



Evaluación de la resistencia bacteriana ante antibióticos presentes en el río Mapocho durante la época de invierno

EVALUATION OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS PRESENT IN THE MAPOCHO RIVER DURING THE WINTER SEASON



Estudiantes

María Paz Salazar Casas-Cordero
Luis Angel Ataulluco Vargas
Abel Andrés Eugenio Molina Astudillo
Rafaella Carolina Ríos Briones
Daniela Riveros Rojas
Millaray Andrea Norambuena Tum
Benjamín Ignacio Zepeda Vergara

Profesor guía

Juan Francisco Antonio Pinto Vargas

Asesor científico

Francisco Pablo Chávez Espinosa
Universidad de Chile

Colegio

Ozanam
Yungay 2845, Santiago

- Artículo Recibido: 3 de diciembre, 2021
- Artículo Aceptado: 31 de diciembre, 2021
- Artículo Publicado: 20 de agosto, 2022

El Proyecto participó en

- * Congreso Regional de innovación e investigación Explora RM Norte 2021
- * Expo Ciencias Nacional Chile 2021



Resumen

Los cuerpos de agua han sido uno de los objetos de estudio más frecuentes debido a la creciente intervención antrópica con desechos farmacéuticos, lo que se ha logrado observar en el último tiempo y que afecta gravemente a los ecosistemas involucrados. Para ello, se ha efectuado un estudio en el río Mapocho como sitio de muestreo, lugar donde previamente se ha comprobado la existencia de residuos farmacéuticos, entre ellos compuestos antimicrobianos. Es por esto que se puede inferir que en ciertos puntos con mayores niveles de contaminación podrían existir bacterias resistentes a antibióticos.

Mediante la caracterización y sectorización del cuerpo de agua en estudio, se realizó la toma de muestras, que posteriormente se sometieron a análisis de laboratorio para evaluar la resistencia bacteriana a compuestos antimicrobianos. Al concluir el proceso, los resultados indicaron la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el sector bajo del río, lo que podría estar relacionado con la contaminación por productos de origen farmacológico y ayuda a definir los factores negativos que influyen en la zona debido a la peligrosidad de este tipo de contaminación.

→ Palabras claves

Residuos farmacéuticos; Contaminación; Resistencia bacteriana; Río Mapocho.

Abstract

Water bodies have been among the most frequently studied subjects due to the increasing anthropogenic input of pharmaceutical waste, which has been observed in recent times and severely impacts the ecosystems involved. To address this, a study was conducted using the Mapocho River as a sampling site, a location where the presence of pharmaceutical residues, including antimicrobial compounds, has previously been confirmed. Therefore, it can be inferred that at specific points with higher contamination levels, antibiotic-resistant bacteria may be present.

Through the characterisation and zoning of the water body under study, sampling was carried out, and the collected samples were subsequently subjected to laboratory analysis to evaluate bacterial resistance to antimicrobial compounds. Upon completion of this process, the results indicated the presence of antibiotic-resistant bacteria in the lower sector of the river, which could be related to contamination from pharmaceutical products. This helps identify the negative factors influencing the area due to the hazardous nature of this type of pollution.

→ Keywords

Pharmaceutical residues; Contamination; Bacterial resistance; Mapocho River.

Introducción

En Chile, hay una gran diversidad de cuencas hidrográficas, las cuales han tenido que ser sometidas a estudios y análisis en varias ocasiones, sobre todo durante los últimos años. Este hecho, es la consecuencia de los altos niveles de contaminación que se han presentado, debido a la mayor intervención antrópica en cuerpos de agua. En la Región Metropolitana, donde existen más de siete millones de habitantes, es posible encontrar muchos casos de este tipo. Es por eso, que esta investigación basa su metodología en uno de los ríos con mayor valor patrimonial de la región, como lo es el río Mapocho.

El río Mapocho posee aproximadamente 110 kilómetros de extensión y una cuenca de 1.230 km². Baja desde una altura de 1.159 msnm, desembocando en el río Maipo a una altura de 252 msnm. Conecta 16 comunas pertenecientes a la región, desde el sector oriente al poniente, lo cual, le otorga una mayor biodiversidad y, por consiguiente, un ecosistema de considerable significancia para los habitantes, la cultura y el medioambiente, y que por supuesto, debe ser protegido (Katz et al., 2009).

