c) Obtención de la colección de coliformes fecales	pág. 30
d) Estudio de la resistencia antibiótica de coliformes fecales	pág. 33
V. Conclusiones	pág. 44
VI. Bibliografía	pág. 45

Agradecimientos

Una vez finalizado mi trabajo fin de grado y tras todo el tiempo invertido para su realización en el laboratorio del área de Microbiología puedo decir lo agradecida que me siento de haber compartido esta experiencia tan bonita y enriquecedora con gente tan maravillosa en un ambiente tan acogedor.

A pesar de mi extremada timidez y lo que, debido a esta, me costó tomar la decisión, aposté por la idea que consideraba más afín a mí y con la que creía que me sentiría más identificada, y a día de hoy puedo confirmar que fue la mejor decisión que pude tomar y me siento muy orgullosa de ello.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Joaquín por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, y así darme esta gran oportunidad con la que he aprendido tanto, ya que sin él y la confianza puesta en mí no hubiese sido posible. Sin duda destaca su incansable dedicación, disposición y preocupación por ayudarnos siempre en todo lo que hemos necesitado. Ha sido un placer y una verdadera suerte encontrar un profesor tan cercano con quien emprender esta etapa.

En segundo lugar, me gustaría hacer una especial mención a Juan, mi tutor y compañero durante este proyecto. Estoy muy agradecida por su entrega y la ayuda que me ha brindado para sacar todo adelante y encontrar siempre una solución a todos los problemas que me han ido surgiendo. Como él siempre me ha dicho “somos un equipo” y me siento muy afortunada de haberlo podido sentir desde el minuto uno.

Por último, pero no por ello menos importante, les doy las gracias a mis padres y a mi hermana, no solo por esta última etapa, sino por haber estado ahí día tras día durante este difícil camino de cuatro años. No solo me ayudasteis a tomar la decisión de empezar esta aventura, sino que también confiasteis en mí desde el primer momento. Habéis sabido apoyarme, escucharme y aconsejarme incondicionalmente siempre, y creo que nunca podré agradecerlo lo suficiente.

De corazón, una vez más

Gracias.

Resumen

Los coliformes fecales son un grupo de bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que se caracterizan por ser indicadoras de contaminación fecal. Dentro de este grupo se diferencian cuatro géneros de bacterias conocidos como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* y algunas cepas de *Serratia*. El principal hábitat natural de estos microorganismos es el tracto gastrointestinal de animales y humanos. La presencia de un nivel de coliformes fecales superior al permitido en muestras de compost obtenidas de plantas de compostaje puede indicar la ineficiencia del proceso en cuanto a su higienización o la contaminación externa de las pilas de compostaje durante el proceso o una vez finalizado el mismo.

Este proyecto estuvo enfocado en la determinación de los niveles de coliformes fecales en 15 muestras de compost de plantas de compostaje industrial diferentes procedentes de cinco tipos distintos de materias primas que se correspondieron con residuos vegetales, residuos sólidos urbanos, lodos, residuos agroalimentarios y alpeorujo. El posterior aislamiento de los resultados positivos permitió la creación de un cepario de coliformes fecales, el cual fue sometido a pruebas de antibiograma, empleando 8 antibióticos diferentes con el fin de realizar una caracterización de la resistencia antibiótica de cada una de ellas. Los antibióticos empleados pertenecían a la familia de los beta-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos, y además los resultados obtenidos se compararon con la cepa control *Escherichia coli* sin resistencia adquirida.

Todos los compost analizados presentaron niveles significativos de coliformes fecales, pero tan solo uno presentó unos recuentos inadmisibles por la legislación actual. Además, se pudo detectar que, tras la higienización del proceso, existe una recontaminación de origen fecal de los composts industriales, como consecuencia de la acción de la fauna colindante. Adicionalmente, se obtuvieron un total de 55 cepas aisladas de las cuales 32 de ellas se correspondían con cepas de *Escherichia coli*. Finalmente, se pudo determinar que fueron el doripenem y la ciprofloxacina los antibióticos que generaron un mayor efecto de inhibición en el crecimiento bacteriano, detectándose además cepas resistentes a varios de los antibióticos comúnmente empleados para tratar infecciones de estos patógenos.

Abstract

The faecal coliforms are a group of Gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, they are characterised for being indicators of the faecal contamination. Within this group there are four different genera of bacteria known as *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* and some *Serratia* strains. The main natural habitat of these microorganisms is the gastrointestinal tract of animals and humans. The presence of faecal coliforms at a level higher than the allowed in compost samples resulting from composting plants can indicate the inefficiency of the process as for its higienization or the external contamination of the composting piles during the process or once it is finished.

This project was focused on the determination of the levels of faecal coliforms in 15 samples of compost from different industrial composting facilities coming from five types of raw materials that correspond to horticultural waste, solid urban waste, sewage sludge, agro-food waste and alpeorujo. The subsequent isolation of the positives results allowed the creation of a faecal coliforms collection, which was submitted to antibiogram tests by using 8 different types of antibiotics in order to perform a characterisation of the antibiotic resistance from each of them. The antibiotics used belonged to the family of the beta-lactam, quinolones, aminoglycosides, macrolides, besides the results obtained were compared with the *Escherichia coli* control strain without acquired resistance.

All the compost analysed showed significant levels of faecal coliforms, but just one of them showed counts that are inadmissible by the current legislation. Furthermore, it could be detected that, after the sanitation of the process, there was a faecal recontamination of the industrial compost as a consequence of the action of the adjacent fauna. Additionally, a total of 55 isolated strains were obtained of which 32 of them corresponded to *Escherichia coli* strains. Finally, it could be determined that the doripenem and the ciprofloxacin were the antibiotics that generated a greater effect of inhibition in the bacterial growth, besides the detection of strains resistant to some of the antibiotics commonly used to treat infections from this pathogens.

I. Introducción

El compostaje es un proceso biológico que tiene lugar en condiciones aerobias en el cual se transforman residuos orgánicos degradables en condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación en un producto estable e higienizado aplicable como abono orgánico o sustrato, conocido con el nombre de compost (Negro et al., 2000). Se trata de un proceso de biorremediación que combina una serie de fases encaminadas a la descomposición y estabilización de la materia orgánica mediante complejos procesos metabólicos originados por la actividad integrada de microorganismos, cuyo crecimiento y demás cambios químicos producidos dependen de las condiciones ambientales y la naturaleza del sustrato que se pretende compostar (Iglesias Jiménez et al., 2011). El compost obtenido tiene un alto contenido en materia orgánica y nutrientes, además de presentar un aspecto terroso, libre de olores y de patógenos. Este producto final generado a partir del compostaje, una vez higienizado y estabilizado, puede ser incorporado al suelo ya que ofrece el beneficio de mejorar su calidad, estructura, estabilidad y fertilidad (Wei & Liu, 2005). La calidad del compost depende de la naturaleza y el origen de los residuos de partida y del proceso de compostaje, y varía según el grado de madurez, la carga microbiana y las propiedades físicas y químicas.

El compostaje de residuos orgánicos requiere microorganismos (bacterias y hongos) capaces de degradar la materia orgánica hasta generar un producto humificado estable (Jurado et al., 2015). La acción de los diferentes microorganismos provoca el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, agua y calor. El sistema de aireación puede ser suministrado por volteo de la pila o por sistemas más complejos y tiene la finalidad de proporcionar oxígeno a los microorganismos, así como de regular el exceso de humedad por evaporación que, a su vez, mantendrá la temperatura adecuada (Negro et al., 2000).

Los beneficios que presenta el compostaje desde el punto de vista ecológico e industrial están basados en el reciclaje y eliminación de diferentes tipos de residuos, evitando así los problemas que conlleva su vertido, y en la obtención de un producto final que en muchas ocasiones puede ser empleado en la agricultura (Neher et al., 2013). En este segundo caso se pretende aumentar al máximo la similitud entre la materia orgánica de los residuos y el humus del suelo, eliminar los productos tóxicos que puedan existir en los residuos y aumentar la estabilidad biológica evitando de esta forma la descomposición rápida de los restos orgánicos sobre el suelo (Young et al., 2016).

1. Biotransformación mediante compostaje de residuos orgánicos

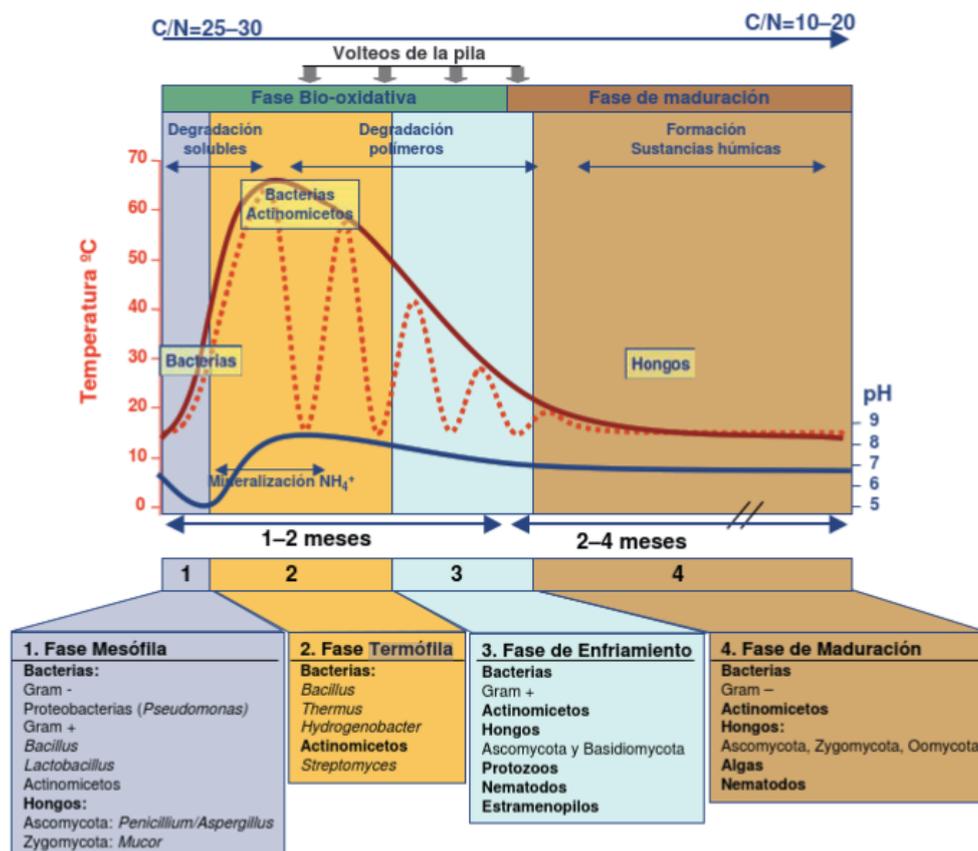
El proceso de compostaje constituye un ecosistema en el que diversas poblaciones microbianas formadas por bacterias, hongos y actinomicetos degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno. Al tratarse de un proceso biológico todos los factores que puedan afectar al desarrollo o crecimiento de esos microorganismos requieren un mayor control para asegurar el correcto funcionamiento del mismo y mejorar la eficiencia del proceso. Entre esos factores destacan la humedad, temperatura, pH, aireación, porosidad y relación carbono/nitrógeno (Petric et al., 2012).

Los microorganismos que se desarrollan durante el compostaje pueden afectar de forma positiva o negativa al proceso. Entre los microorganismos beneficiosos se encuentran los que biotransforman en condiciones aerobias la materia orgánica permitiendo la obtención de compost de calidad, los degradadores de contaminantes y los microorganismos con actividad antagónica de patógenos contribuyendo a la higienización del proceso (Sánchez San Fulgencio et al., 2018). Entre los microorganismos que afectan negativamente destacan los que provocan malos olores (principalmente bajo condiciones anaerobias) y los patógenos (Moreno & Mormeneo, 2011).

a) Fases del proceso de compostaje

La acción de microorganismos heterótrofos sobre sustratos orgánicos durante el compostaje produce energía que se disipa en forma de calor. Para que ese calor producido tenga cierto impacto sobre el proceso es necesario impedir su disipación. Una opción es disponer los sustratos de forma apilada ya que de esta forma al ser mayor la concentración de nutrientes la energía generada se disipa con mayor dificultad. Como consecuencia, parte del calor queda atrapado en el material y se produce un incremento de la temperatura que acelera las actividades metabólicas de los microorganismos provocando la producción de más calor. Debido a las variaciones de temperaturas y las reacciones metabólicas producidas durante el proceso se distinguen por lo general cuatro fases conocidas como fase mesófila, fase termófila, fase de enfriamiento o segunda fase mesófila y fase de maduración (Belyaeva et al., 2012). A su vez, el proceso puede dividirse en dos fases globales que son la fase bio-oxidativa y la fase de maduración (Figura I.1).

Figura I.1. Sucesión microbiana y ambiental durante el compostaje (Moreno & Mormeneo, 2011).



Durante la fase bio-oxidativa existe una alta disponibilidad de nutrientes que permiten el crecimiento continuado de microorganismos. Esta fase a su vez se divide en varias fases termófilas y mesófilas, las cuales se activan mediante volteos de la pila y en las que predominan reacciones biodegradativas (López-González et al., 2013). Finaliza cuando el calor generado disminuye como consecuencia del agotamiento de compuestos biodegradables, provocando a su vez la reducción de la actividad microbiana. Es en ese momento cuando comienza la fase de maduración, en la que predominan reacciones de condensación y polimerización a temperatura ambiente (Jurado et al., 2014). Variaciones en las condiciones ambientales (temperatura, pH, relación carbono-nitrógeno) durante el compostaje permiten la sucesión en el tiempo de diferentes poblaciones microbianas, la eliminación de patógenos y la modificación de las propiedades físico-químicas de los sustratos (Figura I.1).

- 1- La fase mesófila se caracteriza por un rápido aumento de la temperatura, variaciones en el pH y la degradación de los compuestos más simples. En un primer momento los sustratos se encuentran a temperatura ambiente pero la actividad de bacterias y hongos mesófilos capaces de degradar azúcares y aminoácidos provoca una disminución de pH debido a la producción de ácidos y un aumento de temperatura que oscila entre los 10 y 40 °C. La relación C/N tiene gran importancia ya que el carbono aporta la energía necesaria a los microorganismos y el nitrógeno es fundamental para que tenga lugar la síntesis de nuevas moléculas. Este hecho hace necesaria una relación de C/N en torno a 30, para evitar tanto la disminución de la actividad biológica como la pérdida en exceso de nitrógeno en forma de amoníaco el cual causa toxicidad. La actividad metabólica de estos microorganismos aumenta la temperatura hasta 42-45 °C provocando el descenso de mesófilos y el desarrollo de microbiota termorresistente (López-González et al., 2015).
- 2- Al comienzo de la etapa termófila el proceso se ralentiza hasta que existe un número considerable de microorganismos termorresistentes. Cuando los nutrientes son fácilmente asimilables y las temperaturas no superan los 50-60 °C predominan los actinomicetos termotolerantes y termófilos y diversas cepas de *Bacillus* spp. capaces de metabolizar proteínas provocando una alcalinización. También se produce la degradación de polímeros como celulosa y lignina que liberan moléculas simples que pueden ser empleadas por otros microorganismos. Conforme aumenta la temperatura se produce una disminución de la biodiversidad por la disminución de la actividad microbiana. A partir de temperaturas mayores a 60 °C la degradación de compuestos únicamente es producida por bacterias termófilas. El calor limita el suministro de oxígeno provocando una disminución de la actividad microbiana. Es en esta etapa cuando comienza la higienización intensa del residuo como consecuencia de las altas temperaturas que se alcanzan (Moreno et al., 2013).
- 3- En este periodo en el que la temperatura es elevada y los nutrientes y energía escasean cuando comienzan las etapas de enfriamiento y maduración. La actividad de microorganismos disminuye y con ello la temperatura, produciéndose el crecimiento de una nueva comunidad en la que predominan hongos y actinomicetos degradadores de compuestos complejos ((Hultman et al., 2010). Las bacterias mesófilas se encuentran en menor número, pero existe una alta diversidad que contribuye con diferentes actividades a la maduración del compost.

Entre ellas destaca la oxidación de hidrógeno, amonio, nitrito y sulfuros, la fijación de nitrógeno, producción de exopolisacáridos, entre otras.

- 4- Al final de la etapa de maduración la temperatura y la comunidad se acaba estabilizando. Los actinomicetos intervienen en la formación de ácidos húmicos y generalmente producen antibióticos que inhiben el crecimiento de patógenos. A su vez, macroorganismos como nematodos y lombrices se encargan de remover, excavar, moler y masticar el material obtenido incrementando el área superficial, la degradación y la estabilización de la materia orgánica. Finalmente se obtiene un producto humificado y estable, de color marrón oscuro o negro con aspecto similar al suelo en el que ya no ocurren mecanismos de descomposición microbiana o lo realizan de forma muy lenta (Curtis & Claassen, 2009).

b) Higienización en compostaje

Mediante el proceso de compostaje se transforman los residuos orgánicos degradables en un producto estable e higienizado, el cual puede ser aplicable como abono o sustrato. Sin embargo, muchos de los materiales empleados en este proceso pueden presentar como parte de su microbiota natural virus, bacterias y hongos patógenos. Por ejemplo, en el caso de los residuos orgánicos fecales es frecuente encontrar microorganismos patógenos como coliformes totales y fecales, clostridios sulfito reductores, enterococos, *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* (Reynnells, 2013).

Para garantizar la obtención de un producto final higienizado es necesaria la reducción de la supervivencia, crecimiento o eliminación de los patógenos presentes durante el proceso que se consigue gracias a una serie de complejas interacciones microbianas entre las que destacan:

1. La evolución de la temperatura a lo largo del proceso, siendo especialmente relevante las altas temperaturas desarrolladas durante la fase termófila.
2. La producción de compuestos antimicrobianos por parte de agentes presentes en la pila de compostaje.
3. La actividad lítica de enzimas microbianas (Sánchez San Fulgencio et al., 2018).
4. La producción de antibióticos por parte de antagonistas microbianos (Prasanna et al., 2009).
5. La presencia de diferentes microorganismos en el compost que compiten con los patógenos por los nutrientes, provocando un agotamiento de los mismos.
6. La pérdida natural de la viabilidad del patógeno con el transcurso del tiempo.

De entre todas estas alternativas destinadas a la eliminación de patógenos, la que adquiere mayor importancia es la relacionada con las altas temperaturas a lo largo del proceso. Para que un determinado compost tenga gran calidad es necesario que no presente patógenos humanos y vegetales con el fin de poder ser utilizado sin implicar riesgos medioambientales o sanitarios.

Ante elevadas temperaturas, los virus y hongos fitopatógenos son más resistentes que las bacterias fitopatógenas y a su vez los patógenos humanos y animales presentan ante estas condiciones una escasa viabilidad (**Tablas I.1 y I.2**). Por ello, para asegurar la eliminación de los

patógenos es necesario que durante el proceso de compostaje se alcancen altas temperaturas pero que además se prolonguen durante cierto tiempo. Uno de los tratamientos recomendados para garantizar la higienización es alcanzar una temperatura igual o superior a 55 °C durante al menos periodos de 15 días, (EPA, 2003) además de hacer que el compost pase por una etapa de maduración con un compostaje que se prolongue tres meses como mínimo (Sánchez Báscones et al., 2016).

Tabla I.1. Temperaturas mínimas necesarias para la eliminación de algunos de los microorganismos fitopatógenos más comunes en compost (Moreno & Mormeneo, 2011).

Grupo microbiano	Microorganismos	Temperatura (°C)
Hongos	<i>Phytophthora cinnamoni</i>	40-50
	<i>Phytophthora infestans</i>	55
	<i>Pythium irregulare</i>	40-50
	<i>Rhizoctonia solani</i>	40-60
	<i>Botrytis cinerea</i>	35-50
	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	54-70
	<i>Fusarium oxysporum</i>	40-65
	<i>Fusarium solani</i>	55
	<i>Botrytis allii</i>	60
	<i>Phomopsis sclerotioides</i>	60
	<i>Phytophthora cryptogea</i>	60
	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	55
	<i>Sclerotium cepivorum</i>	48-57
	<i>Stromatinia gladioli</i>	57
	<i>Verticillium spp.</i>	40-60
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	55-57	
Bacterias	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	35
	<i>Erwinia amylovora</i>	40
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	40-50
	<i>Pseudomonas savastanoi phaseolicola</i>	35
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	52
Virus	<i>Cucumber Green Mottle Mosaic Virus</i>	72
	<i>Melon Necrotic Spot Virus</i>	55
	<i>Pepper Mild Mottle Virus</i>	55-60
	<i>Tomato Mosaic Virus</i>	47-92
	<i>Tobacco Necrosis Virus</i>	50
	<i>Tobacco Rattle Virus</i>	68
	<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>	60
Nematodos y/o parásitos	<i>Globodera pullida</i>	35
	<i>Globodera rostochiensis</i>	33
	<i>Heterodera schochi</i>	52
	<i>Meloidogyne incognita</i>	52-57

Tabla I.2. Temperaturas y tiempo mínimo para la inactivación de algunos patógenos y parásitos humanos (Moreno & Mormeneo, 2011).

Grupo microbiano	Microorganismos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Bacteria	<i>Salmonella typhi</i>	30	55-60
	<i>Shigella</i>	20	60
	<i>Escherichia coli</i>	60	55
	<i>Brucella abortus</i>	3	61
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20	67
Nematodos y/o parásitos	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	68
	<i>Taenia saginata</i>	5	71
	<i>Trichinella</i>	60	62

2. Contaminación fecal en agricultura

a) Indicadores de contaminación fecal

El aumento del uso del agua y de la tierra para diferentes fines y el crecimiento de la población a nivel mundial han contribuido al incremento de los niveles de contaminación (Cabral, 2010). Este hecho hace indispensable la determinación del tipo de microorganismos presentes, así como su concentración para conocer la calidad del suelo y del agua, y por consiguiente para la toma de decisiones en relación al control.

Cada entorno se caracteriza por albergar determinadas asociaciones microbianas, entre las que se pueden incluir especies patógenas. Dichas especies patógenas no siempre resultan fácilmente detectables, por lo que en numerosas ocasiones se determina su presencia de forma indirecta a través de otras especies o grupos conocidos como bacterias indicadoras de contaminación fecal (Pianiatti et al., 2004). Estas bacterias se pueden emplear para valorar la calidad de alimentos, sedimentos, agua, actividades agrícolas e industriales y no existe un indicador universal por lo que se ha de seleccionar el más apropiado en función de la situación concreta de estudio.

Los microorganismos indicadores se caracterizan por tener un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración y reacción en los diferentes entornos, pero con la ventaja de que son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. La fuerza de la correlación determinará la efectividad y la precisión del indicador como medida de la aparición de patógenos (Larrea-Murrell et al., 2013).

Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe:

- No ser un patógeno, pero mantener una correlación con la presencia de patógenos.
- Presentar alta concentración para ser fácil de aislar, identificar y cuantificar.
- Pertenecer a la microbiota intestinal de individuos sanos.
- Encontrarse en el intestino cuando el patógeno también lo esté.

- Estar presente en las heces de animales homeotermos y ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de estos animales.
- Tener un tiempo de supervivencia y una resistencia ambiental igual o superior a la del patógeno.

Algunos de los procedimientos habitualmente empleados para determinar la presencia de contaminación fecal en compost están basados en la detección de *Salmonella*, la cuantificación de Coliformes Totales y Fecales, y la detección de Enterococos Fecales y Clostridios Sulfito-Reductores (Harrison, 2004; APHA, 2017ab).

En los últimos años ha crecido el interés de empleo este tipo de grupos microbianos, derivado de sucesos en ocasiones trágicos, como el brote de *E. coli* O104:H4 productor de verotoxinas en Alemania con 46 víctimas mortales (CEN, 2011), lo que ha derivado en la implantación de sistemas de detección mediante técnicas moleculares, independientes de cultivos, y ha abierto la puerta a la búsqueda de otros patógenos de actualidad como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y virus entéricos (Singh et al., 2010; Piao et al., 2012; McLellan & Eren, 2014).

b) Características y patologías asociadas a los coliformes fecales

Las bacterias coliformes fecales se clasifican taxonómicamente dentro del dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gamma Proteobacteria, orden Enterobacteriales y familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* constituyen un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram-negativas. Su nombre se debe a la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo a pesar de que se trate de microorganismos ubicuos que se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación, así como formando parte de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente.

Son organismos anaerobios facultativos no formadores de esporas. La falta de capacidad para formar esporas los hace más susceptibles a la destrucción por las condiciones ambientales adversas. Presentan forma de bastón de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Su envoltura celular se caracteriza por presentar una estructura multilaminar. La membrana interna está formada por una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas y presenta una alta concentración de proteínas en la capa externa de peptidoglucano. Por otro lado, la membrana externa también presenta otra doble capa de fosfolípidos constituida por lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas porinas y otras proteínas de membrana.

Son catalasa positivos y oxidasa negativos, capaces de reducir el nitrato a nitrito y de fermentar diferentes carbohidratos. La mayoría son móviles gracias a la presencia de estructuras proteicas especializadas para la locomoción denominadas flagelos y presentan fimbrias, orgánulos para poder adherirse a superficies mucosas y para la colonización bacteriana (Puerta-García y Materos-Rodríguez, 2010). Una de las características de las cepas patógenas de este grupo es la capacidad de producir toxinas como citotoxinas y enterotoxinas y de adquirir rápidamente

resistencia a los antibióticos. Dicha resistencia puede estar mediada por plásmidos o ser cromosómica (Fariñas & Martínez-Martínez 2013).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se pueden distinguir dos grandes grupos de microorganismos en función de si son capaces de fermentar o no la lactosa. En el primer grupo se incluyen cuatro géneros bien diferenciados por sus características conocidos como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, además de algunas cepas de *Serratia* (Tabla I.3). Los géneros incapaces de fermentar la lactosa son *Salmonella*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Morganella* y *Erwinia*.

El principal hábitat natural en el que se encuentran los coliformes es en el tracto intestinal humano y animal, aunque también es posible aislarlos de muestras medioambientales como tierra, polvo, aguas superficiales y vegetales. En el grupo coliforme destacan principalmente por su mayor significación sanitaria los coliformes fecales, definiéndose estos como aquellos organismos capaces de desarrollarse a una temperatura comprendida entre 44 y 46 °C (generalmente 44,5 o 45,5 °C) durante 48 horas llevando a cabo la fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas.

Tabla I.3. Características de los coliformes fecales fermentadores de lactosa.

Prueba	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>
Glucosa	+	+	+	+
Gas glucosa	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	dudoso
Indol	+	dudoso	-	-
Rojo metilo	+	-	-	+
Voges-Proskauer	-	+	+	-
Citrato	-	+	+	+
Urea	-	+	+/-	dudoso
Movilidad	+/-	-	+	+

Cada uno de los estos cuatro géneros producen infecciones o enfermedades diferentes en las personas:

- ***Enterobacter***

Gran parte de las cepas de *Enterobacter* son patógenas y causan infecciones oportunistas y nosocomiales como *E. aerogenes*, mientras que otras habitan en materia orgánica descomponiéndola o viven en el interior del ser humano. Además, algunas producen infecciones en el tracto urinario (*E. cloacae*) y en el tracto respiratorio (Tato-Rodríguez et al., 2016).

- ***Citrobacter***

Los miembros de este género se caracterizan por la capacidad de emplear el citrato como única fuente de carbono, de convertir el triptófano en indol, fermentar la lactosa y emplear

malonato. Las especies de *Citrobacter* son responsables de grupos esporádicos y epidémicos de sepsis neonatal, estando concretamente *C. koseri* asociada a los abscesos cerebrales. Otra serie de infecciones focalizadas en recién nacidos ocasionadas por ciertas especies incluyen infecciones óseas, pulmonares y del tracto urinario.

- ***Klebsiella***

El género *Klebsiella* está constituido por *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. granulomatis*, causantes de un amplio rango de infecciones. Las especies de este género son fijadoras de nitrógeno, ubicuas en la naturaleza, inmóviles, indol-negativas, pueden crecer en KCN y utilizar citrato como única fuente de carbono. *K. pneumoniae* forma parte de la microbiota habitual intestinal y cavidad oral. La mayoría de las infecciones de este microorganismo se adquieren en el hospital o en pacientes debilitados por enfermedades, aunque también puede provocar abscesos hepáticos en personas inmunocompetentes. Destacan infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia e infecciones de herida quirúrgica. En pacientes con enfermedades pulmonares *Klebsiella* provoca bronconeumonías o bronquitis, pudiendo causar además hemorragias en el pulmón, absceso pulmonar y empiema pleural. *Klebsiella oxytoca* se diferencia del resto de cepas de este género por su capacidad para producir indol a partir de triptófano. Es causante de infecciones en el tracto urinario, infecciones en el tracto digestivo, colitis, faringitis aguda y septicemia (Singh et al., 2016). *Klebsiella granulomatis* es el agente causal de la enfermedad de transmisión sexual conocida como granuloma inguinal, donovanosis o granuloma venéreo.

- ***Escherichia coli***

Es el microorganismo referencia de la microbiología. Las diferentes cepas pueden ser móviles o inmóviles y tienen la capacidad de fermentar la lactosa y producir indol a partir de triptófano. Las infecciones asociadas a este microorganismo son bastantes numerosas, destacando principalmente las infecciones entéricas y extraintestinales.

Infecciones entéricas

- ***Escherichia coli* enterotoxigena (ECET)**

Es agente causal de la diarrea del viajero, la cual en los casos más leves únicamente provoca diarreas acuosas, pero en casos más graves puede ocasionar fiebre, escalofríos y vómitos. Este tipo de infección suele darse en países subdesarrollados y afecta principalmente a niños menores de dos años. Produce una toxina termolábil de aproximadamente 89 kDa y una toxina termoestable de 4 kDa (Vila-Estapé & Zboromyrska, 2012). La infección por *E. coli enterotoxigena* puede producirse por el consumo de alimentos y agua contaminados y se confirma tras la detección de los genes que codifican las toxinas mediante PCR o sondas de ADN.

- *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP)

Clínicamente se caracteriza por ocasionar diarreas acuosas con fiebre y vómitos, principalmente en recién nacidos de los países subdesarrollados y en rara ocasión en adultos de países desarrollados. Este microorganismo produce la proteína intimina codificada por el gen *eae* y un factor de adherencia codificado por un plásmido (Jerse & Kaper, 1991). Ambas proteínas permiten que actúe sobre las células del intestino provocando lesiones en la mucosa, formación de colonias y la destrucción de microvellosidades. La infección puede ser provocada por el consumo de agua y productos cárnicos contaminados y su diagnóstico se confirma con la detección de los genes que codifican los factores de virulencia específicos mediante PCR o sondas de ADN.

- *Escherichia coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH)

Se trata de cepas encargadas de producir verotoxinas, las cuales muestran similitudes estructurales con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*. Son capaces de provocar diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico o la muerte. Su confirmación está basada en la detección de los genes que codifican estas toxinas. Una de estas cepas fue la responsable del brote de 2011 en Alemania, anteriormente citado (CEN, 2011).

- *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)

Generalmente la enfermedad se produce en niños de países subdesarrollados y en personas que visitan dichos lugares. Son cepas capaces de invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal y que se caracterizan por provocar un cuadro clínico basado en fiebre, y diarrea sanguinolenta. Su diagnóstico, al igual que con cepas enteropatogénicas, se confirma con la detección de los genes asociados a la virulencia mediante el empleo de sondas de ADN y PCR (Fratamico et al., 2016).

- *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)

Se unen a la mucosa intestinal provocando diarrea aguda y crónica en países subdesarrollados, diarrea acuosa en países desarrollados y diarrea persistente en individuos con SIDA. Para confirmar su presencia es necesario realizar ensayos en cultivos tisulares.

Infecciones extraintestinales

- Infecciones urinarias de *E.coli* uropatógena (ECUP)

Estas cepas generan fimbrias que se unen a los receptores de glucolípidos de la superficie de las células huésped y se encargan de producir la toxina citolítica hemolisina. Suele producirse ante la obstrucción del flujo urinario normal o la presencia de un cuerpo extraño (Puerta-García y Materos-Rodríguez, 2010).

- Infecciones respiratorias

Suelen ser infecciones oportunistas que ocurren en pacientes debilitados por graves enfermedades. Colonizan la vía respiratoria y gástrica produciendo bronconeumonía con empiema o bacteriemia, y en numerosas ocasiones llegan a producir la muerte del individuo.

- Infecciones del sistema nervioso central

Los neonatos tiene gran susceptibilidad a padecer meningitis bacteriana ocasionada por *E. coli*. Las cepas con cápsula K1, más resistentes a sueros y al proceso de fagocitosis, aumentan su colonización durante el periodo del embarazo. En el caso de personas adultas la meningitis se ve asociada a inmunodepresión, una edad superior a 60 años y manipulación quirúrgica previa.

- Otras enfermedades

Escherichia coli provoca la mayoría de las bacteriemias producidas por las bacterias Gram-negativas. En estos casos tiene lugar una reacción sistémica a la endotoxina o a los lipopolisacáridos que provocan el shock, la coagulación intravascular diseminada y el consumo de factores del complemento. Además, se han encontrado cepas en casos de tiroiditis supurada, abscesos intraabdominales, osteomielitis, peritonitis bacteriana espontánea, artritis séptica entre otras (Fernández et al., 2002; Peralta et al., 2006; Hamzaoui et al., 2009).

3. Problemática actual de resistencia a antibióticos

Actualmente las enfermedades infecciosas son unas de las principales causas de muerte en la población, a pesar de que su contribución ha ido disminuyendo desde el siglo XIX. La aplicación de los antibióticos en la práctica clínica a mediados del siglo XX supuso uno de los hechos más importantes para el control de este tipo de enfermedades y consiguió aumentar la esperanza de vida de la población. El empleo de antibióticos ha supuesto grandes progresos en campos relacionados con la medicina, como trasplantes e individuos inmunodeprimidos, donde las infecciones son bastantes frecuentes e importantes.

Sin embargo, desde hace relativamente poco tiempo, y coincidiendo con el uso inadecuado de los antibióticos, se ha producido una creciente ineficacia de estos fármacos promovido por la resistencia bacteriana. Este hecho se define como “la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras bacterias de la misma especie”. Además, cada vez es más habitual la asociación de diversos mecanismos de resistencia para la misma familia de antibióticos en una cepa determinada. Esto provoca que el perfil fenotípico sea más complicado de interpretar y el tratamiento más difícil de abordar (Alós, 2014).

a) Mecanismo de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural o adquirida. La resistencia natural es característica de cada familia, especie o grupo bacteriano, mientras que la resistencia adquirida aparece en algunas cepas de una especie y se obtiene mediante mutación o por medio de transferencia de material genético entre especies relacionadas o diferentes. Los genes de resistencia pueden codificarse en plásmidos o en el cromosoma.

La mayoría de los mecanismos de resistencia de las bacterias se clasifican en: 1-inactivación enzimática basada en modificaciones hidrolíticas, como en el caso de las betalactamasas y no hidrolíticas por medio de acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones; 2-modificaciones de los genes que codifican las proteínas de membrana; 3-alteraciones de la permeabilidad. En este último caso se pueden incluir alteraciones de las membranas bacterianas, alteraciones en la entrada del antibiótico que dependen de energía y aumento de la salida de antibióticos (Vignoli & Seija, 2008).

Existen cuatro grandes clases de antibióticos, para cada uno de las cuales, las bacterias presentan diferentes mecanismos de resistencia para hacerles frente:

- Mecanismo de resistencia a beta-lactámicos:

Es una de las familias de antibióticos bactericidas más numerosa que incluye a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Se caracterizan por presentar en su estructura molecular un anillo beta-lactámico, considerado una estructura lactámica que contiene un anillo heterocíclico formado por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno.

A pesar de que la resistencia a beta-lactámicos puede desempeñarse por distintos mecanismos como producción de enzimas, alteración de la diana y permeabilidad o expresión de bombas de expulsión activa, el principal mecanismo de resistencia a los beta-lactámicos en las enterobacterias es el enzimático, mediante la producción de enzimas concretas denominadas betalactamasas. Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, pudiendo ser su producción constitutiva o inducible (Navarro et al. 2010). Actualmente se han descrito aproximadamente 200 betalactamasas diferentes, de entre las cuales algunas actúan sobre un único antibiótico o tiene un amplio espectro ya que son capaces de inactivar a la mayoría de los antibióticos de esta familia. Las betalactamasas de amplio espectro presentan en ocasiones un problema ya que al estar codificadas en plásmidos pueden transferirse de unos organismos a otros.