Este río es un gran aportador de diversos servicios ecosistémicos, tales como el de cumplir su función como efecto enfriador, establecer rutas para transporte no motorizado y mitigar inundaciones (Vásquez, 2016). Sin embargo, desde hace más de un siglo, el río viene presentando complicaciones que perturban tanto sus servicios como su equilibrio ecológico. Algunos daños son reparables a corto o largo plazo, pero otros podrían llegar a ser irreversibles si es que no se

toman medidas al respecto. Algunas intervenciones que se pueden detectar son: el alcantarillado, los microbasurales creados en las cercanías y las construcciones de infraestructura que ocupan su cauce.

Los caudales urbanos no están considerados como fuentes de patógenos cuando no existen puntos contaminantes en este. Sin embargo, los caudales de zonas rurales, que son más propensos a poseer una mayor tasa de contaminación, son potenciales dispersores de contaminantes gracias a la escorrentía (Flores & Hernán, 2016). Además, en los últimos años, se ha visto un fuerte aumento de las intervenciones nombradas anteriormente, lo que da lugar a la posibilidad de que ríos, como el río Mapocho, se conviertan en dispersores de contaminación.

Generalmente, la contaminación farmacéutica en los cursos de agua está dada por mala gestión de residuos de dicho material, o por la llegada de desechos orgánicos con materia farmacéutica. Teniendo así en cuenta los distintos tipos de contaminación e intervención hacia cuerpos de agua de los cuales se tiene registro, hay uno que ha sido de gran interés científico últimamente y que ha estado afectando a ecosistemas a nivel mundial, se habla de la peligrosa contaminación por residuos farmacéuticos.

En un estudio realizado a nivel internacional (Wilkinson et al., 2022), en el que se obtuvieron muestras de 258 ríos de todo el mundo, siendo analizadas con 61 principios activos farmacéuticos (API), se estableció que

al menos en el 25,7% de los sitios de muestreo existen concentraciones superiores a las consideradas seguras para la biota acuática. Estas cifras no son ajenas al contexto chileno, ya que recientemente, se dio a conocer información sobre la contaminación farmacéutica en el río Mapocho, y a partir de esto, se genera un escenario alarmante, ya que se evidencia la presencia de antibióticos en el cauce del río.

La exposición medioambiental a los antibióticos es una problemática con daño a largo plazo, tanto para la salud humana como para el bienestar del ecosistema. Es así, como este tipo de contaminación, genera lentamente, un aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos, lo cual, en un futuro no muy lejano, traerá consecuencias mayores para las metodologías médicas en el ámbito farmacéutico (Frieri et al., 2017).

Pregunta de Investigación

¿Es posible observar diferencias en el perfil de resistencia a antibióticos de las comunidades bacterianas en distintas secciones del río Mapocho en el invierno del 2022?

Hipótesis

Basándonos en los puntos de muestreo y en sus diferentes características espaciales, existe un cambio en la resistencia a antibióticos en las comunidades bacterianas.

Objetivo general

Evaluar la resistencia de las comunidades bacterianas presentes en distintas secciones del Río Mapocho.

Objetivos específicos

- Designar puntos de muestreo según su caracterización espacial.
- Analizar las comunidades bacterianas presentes en las muestras.
- Exponer las comunidades bacterianas a antibióticos.
- Interpretar una relación entre los puntos geográficos y la resistencia a antibióticos de las comunidades.

Metodología

La investigación se llevó a cabo en Santiago, Región Metropolitana de Chile, Río Mapocho, clima mediterráneo con estaciones bien marcadas.

A. Revisión bibliográfica:

Para entender cómo los desechos farmacéuticos vertidos en el río Mapocho podrían afectar la resistencia a antibióticos de las comunidades de bacterias, se realizó una revisión bibliográfica sobre ¿Cómo estas comunidades logran adquirir dicha resistencia?, ¿De qué forma esto presenta una problemática a nivel salud?

Motores de búsqueda

- Google Académico
- Scielo

Palabras clave

- Contaminación río Mapocho
- Contaminación farmacéutica + río Mapocho
- Río Mapocho + desechos farmacéuticos
- Resistencia a antibióticos
- Resistencia a antibióticos + desechos farmacéuticos

B. Tomas de muestras

En la selección de los puntos de muestreo, con el fin de tener muestras más representativas de las comunidades bacterianas presentes en el río Mapocho, se eligieron diferentes tramos de éste. Una muestra río arriba (M3), en las aproximaciones del sector urbano central, una en un punto medio del río, en pleno territorio céntrico (M1) y otra río abajo, hacia una zona más periférica (M2).