- Mecanismos de resistencia a quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro que son capaces de actuar sobre Gram-positivos, Gram-negativos, organismos anaerobios y micobacterias. Se han descrito mecanismos de resistencia a quinolonas cromosómicos y mediados por plásmidos.

La actividad antimicrobiana de las quinolonas se basa en la inhibición de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, mientras que el principal mecanismo de resistencia del microorganismo se desarrolla gracias a mutaciones que ocurren en los genes que sintetizan a estas dos enzimas. Estas mutaciones confieren una baja resistencia y afectan a las porinas o lipopolisacáridos, impidiendo la entrada del antibiótico al interior de la bacteria o promueven la presencia de bombas de expulsión encargadas de retirar el antimicrobiano hacia el exterior. La resistencia plasmídica mejor estudiada es la mediada por los genes *qnr*, encargados de codificar proteínas protectoras de la ADN girasa o la topoisomerasa IV.

- Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

Existen acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas capaces de inactivar a este tipo de antibióticos. Actúan sobre diferentes perfiles de aminoglucósidos y algunos microorganismos pueden presentar varias de ellas. Estas enzimas pueden ser cromosómicas o plasmídicas y se expresan constitutivamente. En este caso la resistencia a cada aminoglucósido se produce cuando el antibiótico se transporta hacia el interior celular y depende de la captación intracelular y de la afinidad de la enzima por el antibiótico (Vignoli & Seija, 2008).

- Mecanismos de resistencia a macrólidos

Son antibióticos caracterizados por la presencia de un anillo lactónico macrocíclico de 14 átomos (eritromicina, claritromicina, oleandomicina, roxitromicina), de 15 átomos (azitromicina) o de 16 átomos (espiramicina, josamicina). Estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, produciendo además el bloqueo de la translocación.

Principalmente son antibióticos bacteriostáticos, aunque en función de una serie de factores como la especie bacteriana, el tamaño del inóculo, fase de crecimiento y la concentración del propio antibiótico puede llegar a tener efectos bactericidas (Sevilla-Sánchez et al. 2010). La resistencia a este tipo de antibióticos se puede conseguir mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico en la proteína ribosómica L15 o con la metilación del ARNr 23s de la subunidad mayor para disminuir la afinidad del receptor con el antimicrobiano (Vignoli & Seija, 2008).

b) Agentes patógenos resistentes a los antibióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2017 elaboró una lista con los principales patógenos resistentes a antibióticos que suponían un peligro para la salud humana (OMS, 2017). La finalidad era animar a los gobiernos para que promoviesen políticas que estimularan la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos a través de organismos financiados con fondos públicos o el sector privado para combatir el problema mundial de la resistencia a antimicrobianos. En ella se incluyen a las doce familias de bacterias más peligrosas, entre las que destacan las bacterias Gram-negativas debido a su capacidad innata para resistir a varios antibióticos y la posibilidad de transmitir material genético a otras bacterias convirtiéndolas en fármaco-resistentes (**Tabla I.4**).

Los criterios para la selección de estos patógenos fueron: “el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse; cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan”.

La OMS clasifica a esos microorganismos en las categorías de prioridad crítica, alta o media según la urgencia con la que se necesita un antibiótico para hacerles frente (**Tabla I.4.**). La primera categoría incluye bacterias multirresistentes capaces de provocar graves infecciones y en numerosas ocasiones la muerte. En cambio, la categoría de prioridad alta y media contiene bacterias causantes de enfermedades comunes y que están adquiriendo resistencias crecientes.

Tabla I.4. Principales patógenos peligrosos para la salud por su resistencia a antibióticos (OMS, 2017).

	Microorganismo	Resistencia
PRIORIDAD CRÍTICA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	carbapenémicos
	Enterobacteriaceae	carbapenémicos
PRIORIDAD ELEVADA	<i>Enterococcus faecium</i>	vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	meticilina, vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp.	fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	cefalosporinas, fluoroquinolonas
PRIODIDAD MEDIA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	fluoroquinolonas

A pesar de que aumentar la I+D contribuirá a la creación de nuevos fármacos que reduzcan las muertes debidas a determinadas infecciones resistentes, esta única medida no es suficiente para solucionar este problema. Además de ello es fundamental promover una mejor prevención de las infecciones y un uso adecuado de los antibióticos ya existentes, así como de los que se desarrollen en un futuro.

c) Prevención de resistencias

Las bacterias que sobreviven ante diferentes cambios son aquellas capaces de adaptarse a ellos gracias a su plasticidad genética y su rápida replicación. El avance de la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias es inevitable y a pesar de que haya producido una crisis global difícil de controlar, es posible atrasar este progreso.

El uso inapropiado de los antibióticos en la medicina humana, veterinaria y la agricultura es uno de los principales motivos que contribuye a la extensión de la resistencia. Este problema podría disminuirse con un menor y más adecuado uso de los mismos, siendo lo ideal el empleo de tratamientos cortos con dosis que consigan eliminar en un primer momento gran parte de la carga bacteriana. Los programas de optimización del uso de antibióticos (PROA) buscan optimizar los tratamientos antimicrobianos con el fin de conseguir los objetivos clínicos, pero minimizando los efectos indeseados. La eficacia de las medidas actuales para controlar la extensión de las resistencias a antibióticos es inversamente proporcional a la densidad de bacterias resistentes en un ambiente dado, por lo que, sin la presencia de nuevos antibióticos es necesario reforzar las estrategias encargadas del control de la transmisión, así como la optimización de su uso y la búsqueda de nuevos tratamientos (Alós, 2014).

Ante esta situación es necesario actuar con iniciativas promovidas por jefes de Estado, instituciones mundiales junto con la acción coordinada de los sectores sanitarios y agrícolas, la industria alimentaria, grupos activistas y organizaciones comunitarias. En mayo de 2015 la Asamblea Mundial de la Salud aprobó un plan de acción mundial para hacer frente a la resistencia de los antibióticos (OMS, 2015). La finalidad era garantizar la prevención de enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad, asegurando su uso de manera responsable y siendo accesibles para todos aquellos que los necesiten. Este plan estableció cinco objetivos estratégicos:

1. Mejorar la conciencia y la comprensión de la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y capacitación efectivas.
2. Fortalecer la base de conocimiento y evidencia a través de la vigilancia y la investigación.
3. Reducir la incidencia de infecciones a través de medidas efectivas de saneamiento, higiene y prevención de infecciones.
4. Optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
5. Desarrollar el caso económico para una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, e incrementar la inversión en nuevos medicamentos, herramientas de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

Entre las medidas de prevención de infecciones que pueden disminuir la propagación de microorganismos resistentes a los medicamentos antimicrobianos y reducir su uso indebido destacan la inocuidad de alimentos y agua, la vacunación y el lavado de manos principalmente en personal sanitario para evitar infecciones nosocomiales. Prevenir enfermedades infecciosas que se tratarían con antibióticos e infecciones virales que en muchas ocasiones se trata de forma errónea con medicamentos antimicrobianos contribuiría a la administración de estos medicamentos de forma más responsable (OMS, 2018).

Por otro lado, el uso de antibióticos en piensos para animales para prevenir infecciones y como promotores de crecimiento en ocasiones afecta al número de bacterias resistentes y de genes de resistencia en el medio ambiente. Las prácticas sostenibles de cría de animales pueden reducir el riesgo de propagación de bacterias resistentes a través de la cadena alimentaria a los seres humanos.

Otra de las alternativas es buscar otro tipo de tratamiento terapéuticos o productos que sean capaces de complementarlos. Algunas de esas alternativas son: endolisinas de bacteriófagos capaces de hidrolizar la pared de Gram-positivos y Gram-negativos, anticuerpos monoclonales, inmunoestimulantes, terapias antivirulencia, probióticos, entre otros. Todo esto forma parte de la solución para retrasar el avance de las resistencias, pero aun así la medida más importante es el desarrollo y estimulación de la investigación y la industria farmacéutica con el fin de encontrar nuevos antibióticos con nuevos mecanismos de acción capaces de actuar contra agentes multirresistentes (Alós, 2014).

II. Objetivos

El desarrollo de este trabajo está integrado en el proyecto ALG2015-64512-R financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad que desarrolla el grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería. Concretamente, esta parte del proyecto está encaminada a la determinación de la presencia de coliformes fecales en diferentes compost obtenidos de plantas de compostaje industrial y el posterior estudio de la resistencia antibiótica de las cepas aisladas con el fin de comprobar la calidad del compost y obtener un cepario de coliformes fecales caracterizado en su resistencia antibiótica. Por tanto, el objetivo principal del trabajo fue estudiar la presencia y la resistencia antibiótica de cepas de coliformes fecales presentes en compostajes industriales. Para conseguir cumplir el principal objetivo del proyecto, se plantearon una serie de objetivos específicos:

- 1- Detección de coliformes fecales presentes en compostaje industrial de diferentes restos orgánicos.
- 2- Aislamiento de las cepas de coliformes fecales presentes en los materiales compostados en diversas plantas de compostaje industrial.
- 3- Estudio de resistencia microbiana a diversos antibióticos en las cepas de coliformes fecales aisladas de compostaje industrial.

III. Material y métodos

A) Compost de estudio

Para la realización de los análisis se han utilizado muestras de 15 plantas de compostaje industrial. Las muestras se engloban en cinco tipos de materias primas diferentes que son: residuos vegetales (RV), residuos sólidos urbanos (RSU), lodos (L), residuos agroalimentarios (RAA) y alpeorajo (ALP), cada una de las cuales presentan sus propias características y son empleados para distintos fines (**Tabla III.1**).

Los residuos verdes o vegetales (RV) son residuos de origen vegetal entre los que se incluye césped, hojas, plantas y recortes de árboles que pueden proceder de actividades como la agricultura, la jardinería, la poda de parques o jardines urbanos, limpieza de bosques, etc. Los residuos sólidos urbanos (RSU) se consideran aquellos residuos generados en los domicilios particulares, comercios,

oficinas y servicios, así como todos aquellos que no tengan la calificación de peligrosos y que por su naturaleza o composición puedan asimilarse a los producidos en los anteriores lugares o actividades. Los lodos de depuradora (LD) son residuos urbanos que se originan en la depuración de las aguas residuales. Los residuos agroalimentarios (RAA) son productos agrícolas que se destinan al consumo humano o animal tras su transformación por parte de la industria agroalimentaria. Por último, durante el proceso de extracción de aceite de oliva en las almazaras se genera aceite, orujo graso y un residuo líquido denominado alpechín. El alperujo (ALP) está compuesto por la mayor parte de los residuos sólidos que se encuentran en la aceituna como la piel, pulpa, hueso y una pequeña porción de aceite y del agua de lavado.

Tabla III.1. Información de cada uno de los procesos de compostaje industrial evaluados.

Código planta	Material	Mezcla para compostaje	Método de compostaje	Fase biooxidativa	Fase de maduración
RV1	Residuo vegetal	Residuos vegetales hortícolas de invernadero triturados (tallos y hojas de pepino y calabacín).	Pilas volteadas, volteo a demanda-espacio.	3 meses	1 mes
RV2	Residuo vegetal	Residuos vegetales hortícolas de invernadero no triturados (tallos y hojas de pepino y calabacín).	Pilas volteadas, volteo a demanda-espacio. No trituran, mezclan con restos de poda de jardín con mucha palmera.	3 meses	1 mes
RV3	Residuo vegetal	Residuos vegetales hortícolas de invernadero no triturados (tallos y hojas de pimiento).	Pilas volteadas, volteo a demanda-espacio.	1 mes	2 meses
RSU1	Residuos sólidos urbanos	RSU recogida no separada.	Pilas volteadas, volteo a demanda-espacio y semanal.	1,5 meses	2 meses
RSU2	Residuos sólidos urbanos	RSU recogida no separada.	Pilas volteadas, volteo a demanda-espacio y semanal.	2,5 meses	2 meses
RSU3	Residuos sólidos urbanos	RSU recogida no separada.	Pilas túnel hileras-reactor, nave cubierta, tornillo sin fin automático, volteo continuo (volteo 18-25d)	1 mes	2 meses
LD1	Lodo de depuradora	LD + restos de poda (paja) (1:1 v/v).	Pilas volteadas, volteo semanal.	2,5 meses	1 meses
LD2	Lodo de depuradora	LD + restos de poda (1:1 v/v).	Pilas volteadas, volteo semanal.	2 meses	1 mes
LD3	Lodo de depuradora	Lodo desecado + restos de poda (1:2 v/v).	Pilas túnel hileras-reactor, nave cubierta, tornillo sin fin automático, volteo continuo (volteo 18-25d)	1 mes	2 meses
RAA1	Residuo agroalimentario	Lodos cítricos + poda palmeras (1:3 v/v).	Pilas volteadas.	5 meses	3 meses
RAA2	Residuo agroalimentario	Destrió tomate + plantas tomate.	Pilas volteadas.	4 meses	2 meses
RAA3	Residuo agroalimentario	Lodo cítrico + lodo digestión anaerobia contenido digestivo cerdos + residuos de poda (palmera) 3:1:1,5 volumen.	Pilas volteadas regidas por temperatura.	2 meses	2 meses

Código planta	Material	Mezcla para compostaje	Método de compostaje	Fase biooxidativa	Fase de maduración
ALP1	Residuo de almazara (alperujo)	Alperujo + gallinaza + paja 648 t : 115 t: 32 t mínima cantidad adicional estiércol.	Pilas volteadas (volteos cada 3 semanas o 1 mes, regido por temperatura).	6 meses	2 meses
ALP2	Residuo de almazara (alperujo)	Alperujo + estiércol + hojas olivo + compost maduro Por cada 25.000 kg de masa de alperujo se añade 7.000 kgs de hojas de olivo, 2.000 kgs de estiércol y 1.600 litros de compost maduro.	Pilas volteadas regidas por temperatura (volteos cada 15 días).	5 meses	2 meses
ALP3	Residuo de almazara (alperujo)	Alperujo + estiércol + hojas olivo 1 t :0,45 t : impreciso.	Pilas volteadas semanalmente.	3 meses	2 meses

Las muestras de compost del estudio se recolectaron de las plantas de compostaje descritas en la **Tabla III.1**, de modo que se tomaron 9 submuestras de diferentes zonas y niveles de las pilas industriales para al final generar una muestra compuesta, representativa de la pila, de peso aproximado a 3 kg. Esta muestra se dividió en 3 réplicas de 1 kg cada una. Cada réplica representó una repetición distinta del ensayo, de modo que cada planta se evaluó por triplicado. Todas las muestras se mantuvieron en bolsas de vacío en congelación a -20 °C hasta su uso en el ensayo.

De forma adicional, a la planta RV-2 se le realizó un seguimiento de muestreos, durante todo el proceso, a fin de conocer si la presencia de coliformes fecales en los compost era debida a la ausencia de higienización del proceso o bien era debida a la reinoculación externa de la pila por parte del material fecal aportado por la fauna colindante. Por lo tanto, se tomaron hasta 6 muestreos que capturan los puntos más interesantes del proceso de compostaje, concretamente fueron:

- MPR: muestreo de las materias primas.
- MES: Fase inicial mesófila (tomada en las primeras 24 horas de inicio del proceso).
- TER: Fase termófila (tomada en el interior de la pila en el momento en el que se alcanzaron los mayores registros térmicos).
- ENF: Fase de enfriamiento (correspondió al periodo de descenso térmico de la pila, momento en el que se perdieron las condiciones termófilas del material).
- MAD: Fase de maduración (obtenida durante la fase de maduración de la pila, una vez concluida la fase biooxidativa por completo).
- PRF: Producto final (correspondió al compost final del proceso, al igual que el resto de las plantas evaluadas en el ensayo).

Estos muestreos se realizaron en las mismas condiciones indicadas para los compost finales de las plantas analizadas.

B) Medios de cultivo

Para la detección, cultivo y aislamiento del grupo microbiano objeto de estudio, los coliformes fecales, así como para su posterior enfrentamiento a antibióticos, se emplearon los siguientes medios:

1. Caldo lactosado con púrpura de bromocresol empleado para la determinación de coliformes fecales

- Púrpura de bromocresol 0,02 g/L
- Lactosa 5,0 g/L
- Extracto de carne 3,0 g/L
- Peptona de gelatina 5,0 g/L
- pH 7,2

Para la elaboración de este medio de cultivo, se añadió a un matraz, 13 g del producto (Panreac, REF: 413776.1210), junto con 1 L de agua destilada. Tras disolución se repartió en tubos a razón de 9 mL por tubo. Por último, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

2. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) empleado para la determinación de coliformes fecales

- Eosina amarillenta 0,4 g/L
- Azul de metileno 0,065 g/L
- Lactosa 5,0 g/L
- Peptona bacteriológica 10,0 g/L
- K₂HPO₄ 2,0 g/L
- Sacarosa 5,0 g/L
- Agar 13,5 g/L
- pH 7,2

Para la elaboración de este medio de cultivo, se añadió a un matraz, 36 g del producto (Panreac, REF: 413762.1210), junto con 1 L de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se vertió en placas petri de 9 cm de diámetro a razón de aproximadamente 20 mL por placa.

3. Medio Agar Nutritivo (AN) utilizado para la resistencia a antibióticos de las cepas de coliformes fecales en la preparación del inóculo del patógeno y en la siembra en masa con escobillón

- Extracto de carne 3,0 g/L
- Peptona de gelatina 5,0 g/L
- Agar 15,0 g/L
- pH 6,8

1:100. Se repitió esta operación de nuevo a partir de esta última dilución, obteniéndose en este caso la dilución 1:1000. Cada ensayo fue repetido por triplicado. Respetando las condiciones de esterilidad de cada una de las tres diluciones y repitiendo el procedimiento tres veces en cada caso. Se tomó 1 mL de cada dilución y se incorporó a tubos con 9 mL de caldo lactosado con púrpura de bromocresol y campanas Durham. Este medio fue incubado a 44,5 °C durante 24 horas, para asegurarse el crecimiento de coliformes fecales, y tras las 24 horas, se efectuó la lectura de los tubos. Durante ese periodo, los coliformes fecales realizan la fermentación de la lactosa con producción de ácidos y gas, procesos que se observan por un cambio de color del indicador del medio que pasa de púrpura a amarillo, y el acúmulo de burbujas de gas en el interior de las campanas Durham. Finalmente, en la lectura se anota el número de tubos positivos para cada dilución y repetición y a partir de esos datos se puede conocer el número más probable de coliformes fecales por gramo de compost (UFC/g) mediante el empleo de las tablas del número más probable (NMP). La legislación vigente indica que los compost deben presentar recuentos de coliformes fecales menos de 1000 UFC/g (Real Decreto 506/2013).