- Punto 1 (M1): 33°25'38.13"S 70°40'12.20"W
- Punto 2 (M2): 33°29'57.97"S 70°49'13.69"W
- Punto 3 (M3): 33°22'32.78"S 70°31'53.65"W

Esto se puede observar en la imagen 1.

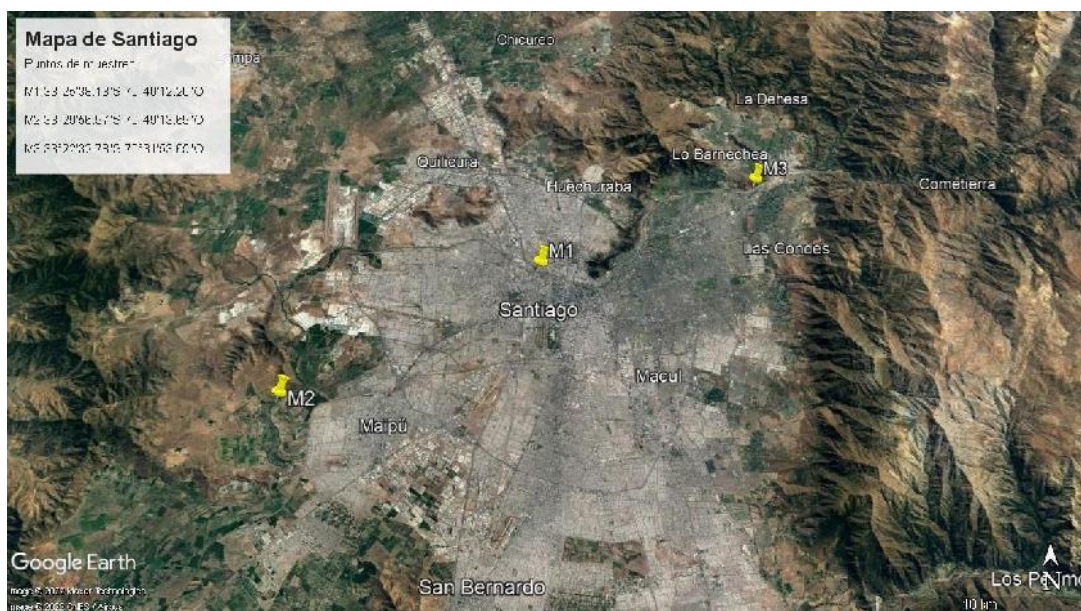


Figura N° 1. Mapa de Santiago en el cual se destacan los puntos de muestreo definidos para la investigación)

Para la toma de muestras se utilizaron los siguientes implementos:

Tubos Falcon

- Guantes de latex
- Cooler
- Ice Stop-Pack
- Vehículo
- GPS
- Software Google Earth

C. Análisis de datos

Se asistió al laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el objetivo de cultivar las comunidades bacterianas presentes en las muestras y analizar su resistencia a antibióticos.

Por cada muestra se cultivaron en las siguientes condiciones que aparecen en la tabla 1.

Antibióticos	Concentraciones	M1	M2	M3	Dilución
LB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-4
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-5
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-6
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	Directa
Colistina (5 µL/ml)	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	
	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	
Ampicilina (100 µL/ml)	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	
CHROMagar	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	

En un segundo análisis, se seleccionaron las placas con mayor cantidad de colonias en presencia de antibióticos.

Se realizaron rayados en dos nuevas placas. Se colocaron 8 colonias de las previamente seleccionadas de las placas mencionadas, las cuales fueron expuestas nuevamente a los antibióticos Colistina y Ampicilina.

Posterior a eso, se efectuó una prueba de caracterización, en la que se sometieron 3 de las 8 colonias bacterianas a un Agar MacConkey.

Para el procedimiento experimental se ocuparon los siguientes implementos:

Implementos de laboratorio

- 5 mecheros
- 47 placas de cultivo
- 6 rastrillos bacteriológicos
- Agar agar
- Agar Macconkey
- Horno de cultivo
- 6 placas con Ampicilina a una concentración de 5 uL/mL
- 12 placas con Colistina a una concentración de 100 uL/mL

Resultados y Discusión

En el primer cultivo de bacterias, se pudo observar el crecimiento de colonias en los medios LB y Colistina, únicamente en las placas correspondientes a la muestra M2.

Medios	Concentraciones	M1	M2	M3		Dilución
LB						
N°1	100uL	NO	NO	NO		-4
N°2	100uL	NO	NO	NO		-5
N°3	100uL	NO	NO	NO		-6
N°4	100uL	NO	SI	NO		Directa
COLISTINA						
N°1	25uL	NO	NO	NO		
N°2	100uL	NO	SI	NO		
N°3	100uL	NO	SI	NO		
N°4	200uL	NO	SI	NO		
AMPICILINA						
N°1	25uL	NO	NO	NO		
N°2	100uL	NO	NO	NO		
CHROMAGAR						
N°1	25uL	NO	SI	NO		
N°2	100uL	NO	SI	NO		

Tabla 2. Se indica individualmente si existió crecimiento en las placas del primer cultivo de bacterias

En la tabla 3 se muestran los resultados del cultivo de las colonias extraídas de la placa Petri con el medio LB con Colistina que se observa en el anexo 18. Se puede determinar el crecimiento de cada colonia con su respectivo medio sólido selectivo, donde sólo en el medio Ampicilina se presenta un crecimiento en las colonias 1, 2, 3, y 4 a diferencia de los otros medios, donde sí crecieron las colonias en su totalidad como se pueden observar en las imágenes 2 3, 4.y 5.



Imagen 2 crecimiento en medio LB. Cultivo de las 8 colonias extraídas de la placa N°3 del medio LB con Colistina



Imagen 3 placas con Colistina. Cultivo de las 8 colonias extraídas de la placa N°3 del medio LB con Colistina



Imagen 4 placas con chromagar. Cultivo de las 8 colonias extraídas de la placa N°3 del medio LB con Colistina

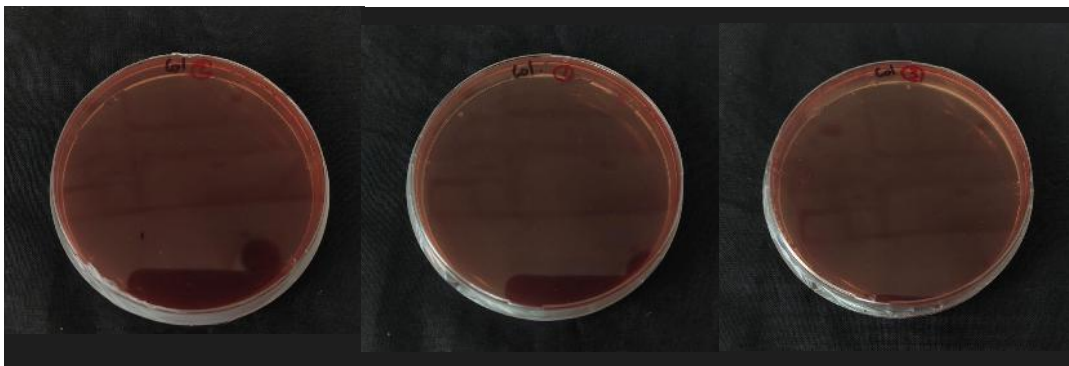


Imagen 5 placas con Ampicilina. Cultivo de las 8 colonias extraídas de la placa N°3 del medio LB con Colistina

En los cultivos del medio Agar MacConkey con Colistina, al ser un medio selectivo de bacterias gram-, no se pudo apreciar crecimiento de colonias, como se observa en la imagen 6.

Medios	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5	Colonia 6	Colonia 7	Colonia 8
Muestra LB	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
COLISTINA	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
CHROMAGAR	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
AMPICILINA	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO

Tabla 3. Se indica individualmente si existió crecimiento en las placas del segundo cultivo de bacterias correspondiente a las 8 colonias extraídas de la placa N°3 del medio LB con Colistina



Imágenes 6 de cultivos en Agar MacConkey, colonias 1,2 y 3

Análisis y Discusión

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos, como también puede estar de manera natural en la bacteria o incluso, ser transferida entre estos microorganismos (OMS, 2020). En Chile, el uso de medicamentos es de alta demanda, según la encuesta nacional de medicamentos del año 2017, arrojó que un 58% de los/as chilenos/as consume al menos un medicamento al día (Minsal et al., 2017). Es por estos factores, que los medicamentos usados en este estudio se seleccionaron en consideración de que son bastante utilizados en la medicina chilena, sin embargo queda una incógnita en si realmente existen altas concentraciones de estos antibióticos en el río Mapocho, lo cual se planea averiguar en las proyecciones de esta investigación.