D) Obtención de la colección de coliformes fecales

La obtención de la colección de coliformes fecales se realizó a partir de los tubos positivos de caldo lactosado con púrpura de bromocresol y campana Durham empleados en la determinación de coliformes fecales. Mediante el uso del asa de platino se obtuvo biomasa de los tubos positivos, y se realizaron siembras en aislamiento sobre el medio EMB. Una vez realizada la siembra, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 44,5 °C en baño termostático. Tras el periodo de incubación se realizó la lectura, considerándose positivos los medios con colonias de color, azul negro o verde metálico características de coliformes fecales o *Escherichia coli*, respectivamente. Ésta colonias sospechosas fueron aisladas en medio nuevo EMB de modo que se obtuviera un cultivo axénico. Una vez conseguido el cultivo puro, fue fotografiado (cámara Canon EOS 450D EF-S 18-55 IS kit a través de disparo remoto acoplado a un ordenador Sony Modelo PCG-7V5M) e identificado con un código de cepa distintivo (1 en adelante). Finalmente, para el almacenamiento de las cepas de coliformes fecales, y con ayuda del asa de platino, se obtuvo biomasa de las placas de EMB y se sembró en tubos de agar inclinado de APHA. Tras un periodo de incubación de 24 horas a 44,5 °C se observó el aspecto general del medio y la aparición de crecimiento sobre su superficie. Cuando el crecimiento fue satisfactorio, se almacenaron los tubos en una cámara fría a 4 °C. Posteriormente, la colección de tubos de agar inclinado fue conservada en criopreservación a -80 °C, mediante la elaboración de copias de los tubos en criobolas (Deltalab), con objeto de mantener una copia de seguridad de cada cepa a largo plazo de conservación.

E) Estudio de la resistencia a antibióticos de los coliformes fecales aislados

El estudio de resistencia antibiótica de las cepas de coliformes fecales aisladas en el ensayo anterior se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, (Bauer et al., 1966) el cual determina la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende una prueba basada en la susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas, conocido

como antibiograma. Se comprobó la resistencia de cada una de las cepas a 8 antibióticos diferentes adecuados para la eliminación de Gram-negativos. Cada disco de antibiótico contenía una concentración predeterminada conocida como Concentración Mínima Inhibidora (CMI), que se corresponde con la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento del microorganismo en unas condiciones normalizadas. Los antibióticos empleados fueron amoxicilina-ácido clavulánico, doripenem, cefoxitina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, streptomina, kanamicina y azitromicina (**Tabla III.2**):

Tabla III.2. Identificación, concentración, código y casa comercial de los antibióticos usados.

Antibiótico	Clase	Concentración (µg)	Código	Fabricante
Amoxicilina + ácido clavulánico	Beta-lactámico	20/10	66178	Bio-rad
Doripenem	Beta-lactámico	10	CT1880B	Oxoid
Cefoxitina	Beta-lactámico	30	CT0119B	Oxoid
Ácido nalidíxico	Quinolona	30	68618	Bio-rad
Ciprofloxacina	Quinolona	5	68648	Bio-rad
Estreptomina	Aminoglucósido	300	67608	Bio-rad
Kanamicina	Aminoglucósido	30	66618	Bio-rad
Azitromicina	Macrólido	15	CT0906B	Oxoid

Para la preparación del inóculo del patógeno se realizó un aislamiento a partir de biomasa de los tubos de APHA inclinado en placas de Agar nutritivo (AN) y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo, se suspendieron 4-5 colonias de la placa de AN en tubos de 5 mL de Caldo Nutritivo (CN) que se mantuvieron en incubación durante 2-5 horas a 37 °C (equivalente a 0,5 McFarland). Tras lo anterior, se tomó 1 mL de esta suspensión y se incorporó a matraces con 99 mL de solución salina estéril (dilución centesimal). Tras la dilución, se realizó una siembra en masa del contenido del matraz mediante el empleo de escobillón en placas de medio AN. Posteriormente, se colocaron los discos de antibióticos sobre la superficie de las placas con pinzas estériles, presionándolos ligeramente para asegurar un contacto uniforme, y se procedió a la incubación de las placas a 37 °C durante 18 horas. Pasado este periodo de incubación se procedió a la medición de los halos de inhibición. Para ello, se midió el diámetro del halo incluyendo los 6 mm del disco con ayuda de una regla apoyándola sobre la placa de Petri. Una lectura de 6 mm indicaría que para esa cepa y ese antibiótico no existe zona de inhibición. Para comparar los resultados obtenidos, se realizó el mismo procedimiento con una cepa control sin resistencia adquirida, siendo en este caso *Escherichia coli* CECT 101, de la Colección Española de Cultivos Tipo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, empleando dos discos antibióticos por placa para evitar solapamiento en los halos de inhibición generados en cada caso.

F) Estudio estadístico

Todas las medidas analíticas se realizaron por triplicado y para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics 18 (Statistical Graphics Co.). Para la determinación del efecto de los distintos factores estudiados en cada serie experimental sobre los

correspondientes parámetros o variables dependientes se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial considerando además las interacciones entre los diversos factores. En todos los casos para el cálculo de la suma de cuadrados que mide la cantidad de variación para cada factor en el ANOVA se utilizó el método de medida de tipo III y un nivel de significación del 0,05%. De acuerdo con este análisis, una vez identificados los factores que influyeron significativamente en la variabilidad de cada parámetro, se aplicó un análisis de rangos múltiples mediante el método del cálculo de las mínimas diferencias significativas (Fisher, MDS) para la comparación entre medias de los distintos niveles de cada factor considerando también en este caso un intervalo de confianza del 95%.

G) Diseño experimental

En la **Figura III.1** aparece un breve esquema de las diferentes partes del proyecto realizado:

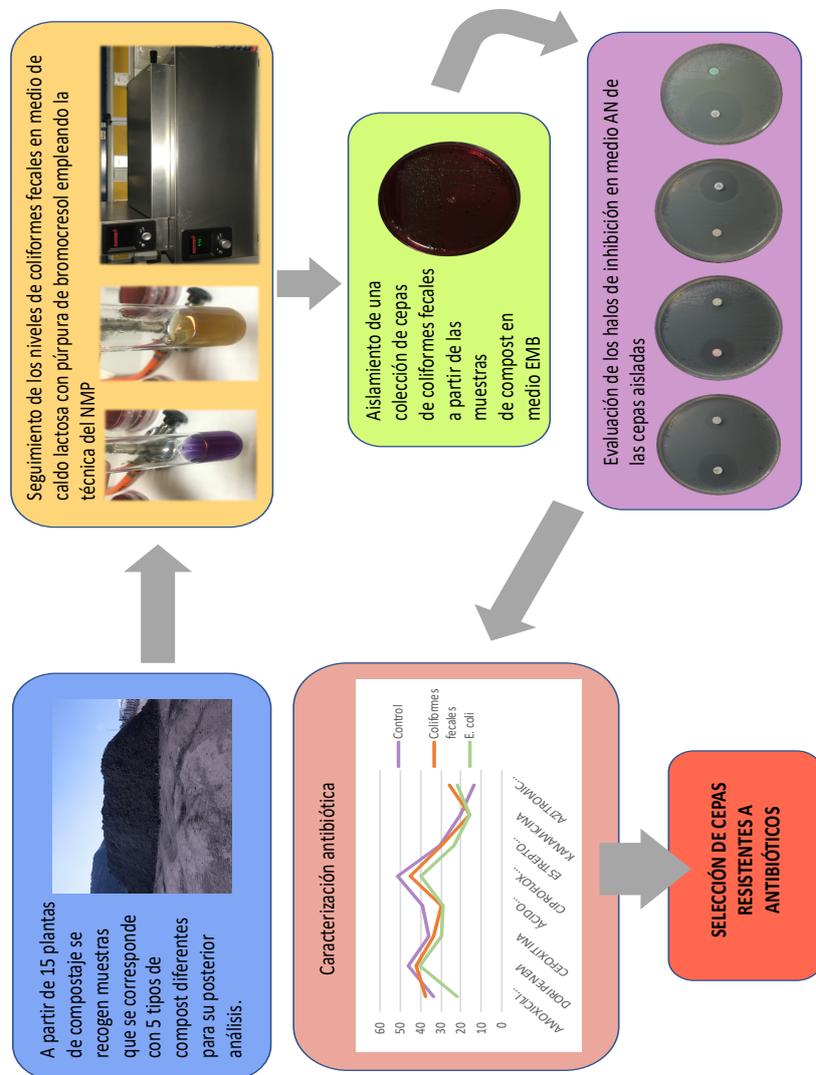


Figura III.1. Diseño experimental del trabajo.

IV. Resultados y discusión

A continuación, se describen los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de este trabajo. Éstos se encuentran organizados en tres apartados. En el primero de ellos se incluyen todos aquellos parámetros que reflejan los niveles de coliformes fecales en los compost representados en forma de tablas o figura, además de un análisis estadístico. El segundo se centra en la obtención de la colección de coliformes fecales a partir de los diferentes compost, especificándose las cepas que se consiguió aislar, de donde proceden y la posible determinación de la especie. Por último, en el tercer bloque se analiza en tablas el diferente grado de susceptibilidad o resistencia de las distintas cepas aisladas a 8 tipos diferentes de antibióticos.

a) Determinación de los niveles de coliformes fecales en compost

Se realizó la determinación de los niveles de coliformes fecales mediante ensayos con repeticiones por triplicado en 15 tipos diferentes de compost procedentes de 15 plantas de compostaje diferentes. Todas las muestras empleadas correspondían con el producto final obtenido tras el proceso de compostaje de las diferentes plantas. Los niveles de coliformes fecales en cada uno de los compost analizados se recogen en la **Tabla IV.1** y en la **Figura IV.1**. Además, en las **Tablas IV.2-5** se presenta el estudio estadístico de los datos recogidos:

Tabla IV.1. Estadística descriptiva del recuento de coliformes fecales obtenidos tras el análisis de los compost obtenidos de las plantas de compostaje industrial.

Material	Repetición	Dilución empleada	NMP	Log (NMP/g)	Promedio (Log (NMP/g))	DT
	1	-1,-2,-3	200	2,3		
RV1	2	-1,-2,-3	500	2,7	2,32	0,37
	3	-1,-2,-3	90	1,95		
	1	-1,-2,-3	90	1,95		
RV2	2	-1,-2,-3	200	2,3	2,32	0,37
	3	-1,-2,-3	500	2,7		
	1	-1,-2,-3	200	2,3		
RV3	2	-1,-2,-3	150	2,18	2,14	0,18
	3	-1,-2,-3	90	1,95		
	1	-1,-2,-3	90	1,95		
RSU1	2	-1,-2,-3	150	2,18	2,28	0,38
	3	-1,-2,-3	500	2,7		
	1	-3,-4,-5	7000	3,84		
RSU2	2	-3,-4,-5	15000	4,18	3,99	0,17
	3	-3,-4,-5	9000	3,95		
	1	-1,-2,-3	43	1,63		
RSU3	2	-1,-2,-3	150	2,18	1,71	0,43
	3	-1,-2,-3	21	1,32		
	1	-1,-2,-3	7	0,85		
LD1	2	-1,-2,-3	4	0,6	0,68	0,14

Material	Repetición	Dilución empleada	NMP	Log (NMP/g)	Promedio (Log (NMP/g))	DT
	3	-1,-2,-3	4	0,6		
	1	-1,-2,-3	3	0,48		
LD2	2	-1,-2,-3	3	0,48	0,52	0,07
	3	-1,-2,-3	4	0,6		
	1	-1,-2,-3	43	1,63		
LD3	2	-1,-2,-3	90	1,95	1,74	0,19
	3	-1,-2,-3	43	1,63		
	1	-1,-2,-3	90	1,95		
RAA1	2	-1,-2,-3	150	2,18	2,03	0,13
	3	-1,-2,-3	90	1,95		
	1	-1,-2,-3	23	1,36		
RAA2	2	-1,-2,-3	43	1,63	1,54	0,16
	3	-1,-2,-3	43	1,63		
	1	-1,-2,-3	200	2,3		
RAA3	2	-1,-2,-3	90	1,95	2,19	0,2
	3	-1,-2,-3	200	2,3		
	1	-1,-2,-3	23	1,36		
ALP1	2	-1,-2,-3	15	1,18	1,61	0,6
	3	-1,-2,-3	200	2,3		
	1	-1,-2,-3	210	2,32		
ALP2	2	-1,-2,-3	23	1,36	1,77	0,5
	3	-1,-2,-3	43	1,63		
	1	-1,-2,-3	4	0,6		
ALP3	2	-1,-2,-3	3	0,48	0,52	0,07
	3	-1,-2,-3	3	0,48		

NMP: Número más probable; Promedio: Valor medio obtenido de las tres repeticiones; DT: Desviación típica

Figura IV.1. Representación de los niveles de coliformes fecales en los compost obtenidos de las plantas de compostaje industrial. Barra error: desviación típica.

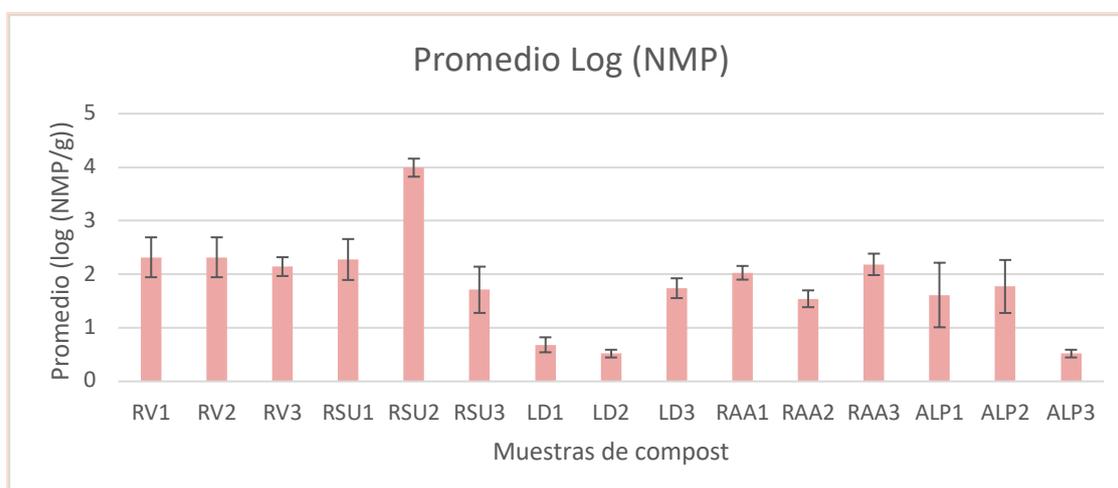


Tabla IV.2. Análisis de varianza para los valores de recuento de coliformes fecales obtenidos en los compost, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Material	16,9245	4	4,23112	35,40	0,0000
B: Planta	1,05496	2	0,527482	4,41	0,0298
C: Repetición	0,0285911	2	0,0142956	0,12	0,8881
AB	13,5343	8	1,69179	14,15	0,0000
AC	0,674276	8	0,0842844	0,71	0,6835
BC	0,254489	4	0,0636222	0,53	0,7139
Residuos	1,91244	16	0,119528		
Total	34,3836	44			

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Tabla IV.3. Prueba de rango múltiple para el factor planta.

Planta	Media LS	Grupos homogéneos
3	1,65867	A
1	1,78333	AB
2	2,02733	C

Tabla IV.4. Prueba de rango múltiple para el factor material.

Material	Media LS	Grupos homogéneos
LD	0,98	A
ALP	1,30111	A
RAA	1,91667	B
RV	2,25889	B
RSU	2,65889	C

Tabla IV.5. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Repetición	Media LS	Grupos homogéneos
1	1,788	A
2	1,83533	A
3	1,846	A

Los datos obtenidos y recogidos en la **Figura IV.1** y la **Tabla IV.1** mostraron que todos los compost en todas las repeticiones, ya sea en mayor o menor grado, produjeron resultados positivos en cuanto a la presencia de coliformes fecales. Por lo general, presentaron valores comprendidos en torno a las 2 unidades logarítmicas, a excepción de RSU2 cuyo valor lo superó considerablemente y LD1, LD2 y ALP3 con valores bastante bajos en relación al resto. Además, las muestras de RSU2 empleadas tuvieron que ser más diluidas que el resto debido a que los datos que se obtuvieron con las diluciones -1,-2,-3 (1/10, 1/100 y 1/1000 respectivamente) no eran representativos ya que todos

los tubos fueron positivos por la alta carga bacteriana y no se ajustaban a los valores de las tablas NMP.

Concretamente, los resultados obtenidos, en recuento de coliformes fecales, en los compost analizados oscilaron entre las 0,52 unidades logarítmicas de los recuentos más bajos obtenidos (compost LD2 y ALP3) y las 3,99 unidades logarítmicas presentes en el compost con los recuentos más altos obtenidos pertenecientes al compost RSU. Estos datos se corroboran con los representados en la **Tabla IV.4** en la cual se observaron diferencias significativas entre materiales y se detectó que el material con menor cantidad de coliformes fecales se correspondió con los lodos de depuradora y el alperujo, que el material con mayor cantidad procedió de los residuos sólidos urbanos, y que los residuos agroalimentarios y residuos vegetales presentaron valores intermedios. Esto resulta de un especial interés, ya que, debido a su origen, justamente los lodos de depuradora deberían ser los que tuvieran mayores recuentos de coliformes fecales (Karimi et al., 2016). Sin duda, el resultado obtenido en el ensayo, demostró que los mayores niveles de higienización se alcanzaron en los compostajes de este tipo de residuos, por lo que no resulta tan problemática la cantidad inicial de contaminación fecal sino la eficacia del proceso realizado.