Según lo que se observa en la tabla 2 en las muestras M2 fueron las únicas en donde se obtuvo proliferación bacteriana, Según lo anterior, se puede interpretar que los resultados obtenidos para M2 se deben al lugar en el cual esa muestra fue tomada, ya que en ese punto el río Mapocho intercepta con el zanjón de la Aguada, correspondiendo así a un canal con alta densidad de materia orgánica particulada en suspensión (Medina, 2017), otorgando un medio propicio tanto para el crecimiento como presencia de comunidades bacterianas. Por ello en futuras investigaciones se buscará crear un plan actualizado de los puntos de muestreo en donde se intensifique el muestreo en dicha zona y determinar las causantes de esta resistencia bacteriana ante antibióticos hallada en este estudio.

Con respecto al medio con ampicilina, no hubo crecimiento bacteriano para M2, tal cual como se aprecia en la tabla 2 y en los anexos 14-15. Por lo anterior, es

que se realizó un segundo cultivo para ampicilina con muestras extraídas de las bacterias que proliferaron en el medio de colistina. Como se aprecia en la tabla 3, hubo un crecimiento de bacterias en el medio con ampicilina (imagen 5). La ampicilina es un antibiótico de amplio espectro del grupo betalactámicos, lo que quiere decir que actúa tanto en bacterias gram positivas como en bacterias gram negativas. Su mecanismo de acción radica en inhibir la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona en último término, la lisis de la bacteria y su muerte (ANMAT, 2010). Al observar crecimiento bacteriano en este medio, podemos interpretar a grandes rasgos, que existen bacterias resistentes a este antibiótico y que podrían también serlo para todo el grupo, pero esto último se agrega a las proyecciones para continuar con el proyecto investigativo (betalactámicos).

En cuanto al crecimiento de bacterias en el medio de colistina, se realizó un cultivo en agar MacConkey, el cual se caracteriza por ser un medio selectivo y diferencial que se utiliza para el aislamiento y la diferenciación de bacilos gramnegativos. No se obtuvo crecimiento bacteriano en esta prueba, por lo cual, podemos inferir que las bacterias que se encontraron corresponden a gram positivas, y la colistina, que es un antibiótico del grupo de las polimixinas (fármacos utilizados para eliminar bacterias gram negativas multirresistentes) (Medina, J. 2017), demostró tener una gran efectividad en el contexto dado. Por lo cual, al no atacar bacterias gram positivas, era de esperar que se obtuviera un crecimiento de estas en un cultivo con presencia de colistina, como se aprecia en la tabla 3 y en la imagen 6.

Conclusión

En base a los datos obtenidos, en el río Mapocho sí existen bacterias resistentes a antibióticos, precisamente a Ampicilina y Colistina. Esto no significa que todas las bacterias han obtenido resistencia, sin embargo, al no tomar medidas para detener este proceso, se puede decir que la resistencia a antibióticos es un peligro inminente para las comunidades que habitan en las cercanías del río.

Los resultados del estudio permiten determinar que las bacterias presentes en las muestras expuestas a antibióticos se caracterizan como bacterias gram positivas.

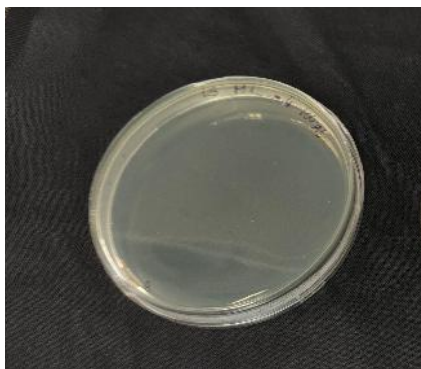
Además, de acuerdo con la sectorización del cauce establecida inicialmente, se puede confirmar la relación entre la resistencia bacteriana y el punto geográfico de la respectiva muestra.

Con esto, también se puede determinar una reflexión sobre la automedicación y la negligencia médica, ya que como se mencionó inicialmente, gran parte de los fármacos depositados en el río Mapocho o en diversos cuerpos de agua, llegan a través de desechos orgánicos como heces y orinas de los consumidores de medicamentos. Entonces, con un mayor consumo de antibióticos se está alentando a la resistencia bacteriana ante los antibióticos, lo cual a su vez, es un peligro para la salud pública, puesto a que los medicamentos como los antibióticos son los grandes mecanismos de defensa ante enfermedades. Aparte, es necesario pensar en el ecosistema que se ve perjudicado por la llegada de agentes externos como los fármacos.