Teniendo en cuenta la normativa vigente ((Real Decreto 506/2013) en relación a que los recuentos de coliformes fecales sean menores a 1000 UFC/g ($\text{Log (UFC/g)} < 3$), todos los compost analizados cumplieron esta condición a excepción de RSU2 (**Tabla IV.1**). El compost RSU no se comercializa, sino que se emplea en sellado de vertederos para la estabilización del material evitando así explosiones o emisiones de gases. Por este motivo, su empleo a pesar de tener alto contenido en coliformes fecales, no queda prohibido, pero aun así la planta encargada de generarlo presentaría un grave problema ya que el producto obtenido no es estable ni maduro y podría perder su funcionalidad. En cambio, los compost procedentes de residuos vegetales sí son empleados como abono, por lo que, a pesar de presentar valores permitidos, son considerados valores altos que suponen un grave problema de contaminación que podría incluso impedir la comercialización del producto.

En la **Tabla IV.2** los valores P indican la significancia estadística de cada uno de los factores. Dado que el material, la planta y la interacción entre material y planta, presentan valores inferiores a 0,05 son factores que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el recuento con un 95% de confianza. Las repeticiones para cada uno de los compost dan resultados homogéneos. Sin embargo, puede observarse que, en función de la planta, a pesar de utilizarse residuos semejantes los resultados no son parecidos. Esto es interesante, porque no adscribe el resultado de coliformes solo a la naturaleza del residuo, sino que, en función del manejo del proceso, los resultados pueden ser adecuados, mejorando la eficacia del proceso de compostaje realizado en cada una de las plantas en cuanto a la disminución de los niveles de coliformes fecales, como ocurrió con los compostajes de lodos de depuradora.

b) Determinación de los niveles de coliformes fecales a lo largo del proceso de compostaje

Tras comprobar la presencia de coliformes fecales en todos los compost empleados, se procedió al análisis de recuento de coliformes fecales en muestras obtenidas a partir de cada una de las fases del proceso de compostaje. Mediante este ensayo se pudo determinar si la presencia de coliformes en el producto final de compostaje se debió a la mala realización del proceso en cuanto a la higienización del mismo o como consecuencia de una contaminación producida una vez obtenido el producto final. El material empleado fue RV2 y las muestras analizadas fueron tomadas recogiendo los puntos más interesantes del proceso de compostaje como se detalló en Material y Métodos (apartado A de material y métodos, compost de estudio). Los datos obtenidos en este seguimiento se presentan en la **Tabla IV.6** y la **Figura IV.2**, así como su estudio estadístico correspondiente (**Tablas IV-7-9**).

Tabla IV.6. Estadística descriptiva del recuento de coliformes fecales obtenidos tras el análisis del compost RV2 en cada una de las fases del proceso de compostaje.

Material	Repetición	Dilución empleada	NMP	Log (NMP/g)	Promedio (Log (NMP/g))	DT
RV2-MPR	1	-1,-2,-3	500	2,70	2,32	0,37
	2	-1,-2,-3	90	1,95		
	3	-1,-2,-3	200	2,30		
RV2-MES	1	-1,-2,-3	70	1,85	2,76	0,81
	2	-1,-2,-3	110	3,04		
	3	-1,-2,-3	2400	3,38		
RV2-TER	1	-1,-2,-3	500	2,70	2,43	0,23
	2	-1,-2,-3	200	2,30		
	3	-1,-2,-3	200	2,30		
RV2-ENF	1	-1,-2,-3	23	1,36	1,45	0,16
	2	-1,-2,-3	43	1,63		
	3	-1,-2,-3	23	1,36		
RV2-MAD	1	-1,-2,-3	500	2,70	2,39	0,27
	2	-1,-2,-3	150	2,18		
	3	-1,-2,-3	200	2,30		
RV2-PRF	1	-1,-2,-3	90	1,95	2,32	0,37
	2	-1,-2,-3	200	2,30		
	3	-1,-2,-3	500	2,70		

NMP: Número más probable; Promedio: Valor medio obtenido de las tres repeticiones; DT: Desviación típica.

Figura IV.2. Representación de los niveles de coliformes fecales en muestras de compost RV2 obtenidas de cada una de las fases del proceso de compostaje. Barra error: desviación típica.

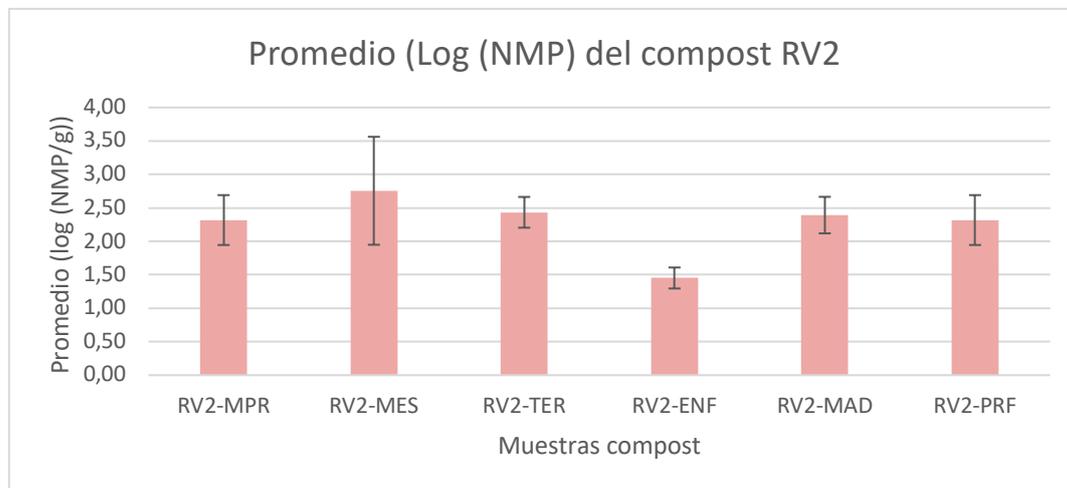


Tabla IV.7. Análisis de varianza para los valores de recuento de coliformes fecales obtenidos en los diferentes muestreos, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestreo	2,86538	5	0,573076	2,81	0,0776
B: Repetición	0,114978	2	0,0574889	0,28	0,7605
Residuos	2,04276	10	0,204276		
Total	5,02311	17			

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Tabla IV.8. Prueba de rango múltiple para el factor muestreo.

Muestreo	Media LS	Grupos homogéneos
ENF	1,45	A
PRF	2,31667	B
MPR	2,31667	B
MAD	2,39333	B
TER	2,43333	B
MES	2,75667	B

Tabla IV.9. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Repetición	Media LS	Grupos homogéneos
1	2,21	A
2	2,23333	A
3	2,39	A

En este caso los resultados oscilaron entre las 1,45 unidades logarítmicas para el recuento más bajo obtenido de los compost analizados correspondiente a RV2-ENF y las 2,76 unidades logarítmicas del compost RV2-MES que es el que presentó mayor recuento de coliformes fecales. Aun así, las condiciones de higienización para este tipo de residuos pueden optimizarse implantando sistemas sencillos de aireación (Arslan Topal et al., 2016), de los que la planta carece. Esta planta de compostaje está constituida por un sistema abierto que lo hace más susceptible a la contaminación. Se observó que cuando finalizan las condiciones termófilas en las cuales tiene lugar la higienización intensa de la pila, disminuye considerablemente la concentración de coliformes pero al comenzar la fase de maduración en la que deberían de producirse únicamente cambios fisicoquímicos se origina un crecimiento considerable de microorganismos. Este hecho determina que la pila durante la fase de maduración sufre una contaminación externa como consecuencia de estar abierta al ambiente y poder ser accesible a determinados animales que realizan sus deposiciones en ella. Este hecho podría solucionarse mediante el empleo de plantas cerradas al entorno para evitar contaminaciones externas y asegurar de esta forma un correcto mecanismo de higienización. Esto hace pensar que, con frecuencia lo que falla no es el proceso de compostaje en sí, sino las condiciones operativas de la planta de compostaje, que posibilita la aparición de contaminación cruzada o la presencia de fauna contaminante sobre las pilas. Afortunadamente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, la contaminación posterior a la fase biooxidativa no suele ser tan intensa como para incumplir los niveles marcados en legislación (Real Decreto 506/2013). En el caso de la única planta que se salió de lo marcado por la normativa (RSU2), no se escogió para realizar esta prueba ya que, justamente este proceso de compostaje se realizó completamente en nave cerrada, sin posibilidad de contaminación por fauna colindante, lo que indica que realmente el problema de la planta se adscribió a una ausencia de higienización adecuada durante el proceso de compostaje.

c) Obtención de la colección de coliformes fecales

La segunda parte del proyecto correspondió con la obtención de una colección de coliformes fecales procedentes de compostaje. Para ello tras el recuento de coliformes fecales en tubos de caldo lactosado con púrpura de bromocresol se procedió al aislamiento de los tubos positivos, aquellos de coloración amarilla y formación de gas, en medio EMB. EMB es un medio ligeramente selectivo y de diferenciación que permite el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram-negativos entéricos (*Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos) e inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Este medio contiene dos colorantes que son el azul de metileno y la eosina, que sirven para inhibir en cierto grado a las bacterias Gram-positivas y actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. El número y tipo de cepas aisladas a partir de cada uno de los compost se representa en la **Tabla IV.10**.

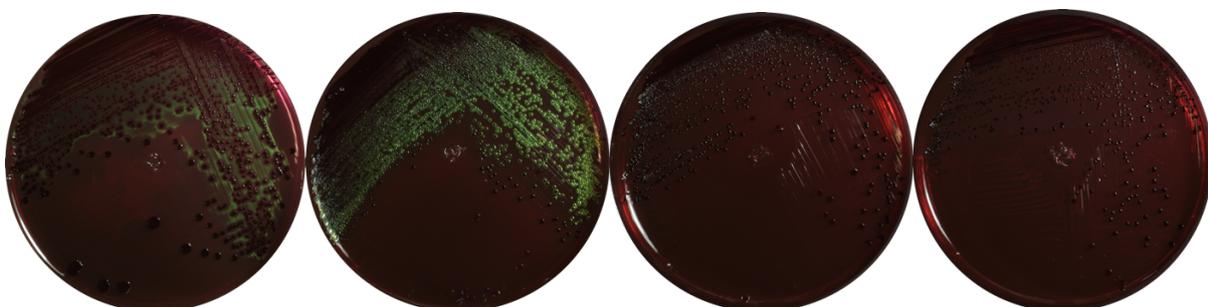
Tabla IV.10. Listado de cepas aisladas indicando el compost de procedencia, la repetición y, en caso de conocerlo, la especie a la que corresponde.

CEPA	COMPOST	REPETICIÓN	COLIFORME FECAL
1	RV1	RV1-2	-
2		RV1-3	-
3	RV2	RV2-1	-
4		RV2-3	-
5	RV3	RV3-1	-
6		RV3-2	-
7	RSU1	RSU1-1	-
8		RSU1-1	-
9		RSU1-1	<i>Escherichia coli</i>
10		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
11		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
12		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
13		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
14		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
15		RSU1-2	<i>Escherichia coli</i>
16		RSU1-3	<i>Escherichia coli</i>
17		RSU1-3	-
18		RSU1-3	<i>Escherichia coli</i>
19	RSU2	RSU2-1	<i>Escherichia coli</i>
20		RSU2-1	<i>Escherichia coli</i>
21		RSU2-1	<i>Escherichia coli</i>
22		RSU2-1	-
23		RSU2-1	<i>Escherichia coli</i>
24		RSU2-2	<i>Escherichia coli</i>
25		RSU2-2	<i>Escherichia coli</i>
26		RSU2-2	<i>Escherichia coli</i>
27		RSU2-2	-
28		RSU2-3	<i>Escherichia coli</i>
29		RSU2-3	<i>Escherichia coli</i>
30		RSU2-3	<i>Escherichia coli</i>
31		RSU2-3	<i>Escherichia coli</i>
32		RSU2-3	<i>Escherichia coli</i>
33	RSU3	RSU3-1	-
34		RSU3-1	-
35		RSU3-2	-
36		RSU3-2	<i>Escherichia coli</i>
37		RSU3-3	-
38	RAA1	RAA1-1	-
39		RAA1-2	-

CEPA	COMPOST	REPETICIÓN	COLIFORME FECAL
40		RAA1-3	<i>Escherichia coli</i>
41	RAA3	RAA3-3	-
42	ALP1	ALP1-1	<i>Escherichia coli</i>
43		ALP1-1	<i>Escherichia coli</i>
44		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
45		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
46		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
47		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
48		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
49		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
50		ALP1-3	<i>Escherichia coli</i>
51	ALP2	ALP2-1	-
52		ALP2-1	-
53		ALP2-2	-
54		ALP2-3	-
55		ALP2-3	-

En la determinación de los niveles de coliformes fecales todos los compost mostraron resultados positivos, sin embargo, se observa que no se consiguió aislar en EMB cepas procedentes de todos ellos. Este hecho ocurrido para los compost RAA2, ALP3, LD1, LD2 y LD3, se debe a una pérdida de viabilidad de las cepas, las cuales no han sido capaces de adaptarse a la segunda parte del estudio constituida por la elaboración de la colección de coliformes fecales y la posterior caracterización antibiótica. Se consiguió aislar un total de 55 cepas en tubos de APHA que reunían las características propias del grupo de coliformes fecales (**Figura IV.3**), siendo ALP1, RSU1 y RSU2 los compost de donde se obtuvo un mayor número de cepas aisladas.

Figura IV.3 Fotografías de las cepas sembradas en medio EMB. Cepa 10 y 30: *Escherichia coli*. Cepas 22 y 27: coliforme fecal (género indeterminado).



Orden de cepas de izquierda a derecha: 10, 30, 22, 27

Las bacterias Gram-negativas fermentadoras de lactosa provocan una acidificación del medio EMB. En estas condiciones ácidas, los colorantes producen un complejo de color púrpura oscuro asociado con un brillo verde metálico que se corresponde con un indicador de la vigorosa capacidad

de fermentación de la lactosa. Una menor producción de ácido como consecuencia de una fermentación más lenta provoca una coloración negra-marrón-rosa de las colonias. Coliformes como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* producen colonias grandes de color negro azulado en medio EMB. En el caso de *Escherichia coli* pueden producirse diferentes resultados. Por lo general las cepas de *E. coli* se caracterizan por presentar el brillo verde metálico como consecuencia de la rápida fermentación de la lactosa, pero existen otras cepas que no lo desarrollan debido a que presentan algunas actividades metabólicas diferentes. En este caso las colonias en medio EMB presentarían un color negro azulado. Como consecuencia de las altas temperaturas empleadas durante el ensayo se descarta la presencia de cepas de *E. coli* peligrosas ya que muchas de ellas pierden parte de sus capacidades biológicas como consecuencia del alto grado de patogenicidad, como, por ejemplo, la terriblemente famosa *E. coli* O104:H4 (Navarro-García, 2014). Además, la lectura de los resultados tiene que hacerse según los tiempos indicados para que sean lo más fiables posible, ya que por ejemplo algunas cepas de *E. coli* sufren un efecto conocido como camaleonaje, mediante el cual las colonias pierden progresivamente su color verde metálico característico. Del total de cepas se pudo determinar que 32 de ellas eran *E. coli* por presentar en placa el brillo metálico característico.

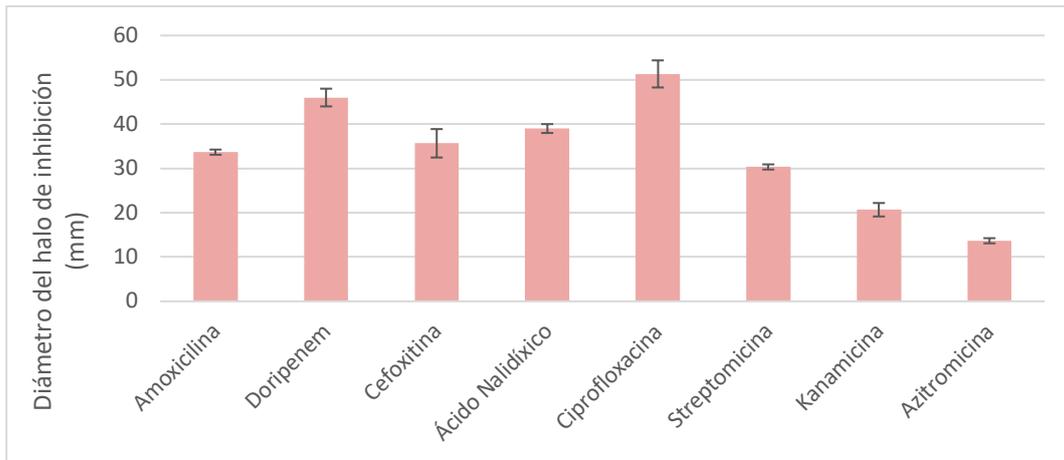
Para el resto de cepas no se determinó la especie de procedencia, pero se podrían haber distinguido mediante diferentes metodologías. Un ejemplo sería la caracterización bioquímica mediante el empleo de las pruebas API (Murray, 1978). Se trata de un sistema de identificación rápido y eficaz para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y bacterias Gram-negativas que consta de 21 test bioquímicos estandarizados y una base de datos. La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura en las que se indica si los microorganismos son positivos o negativos para cada reacción en función del color que genere. También se podrían usar técnicas moleculares como la PCR cuantitativa, extrayendo ADN de las muestras de compost directamente y empleando cebadores asociados a la especie en cuestión (Godambe et al., 2017).

d) Estudio de la resistencia antibiótica de coliformes fecales

Finalmente, la última parte del proyecto se centró en el estudio de la resistencia antibiótica de las cepas de coliformes fecales aisladas. Las 55 cepas fueron enfrentadas a 8 antibióticos diferentes pertenecientes a 4 clases: beta-lactámicos (amoxicilina-ácido clavulánico, doripenem, cefoxitina), quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina), aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina) y macrólidos (azitromicina). Cada uno de los antibióticos empleados tiene un mecanismo de acción diferente y afecta a las cepas de distinta forma.

Para que los resultados del antibiograma de discos sean fiables es importante introducir un control de calidad interno, mediante el uso de cepas control. Las cepas control son de uso universal y son empleadas debido al conocimiento que se tiene sobre su patrón de sensibilidad frente a determinados antimicrobianos. La cepa empleada como control fue *Escherichia coli* CECT 101, (**Figura IV.4**).

Figura IV.4 Antibiograma de *Escherichia coli* CECT 101.



Como se puede observar en el gráfico la resistencia de la cepa de *E. coli* CECT 101 varió para los diferentes antibióticos. Los antibióticos para los que presentó mayor susceptibilidad fueron doripenem y ciprofloxacina, que corresponde con aquellos que son más recientes o de segunda generación.

En las Figuras IV.5-20 aparece la resistencia antibiótica de las 55 cepas a cada uno de los antibióticos empleados en este estudio. En las figuras se ha añadido el valor de la cepa control para ver las posibles diferencias que tiene con el resto de cepas.

Figura IV.5. Resistencia antibiótica a amoxicilina de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

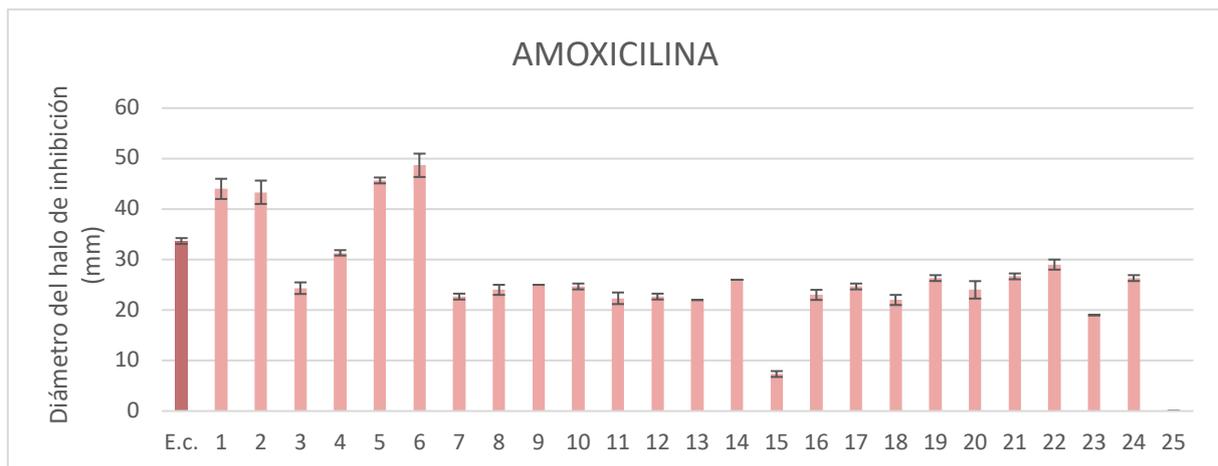


Figura IV.6. Resistencia antibiótica a amoxicilina de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

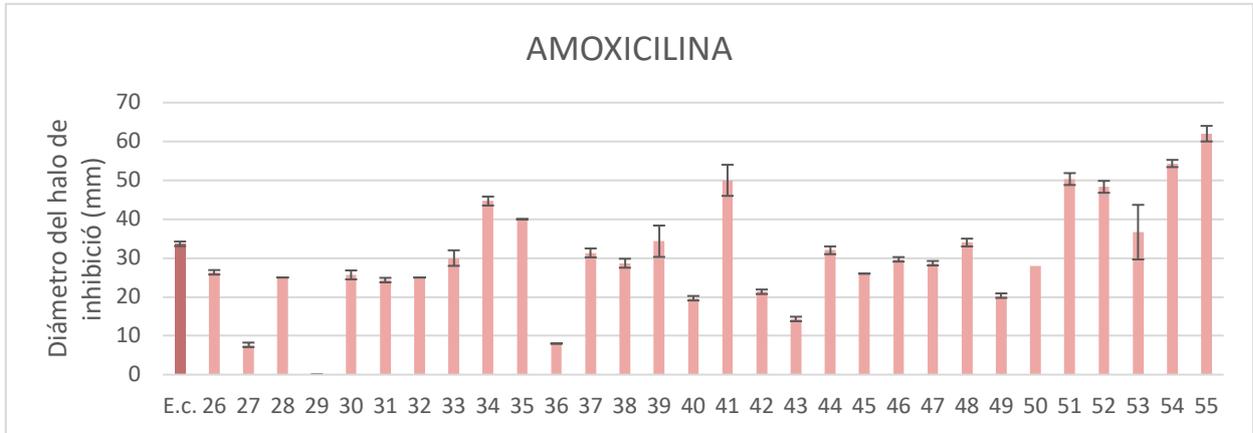


Figura IV.7. Resistencia antibiótica a doripenem de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

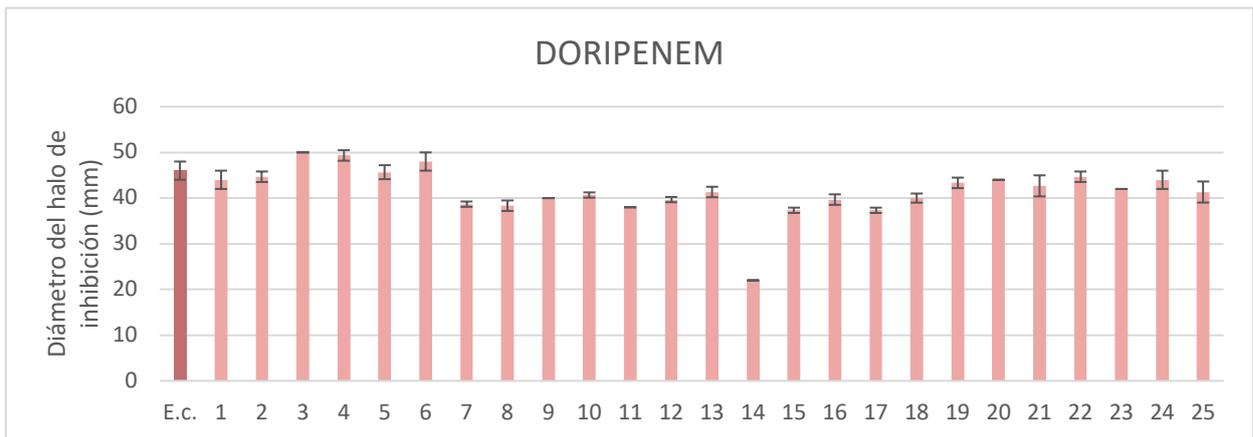


Figura IV.8. Resistencia antibiótica a doripenem de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

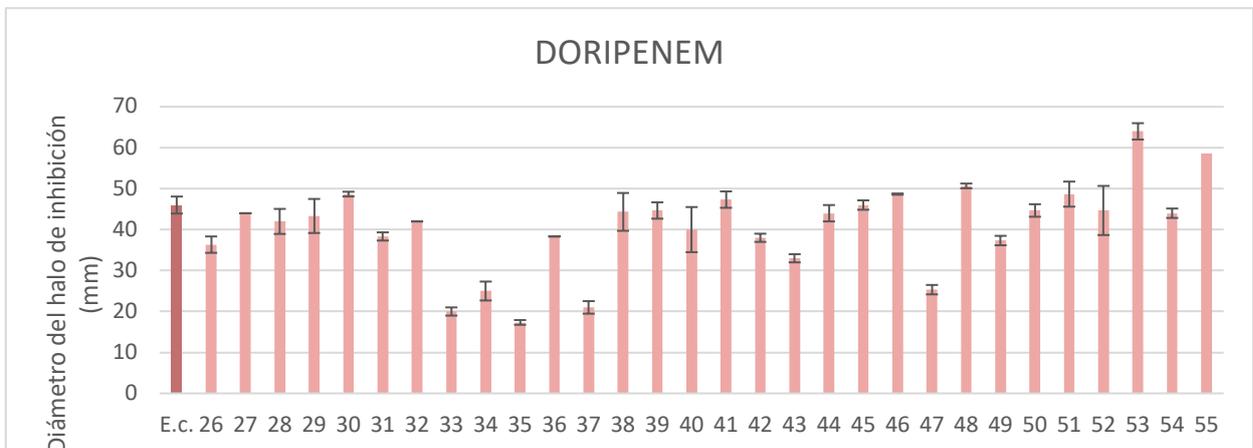


Figura IV.9. Resistencia antibiótica a cefoxitina de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

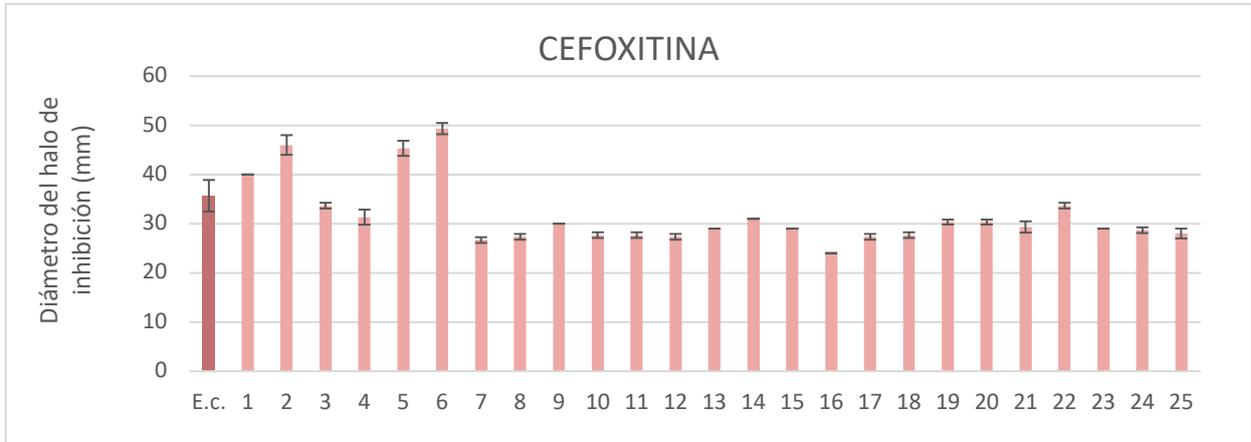


Figura IV.10. Resistencia antibiótica a cefoxitina de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

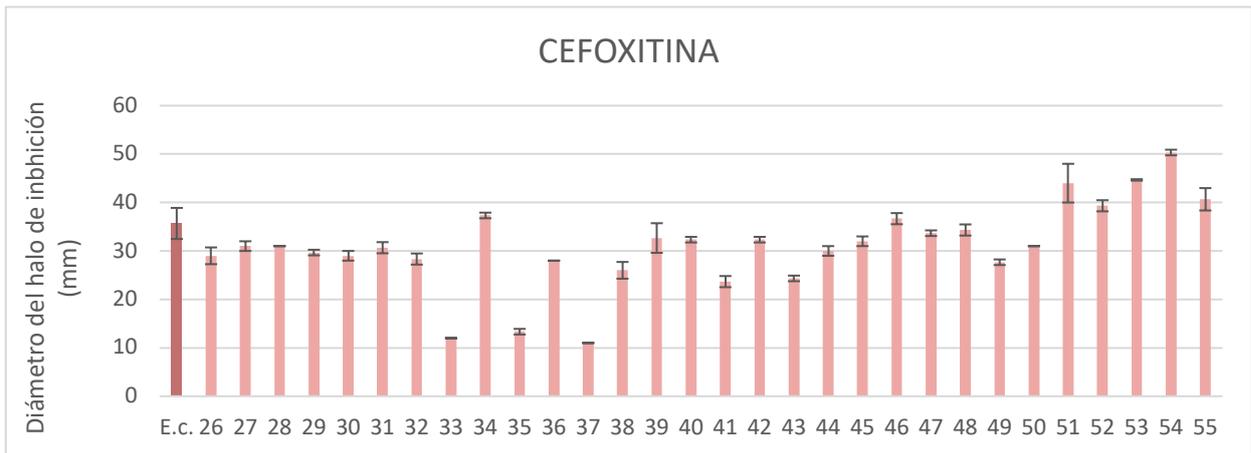


Figura IV.11. Resistencia antibiótica a ácido nalidíxico de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

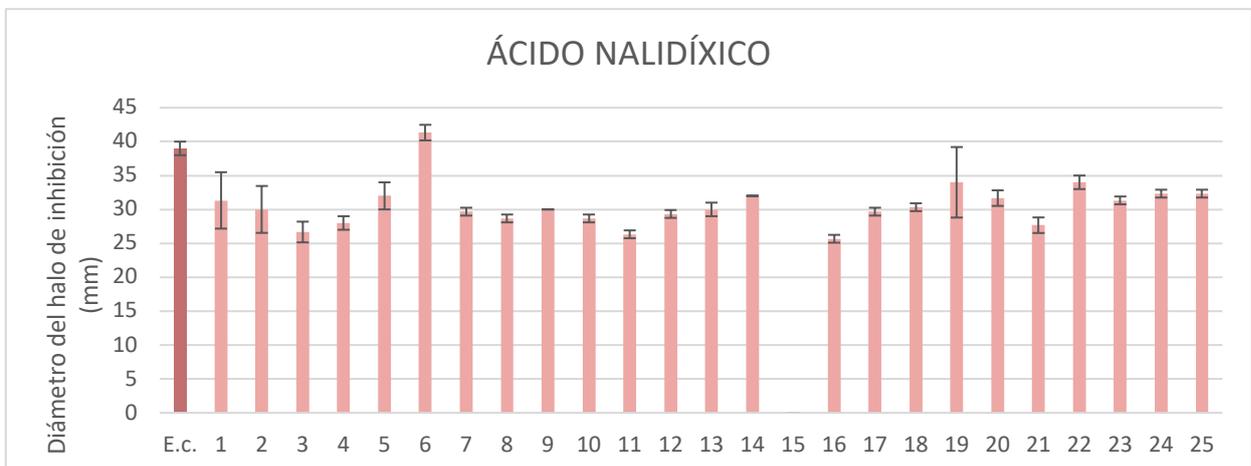


Figura IV.12. Resistencia antibiótica a ácido nalidíxico de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

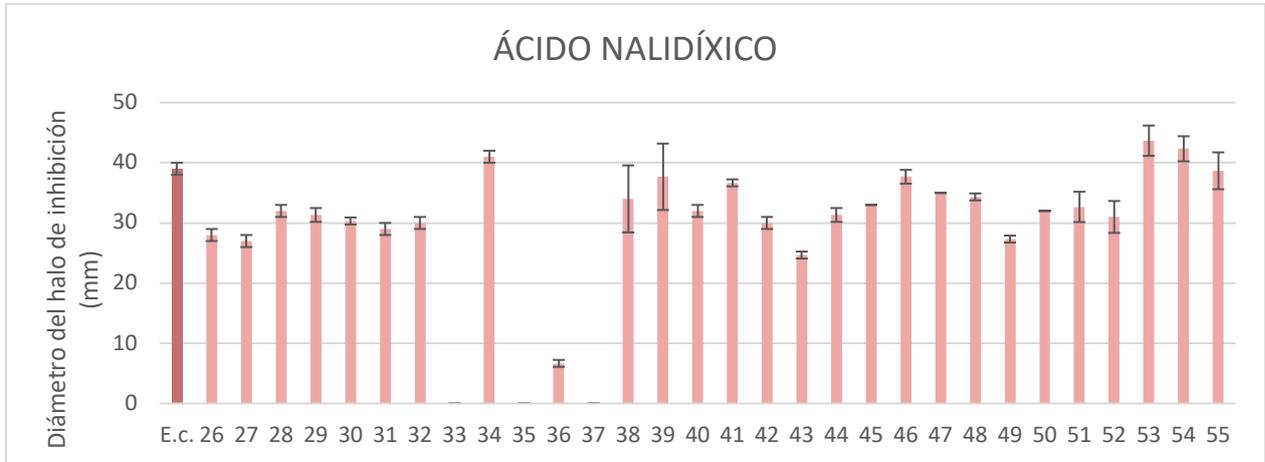


Figura IV.13. Resistencia antibiótica a ciprofloxacina de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

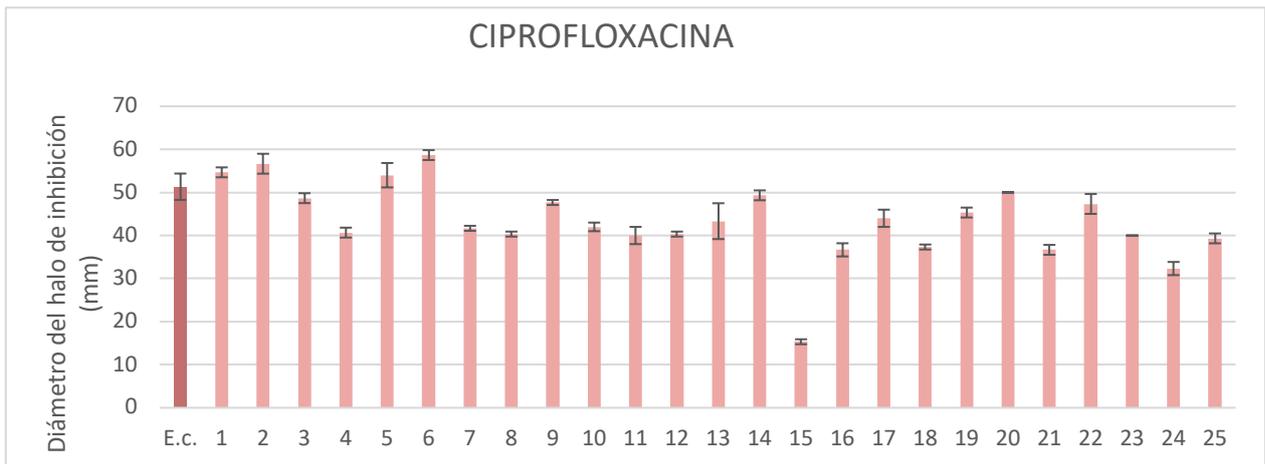


Figura IV.14. Resistencia antibiótica a ciprofloxacina de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

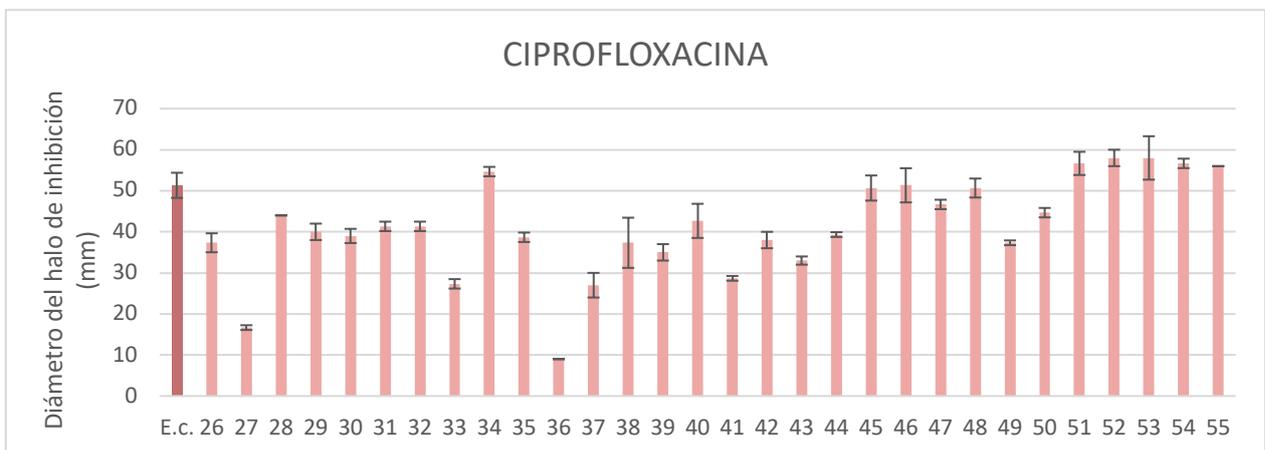


Figura IV.15. Resistencia antibiótica a estreptomycin de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

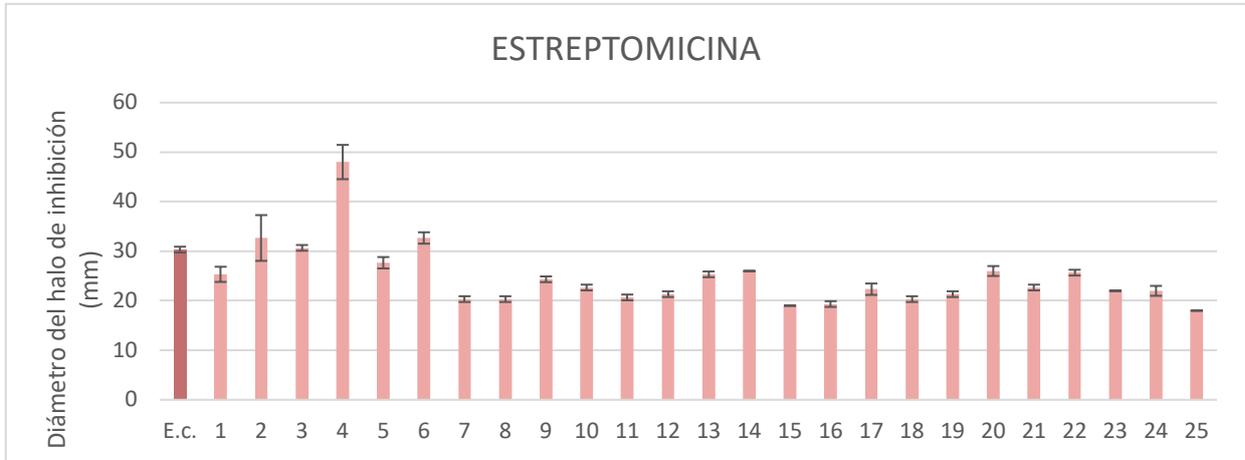


Figura IV.16. Resistencia antibiótica a estreptomycin de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

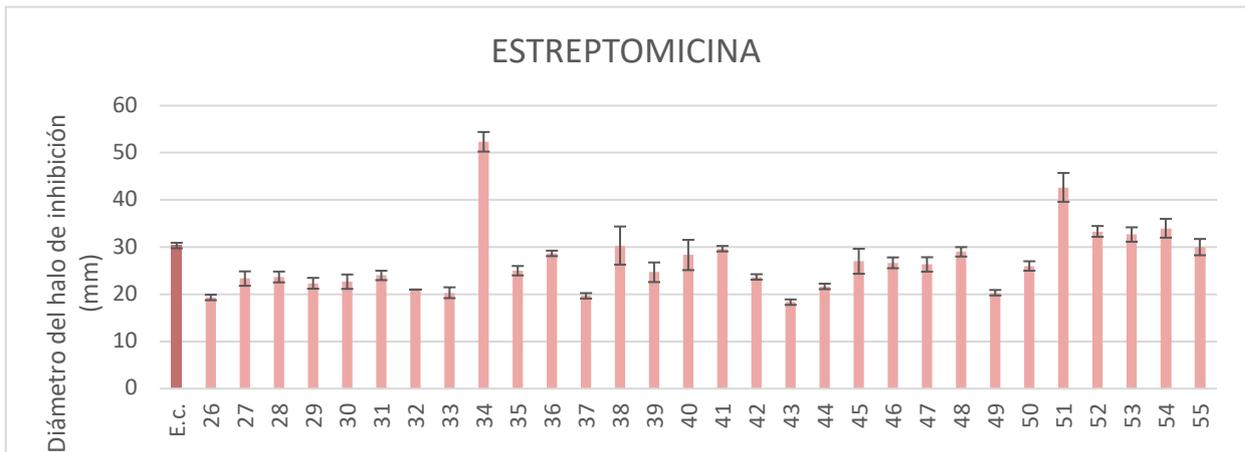


Figura IV.17. Resistencia antibiótica a kanamicina de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

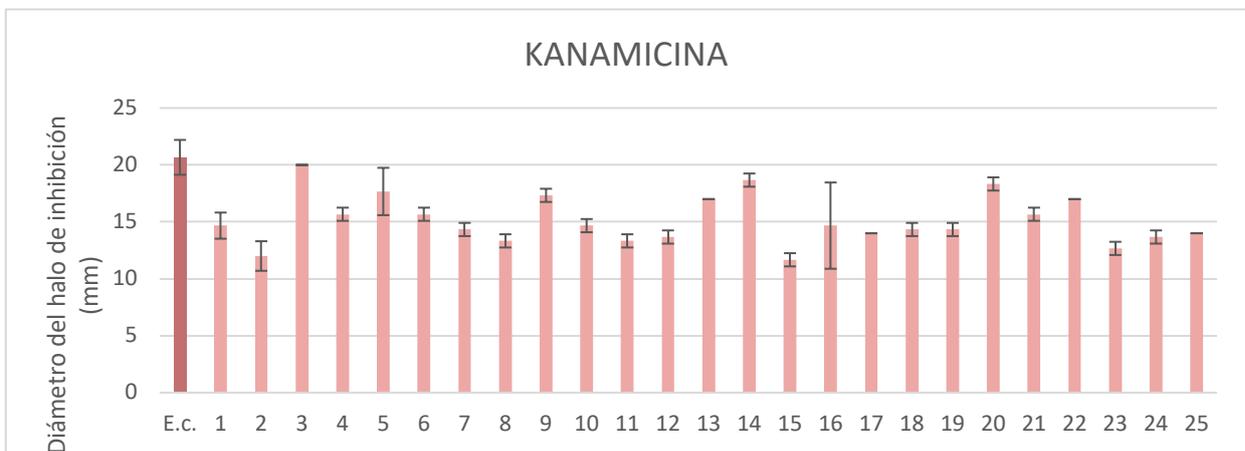


Figura IV.18. Resistencia antibiótica a kanamicina de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

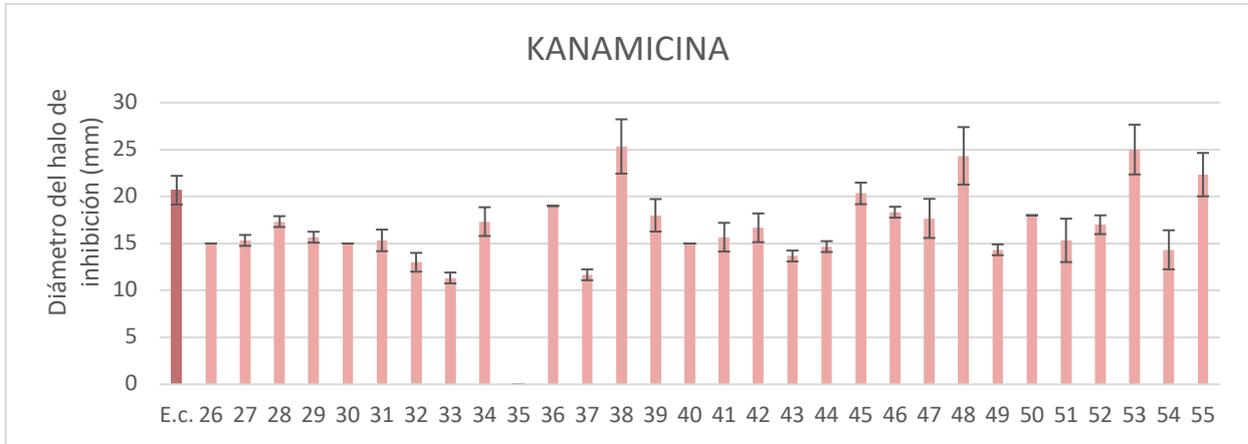


Figura IV.19. Resistencia antibiótica a azitromicina de las cepas 1-25. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).

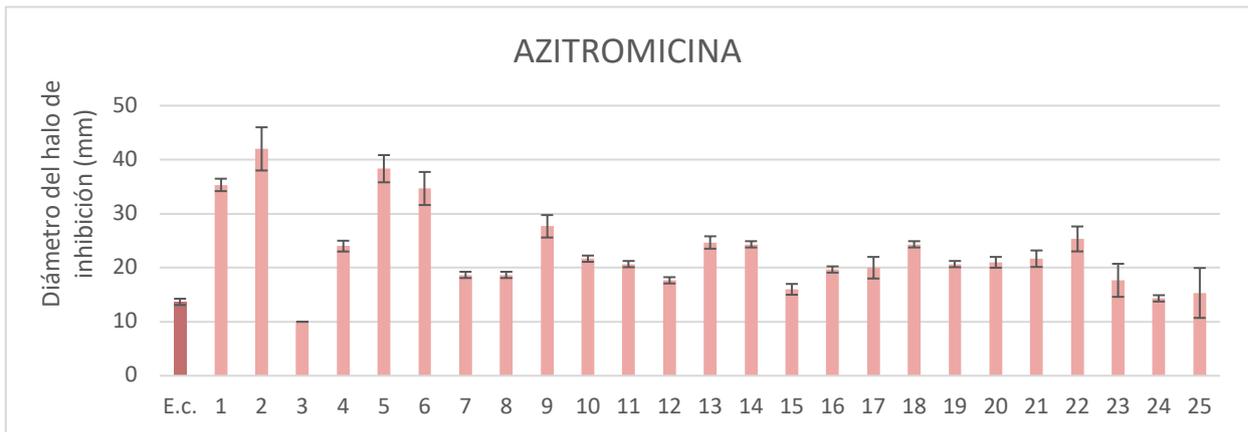
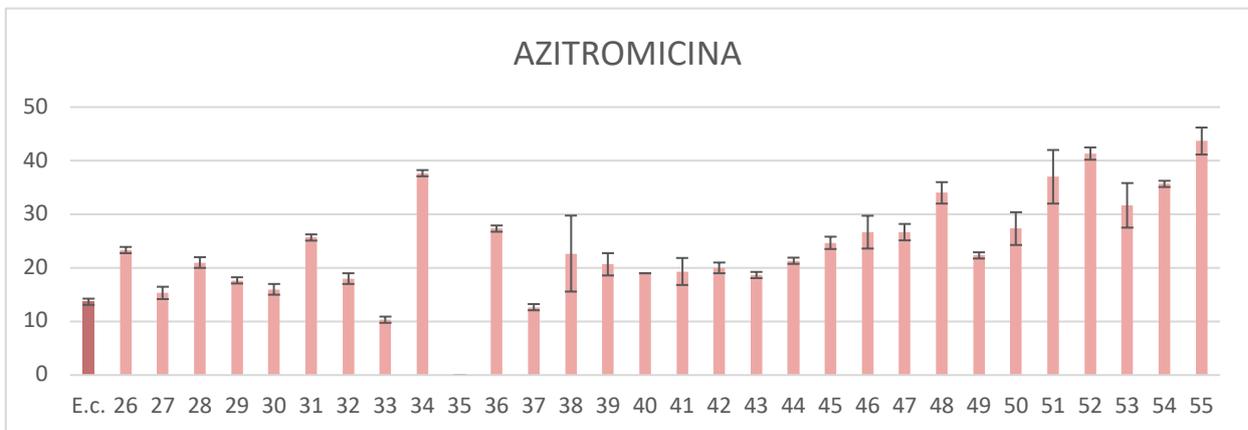


Figura IV.20. Resistencia antibiótica a azitromicina de las cepas 26-55. E.c.= cepa control (*E. coli* CECT 101).



Se puede observar que los resultados obtenidos variaron en gran medida en función de la cepa y del antibiótico empleado. Por lo general todos los antibióticos provocan inhibición del crecimiento bacteriano, aunque en determinados casos las cepas son completamente resistentes. Las cepas 15, 33 y 37 presentaron resistencia al ácido nalidíxico, y las cepas 25 y 29 a la amoxicilina-ácido clavulánico. La cepa más resistente del ensayo fue la 35 ya que resistió hasta 3 antibióticos por completo (ácido nalidíxico, kanamicina y azitromicina), así como una fuerte resistencia en los otros 5 antibióticos del ensayo. En la **Figura IV.21** se presenta la enorme diferencia que existió en el antibiograma entre la cepa control y una cepa resistente.

Figura IV.21. Fotos de la siembra en masa en AN para la evaluación de la resistencia antibiótica mediante el empleo de disco de las cepas aisladas a partir de compostaje. Cepa control (arriba) y cepa 33 (abajo).



El hecho de que exista un gran número de especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae* conlleva a una gran variabilidad de los patrones de resistencia natural. Además, esa diversidad se incrementa por la posibilidad que presentan los microorganismos de adquirir nuevos genes de resistencia de organismos de su misma especie o de otras. La adquisición de multirresistencias por parte de los microorganismos puede provocar la ineficacia de gran parte de los antimicrobianos. Conocer los patrones de resistencia naturales y adquiridos de un microorganismo, permite deducir el mecanismo de resistencia asociado a su fenotipo y por tanto predecir su respuesta a un determinado antimicrobiano (Nontongana et al., 2014). Cuando se detecta la presencia de resistencias adquiridas en el antibiograma de una especie se requiere la evaluación de los datos obtenidos para comprender el mecanismo que los produce e interpretarlo. La resistencia adquirida provoca una alteración del patrón natural de resistencia de una determinada especie, convirtiéndose el patrón de resistencia resultante en la suma de la resistencia natural y la resistencia adquirida. La aparición de nuevas enzimas ajenas a la especie puede deberse a la adquisición de material genético mediante diferentes

métodos como la conjugación, transformación o transducción. Siempre se trata de material extracromosómico (plásmidos, transposones o secuencias de inserción) que la bacteria es capaz de asimilar y perpetuar en su especie ya sea a través de plásmidos o incorporándolo a su cromosoma. En cambio, otras resistencias adquiridas son producidas por mutaciones en genes cromosómicos, ya sea en la región promotora o en los genes reguladores encargados de su expresión.

En el caso de *E. coli* se presenta un fenotipo el cual es sensible a todos los beta-lactámicos, esto es debido a que es portadora de una betalactamasa cromosómica de clase C cuya expresión es muy reducida y por ello no confiere resistencia de trascendencia clínica. Sin embargo, cuando esta enzima se encuentra hiperproducida concede resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, asociaciones con inhibidores, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas, pudiendo también afectar a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos. *Klebsiella* spp, *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus*, son sensibles a cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos y a las asociaciones de inhibidores de betalactamasa como amoxicilina-ácido clavulánico (Navarro et al., 2010). La resistencia producida por estas especies es debida a la producción de una betalactamasa cromosómica de clase A con actividad penicilinas. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* interviene la betalactamasa SHV-1 y en *Klebsiella oxytoca* se trata de la K1, la cual si es hiperproducida puede comportarse como una betalactamasa de espectro extendido (Aliaga, 2002). *Enterobacter* spp. y *Citrobacter freundii* presentan una betalactamasa de clase C con actividad cefalosporinasa que les confiere resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefoxitina y a las asociaciones de inhibidores. A su vez son sensibles a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactámicos y carbapenémicos (Navarro et al., 2010).

En el grupo de las quinolonas destacan el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino. En la resistencia a quinolonas suelen producirse mutaciones secuenciales, que a su vez están asociadas a otros mecanismos como las bombas de expulsión. Por lo general las mutaciones tienen lugar en regiones concretas de las dos subunidades de la ADN girasa y la topoisomerasas IV, conocidas como QRDR (quinolone resistance-determining región) que se relacionan con un incremento de la concentración mínima inhibitorias de las quinolonas. Una primera mutación en el gen *gryA* en una región QRDR provoca resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a fluoroquinolonas. Sin embargo, una segunda mutación en la misma o diferente región puede llegar a producir la resistencia a fluoroquinolonas y en el caso de enterobacterias puede conferir una alta resistencia a ciprofloxacina (Machuca et al., 2016).

En las enterobacterias el comportamiento de un aminoglucósido depende de varios factores como la difusión pasiva a través de la membrana externa, el transporte activo a través de la membrana interna, la afinidad del antibiótico por su diana que es una proteína ribosómica, la metilación de la unidad 16S del ARN ribosómico y la presencia de enzimas inactivantes. La mayoría de las especies de este grupo son sensibles a este tipo de antibióticos, aunque existe una serie de excepciones. La presencia de los genes *AAC(2')* y *ACC(6')* confiere en el primer caso resistencia a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina y en el segundo una leve resistencia a

tobramicina. Mutaciones producidas en el gen *ACC(6')* provoca una hiperproducción de enzimas que otorgan una alta resistencia a tobramicina y kanamicina. Además, la producción de enzimas inactivas (AAC, APH y ANT), metiltransferasas (ArmA, Rmt o Npm) y alteraciones en la permeabilidad también provocan una alta resistencia a aminoglucósidos (Navarro et al., 2010). En el caso concreto de la resistencia a estreptomina y a espectinomicina se produce una mutación puntual en el sitio de acción de estos agentes, la proteína de la subunidad 30S denominada proteína S12 (Vignoli & Seija, 2008).

La eritromicina, primer macrólido, actúa frente a la mayoría de cocos Gram-positivos, algunos anaerobios y bacilos Gram-positivos. Sin embargo, un antibiótico más moderno como la azitromicina es capaz de actuar contra organismos Gram-negativos como se observó en el presente estudio. Los macrólidos se unen de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr (Sevilla-Sánchez et al. 2010).

Para comprobar cuál de los antibióticos en líneas generales funcionó mejor para inhibir a las cepas aisladas, se representa en la **Tabla IV.11** el promedio de los valores de diámetro del halo de inhibición obtenidos en todas las cepas para cada uno de los antibióticos.

Tabla IV.11. Promedio de los halos de inhibición de las 55 cepas aisladas.

Antibiótico	Promedio dm halo (mm)
Amoxicilina + ácido clavulánico	28,39
Doripenem	41,04
Cefoxitina	31,19
Ácido nalidíxico	29,13
Ciprofloxacina	42,17
Estreptomina	25,88
Kanamicina	15,82
Azitromicina	23,49

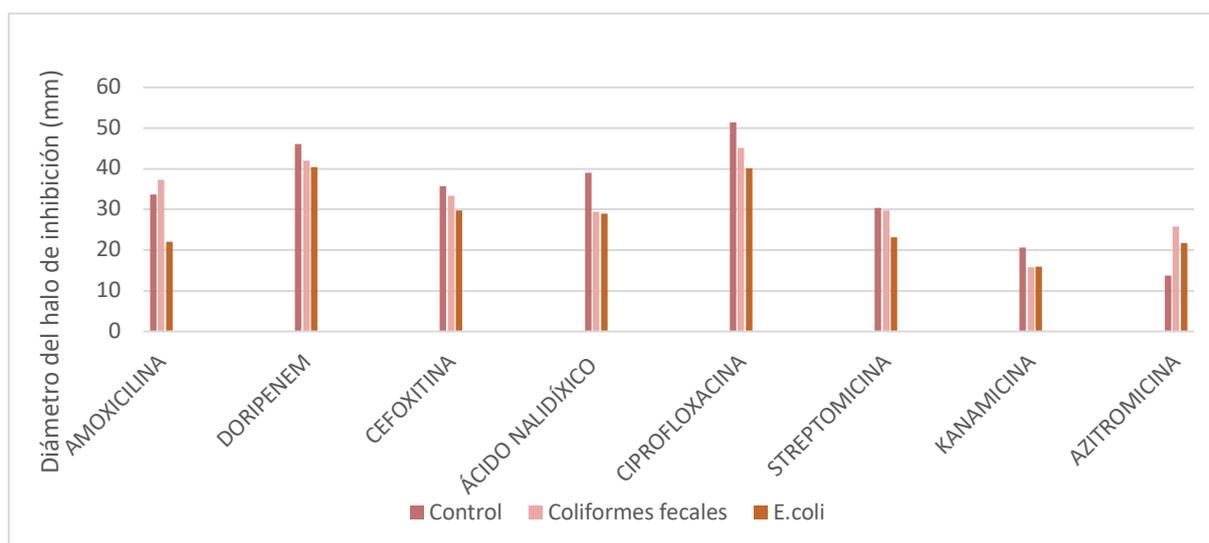
El antibiótico menos eficaz para hacer frente a estas cepas fue la kanamicina con un promedio del halo de inhibición de aproximadamente 15,82 mm, seguido de la azitromicina y la amoxicilina-ácido clavulánico con un diámetro de 23,49 y 28,39 mm respectivamente. Estos datos fueron los esperados, ya que no son antibióticos específicos para el control de este grupo microbiano como se ha discutido anteriormente. Los efectos producidos por doripenem y ciprofloxacina en el crecimiento de las cepas fueron considerablemente más satisfactorios coincidiendo además con que son antibióticos más recientes y que por tanto tienen mejores mecanismos de acción. Por tanto, las dos clases de antibióticos con mayor capacidad para hacer frente a estas cepas aisladas a partir de compostaje fueron los beta-lactámicos y las quinolonas.

Al conocer que de las 55 cepas aisladas 32 de ellas son *E. coli* y el resto pertenecen a otros coliformes fecales, se realizó una comparación global entre estos dos grupos junto con la cepa control. De este modo, se pudo determinar cuáles fueron los antibióticos con mayor efecto de inhibición en el crecimiento para cada uno de ellos (Tabla IV.12. y Figura IV.22).

Tabla IV.12. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos para las cepas aisladas y el diámetro de los halos de la cepa control.

Antibiótico	Dm halo (mm)	Promedio dm halo (mm)	
	Control	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
Amoxicilina	33,67	37,22	22,05
Doripenem	46	41,93	40,4
Cefoxitina	35,68	33,33	29,66
Ácido nalidíxico	39	29,4	28,95
Ciprofloxacina	51,33	45,1	40,06
Estreptomina	30,33	29,72	23,12
Kanamicina	20,67	15,78	15,85
Azitromicina	13,68	25,87	21,78

Figura IV.22. Comparación de los resultados obtenidos en la resistencia antibiótica para la cepa control, las cepas aisladas *E.coli* y el resto de cepas aisladas de coliformes fecales.



A pesar de clasificar los datos por grupos los resultados obtenidos siguieron indicando que los antibióticos más efectivos fueron los beta-lactámicos y las quinolonas, destacando considerablemente doripenem y ciprofloxacina. Resultó interesante que el grupo de *E. coli* en general, mostró una menor susceptibilidad antibiótica, sin presentar diferencias significativas salvo en un antibiótico tradicionalmente usado para el control de este grupo tanto en humanos como en animales, la amoxicilina. Este hecho encontrado en el trabajo realizado reafirma lo detectado por

autores como Haberecht et al. en 2019, donde se pone de manifiesto que la utilización masiva de este antibiótico ha generado la difusión de resistencias en microbiomas ambientales con alto grado de persistencia.

V. Conclusiones

- 1- Los compost generados mediante compostaje industrial poseen niveles de coliformes fecales admisibles por la legislación actual, salvo en casos puntuales de productos generados a partir de plantas de tratamiento de residuos sólidos urbanos, cuyo destino del compost no es la utilización agronómica del mismo.
- 2- Los compost procedentes de compostaje industrial de lodos de depuradora y alpeorajo resultaron ser aquellos que contenían menor carga fecal de todos los analizados, por lo que, en estos procesos se alcanzaron las mejores condiciones de higienización en las pilas.
- 3- Pese a que la naturaleza del residuo resultó decisiva en cuanto a su contenido en coliformes fecales, generar las adecuadas condiciones de higienización en las pilas industriales durante el tiempo suficiente garantiza la obtención de materiales estables, maduros y libres de patógenos.
- 4- Las plantas de compostaje industrial que realizaron sus procesos en abierto sufrieron reinoculaciones de coliformes fecales una vez superada la fase biooxidativa del proceso como consecuencia de las deyecciones de la fauna colindante, sin alcanzar niveles microbianos que comprometieran la utilización ulterior del producto.
- 5- Beta-lactámicos y quinolonas fueron los grupos de antibióticos más eficaces para inhibir el crecimiento de coliformes fecales presentes en muestras de compost. Por el contrario, los macrólidos el grupo más ineficaz, pese a que la azitromicina pueda tener cierta acción frente a patógenos Gram-negativos.
- 6- Existe una elevada presencia de cepas coliformes fecales en entornos ambientales como el compostaje, que muestran importantes mecanismos de resistencia antibiótica, con especial incidencia hacia los antibióticos clásicos usados con mayor frecuencia de uso médico.

Bibliografía

- Aliaga, R.R. 2002. Caracterización de las betalactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències, Departament de Genètica i Microbiologia.
- Alós, J.I. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33, 639 -702.
- APHA, 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. 9221 Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group. Washington. <https://www.standardmethods.org/> Consultado julio 2019.
- APHA, 2017b. Standard methods for the examination of water and wastewater. 9260 Detection of pathogenic bacteria. Washington. <https://www.standardmethods.org/> Consultado julio 2019.
- Arslan Topal, E.I., Ünlü, A. y Topal, M. 2016. Effect of aeration rate on elimination of coliforms during composting of vegetable–fruit wastes. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 5, 243-249.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.
- Belyaeva, O.N., Haynes, R.J. y Sturm, E.C. 2012. Chemical, physical and microbial properties and microbial diversity in manufactured soils produced from co-composting green waste and biosolids. *Waste Management* 32, 2248–2257.
- Cabral, J.P.S. 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 3657-3703.
- CEN, 2011. Brote de *Escherichia coli* O104:H4 productor de toxina Shiga en Alemania. Mayo-julio de 2011. Centro Nacional de Epidemiología. Área de Vigilancia de la Salud Pública. *Boletín Epidemiológico Semanal* 19, 7 (2011).
- Curtis, M.J. y Claassen, V.P. 2009. Regenerating topsoil functionality in four drastically disturbed soil types by compost incorporation. *Restoration Ecology* 17, 24-32.
- EPA (Environmental Protection Agency, USA). 2003. Environmental regulations and technology. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA625-R-92-013.
- Fariñas, M.C. y Martínez-Martínez, L. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 31, 355-420.
- Fernández, G.A., Solano, A. y De la Fuente, B. 2002. Artritis séptica poliarticular por *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29, 191-239.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M. y Feng, P. 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7, 644.
- Godambe, L.P., Bandekar, J. y Shashidhar, R. 2017. Species specific PCR based detection of *Escherichia coli* from Indian foods. *3 Biotech* 7, 130.
- Haberecht, H.B., Nealon, N.J., Gilliland, J.R., Holder, A.V., Runyan, C., Oppel, R.C., Ibrahim, H.M., Mueller, L., Schrupp, F., Vilchez, S., Antony, L., Scaria, J. y Ryan, E.P. 2019. Antimicrobial-

- resistant *Escherichia coli* from environmental waters in Northern Colorado. *Journal of Environmental and Public Health* 2019, 3862949.
- Hamzaoui, A., Salem, R., Koubaa, M., Zrig, M., Mnif, H., Abid, A., Golli, M. y Mahjoub, S. 2009. *Escherichia coli* osteomyelitis of the ischium in an adult. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 95, 636-638.
- Harrison, E.Z. 2004. Hygienic implications of small-scale composting in New York State. Final report of the cold compost project. The Cornell Waste Management Institute. Ithaca, New York. <http://cwmi.css.cornell.edu/ColdCompostreport.pdf> Consultado julio 2019.
- Hultman, J., Vasara, T., Partanen, P., Kurola, J., Kontro, M.H., Paulin, L., Auvinen, P. y Romantschuk, M. 2010. Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis. *Journal of Applied Microbiology* 108, 472-487.
- Iglesias Jiménez, E., Barral, M.T. y Marhuenda-Egea, F.C. 2011. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. En: Moreno, J. y Moral, R. *Compostaje*. pp. 243-283. Mundi-prensa, Madrid.
- Jerse, A.E. y Kaper, J.B. 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infection & Immunity* 59, 4302-4309.
- Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Vargas-García, M.C., López-González, J.A. y Moreno, J. 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 186, 15–24.
- Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A. y Moreno, J. 2014. Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity. *Process Biochemistry* 49, 1958–1969.
- Karimi, H., Ebrahimi, A.A., Jalili, M., Rezvani, M. y Mokhtari, M. 2016. Reduction of Pathogens from Mixture of Cow Manure, Domestic Waste and Wastewater Treatment Plant Sludge by Vermicomposting Process. *Journal of Environmental Health and Sustainable Development* 1, 37-42.
- Larrea-Murrel, J.A., Rojas-Badía, M.M., Romeu-Alvarez, B., Rojas-Hernández, N.M. y Heydrich-Pérez, M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 44, 24-34.
- López-González, J.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M. y Moreno, J. 2013. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 146, 574–584.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M. y Moreno, J. 2015a. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406–416.
- Machuca, J., Agüero, J., Miró, Conejo, M.C., Oteo, J., Bou, G., González-López, J.J., Oliver, A., Navarro, F., Pascual, A. y Martínez-Martínez, L. 2016. Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 35, 485-490.

- McLellan, S.L. y Eren, A.M. 2014. Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in Microbiology* 22, 697-706.
- Moreno, J. y Mormeneo, S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. Compostaje. pp. 111-140. Mundi-prensa, Madrid.
- Moreno, J., López, M.J., Vargas-García, M.C. y Suárez-Estrella, F., 2013. Recent advances in microbial aspects of compost production and use. *Acta Horticulturae (ISHS)* 1013, 443-457.
- Murray, P.R. 1978. Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) system to increase accuracy and reproducibility of the test for biotype characterization of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 8, 46-49.
- Navarro, F., Miró, E. y Mirelis, B. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28, 577-668.
- Navarro-García, F. 2014. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiology Spectrum* 2, 6.
- Negro, M. J., Villa, F., Aibar, J., Aracón, R., Ciria, P., Cristóbal, M. V., Benito, A. de; García Martín, A., García Muriedas, G., Labrador, C., Lacasta Dutoit, C., Lezaún, J. A., Meco, R. Pardo, G., Solano, M.L. Torner, C. y Zaragoza, C. 2000. Producción y gestión del compost, 1-31. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/16792/1/2000%20Compost%20CIEMAT.pdf> Consultado julio 2019.
- Neher, D.A., Weicht, T.R., Bates, S.T., Leff, J.W. y Fierer, N. 2013. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. *PLoS ONE* 8, e79512.
- Nontongana, N., Sibanda, T., Ngwenya, E. y Okoh, A.I. 2014. Prevalence and antibiogram profiling of *Escherichia coli* pathotypes isolated from the Kat River and the Fort Beaufort abstraction water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 8213-8227.
- OMS, 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> Consultado julio 2019.
- OMS, 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Consultado julio 2019.
- OMS, 2018. Resistencia a los antimicrobianos: del compromiso político a la acción nacional <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/antimicrobial-resistance-translating-political-commitment-into-national-action> Consultado julio 2019.
- Peralta, M., Roa, C., Pinés, P.J., Antón, T., Peñalver, D. y Álvarez-Santirso, R. 2006. Tiroiditis aguda causada por *Escherichia coli*. *Endocrinología y Nutrición* 53, 1-77.
- Petric, I., Helic, A. y Avdic, E.A. 2012. Evolution of process parameters and determination of kinetics for co-composting of organic fraction of municipal solid waste with poultry manure. *Bioresource Technology* 117, 107-116.
- Pianetti, A., Sabatini, L., Bruscolini, F., Chiaverini, F. y Cecchetti, G. 2004. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiology & Infection* 132, 231-238.

- Piao, J., Jiang, J., Xu, B., Wang, X., Guan, Y., Wu, W., Liu, L., Zhang, Y., Huang, X., Wang, P., Zhao, J., Kang, X., Jiang, H., Cao, Y., Zheng, Y., Jiang, Y., Li, Y., Yang, Y. y Chen, W. 2012. Simultaneous Detection and Identification of Enteric Viruses by PCR-Mass Assay. *PLoS ONE* 7, e42251.
- Prasanna, K.R.B., Rao, K.S. y Reddy, K.R.N. 2009. Sheath blight disease of *Oryza sativa* and its management by biocontrol and chemical control *in vitro*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 8, 639–646.
- Puerta-García, A. y Materos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. Enfermedades infecciosas (III). Infecciones por anaerobios y enterobacterias. *Medicine* 10, 3403-3473.
- Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Ministerio de la Presidencia. <http://www.boe.es/boe/dias/2005/07/19/pdfs/A25592-25669.pdf> Consultado julio 2019.
- Reynnells, R.E. 2013. Comparison of pathogen detection methods in compost and compost characteristics as potential predictors of pathogen regrowth. Thesis submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland.
- Sánchez-Báscones, M., Correa, A., Pérez-Espinosa, A., Blanco, D., Caballero, F., García-Morales, J.L., Soto, M., García González, M.C., Díez, M.A., Bernal, M.P., Moral, R. y Caballero, T. 2016. Residuos ganaderos I.2. En: Moreno, J., Moral, R., García-Morales, J.L., Pascual, J.A. y Bernal, M.P. De residuo a recurso: El camino hacia la sostenibilidad. Mundi-prensa, Madrid.
- Sánchez San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., López-González, J.A. y Moreno, J. 2018. Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: The role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control* 124, 82–91.
- Sevilla-Sánchez, D., Soy-Muner, D. y Soler-Porcar, N. 2010. Utilidad de los macrólidos como antiinflamatorios en las enfermedades respiratorias. *Archivos de Bronconeumología* 46, 244-254.
- Singh, L., Cariappa, M.P. y Kaur, M. 2016. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Medical Journal Armed Forces India* 72, S59-S61.
- Singh, R., Jiang, X. y Luo, F. 2010. Thermal inactivation of heat-shocked *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in dairy compost. *Journal of Food Protection* 73, 1633-1640.
- Tato-Rodríguez, R., Oteo-Iglesias, J., Álvarez-García, P., Zamora-López, M.J., Martínez-López, J., Pallarés-González, A., Pulián-Morais, M.V., Fernández-Romero, S., Vindel-Hernando, A. y García-Campello, M. 2016. Brote de *Enterobacter cloacae* complex multirresistente productor de CTX-M-9 en una unidad de cuidados intensivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 34, 217-276.
- Vignoli, R. y Seija, V. 2008. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica* 649-662. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf> Consultado julio 2019.
- Vila-Estapé, J. y Zboromyrska, Y. 2012. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterología y Hepatología* 35, 57-108.

- Wei, Y. y Liu, Y. 2005. Effects of sewage sludge compost application on crops and cropland in a 3-year field study. *Chemosphere* 59, 1257-1265.
- Young, B.J., Rizzo, P.F., Riera, N.I., Torre, V.D., López, V.A., Molina, C.D., Fernández, F.E., Crespo, D.C., Barrena, R., Komilis, D. y Sánchez, A. 2016. Development of phytotoxicity indexes and their correlation with ecotoxicological, stability and physicochemical parameters during passive composting of poultry manure. *Waste Management* 54, 101–109.