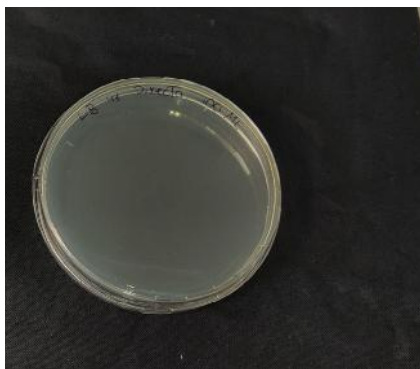
Con esto y futuras investigaciones respecto al tema, se quiere proponer a la sociedad buscar soluciones ciudadanas que solucionen estos problemas que se tienen en la actualidad y que si no se toma ninguna acción al respecto las consecuencias serán más grandes y preocupantes en un futuro.

- ANMAT. (2010). Ampicilina. VADEMECUM <https://iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>
- Aryal, S., (2022). MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology. Microbiology Info.com. <https://microbiologyinfo.com/macconkey-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>
- Flores, V., & Hernán, J. (2016). Resistencia a los antibióticos en cepas de Salmonella spp. aisladas desde cauces de agua de la Región Metropolitana y su asociación con el área geográfica. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/140686>
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. Journal of Infection and Public Health, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- OMS. (2020). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Katz, C., Reid, P., & Andrade, M. (2009). Tres visiones sobre el río Mapocho. ARQ (Santiago. Impresa), 72, 56–59. <https://doi.org/10.4067/s0717-69962009000200011>
- Medina, J. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. Revista Médica del Uruguay. Rev. Méd. Urug. vol.33 no.3 Montevideo set. 2017
- Minsal. (2017). INFORME ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017; Uso de medicamentos.
- Vásquez, A. E. (2016). Infraestructura verde, servicios ecosistémicos y sus aportes para enfrentar el cambio climático en ciudades: el caso del corredor ribereño del río Mapocho en Santiago de Chile. Revista de Geografía Norte Grande, 63, 63–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-34022016000100005>
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

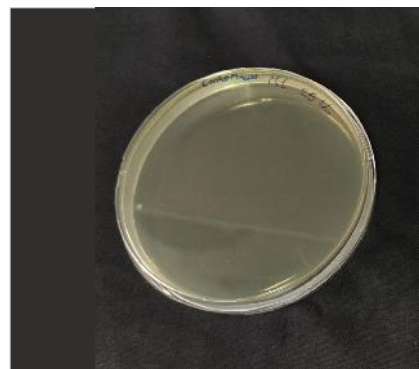
Anexos



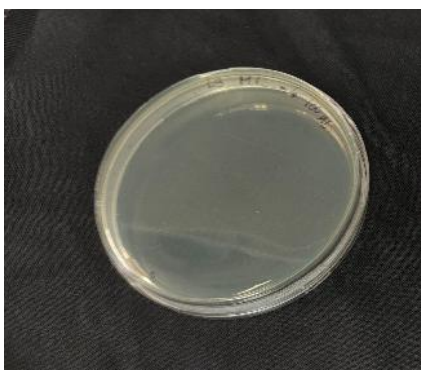
Anexo 1. Muestra de M1 con dilución 10^{-4} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 4. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 7. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo Chromagar (25 mL)



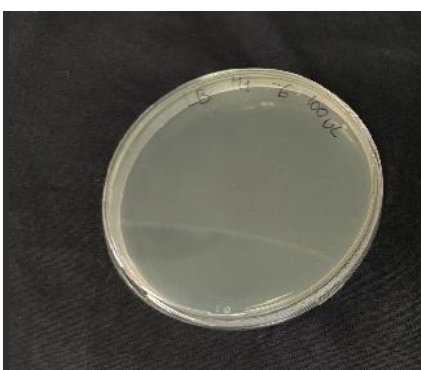
Anexo 2. Muestra de M1 con dilución 10^{-5} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 5. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (25 mL)



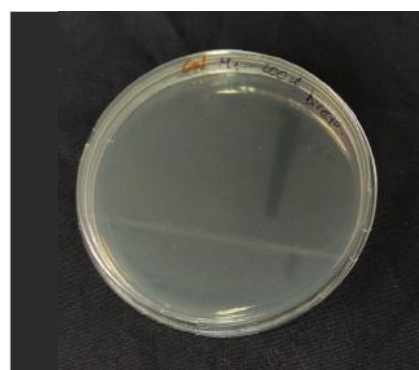
Anexo 8. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo Chromagar (100 mL)



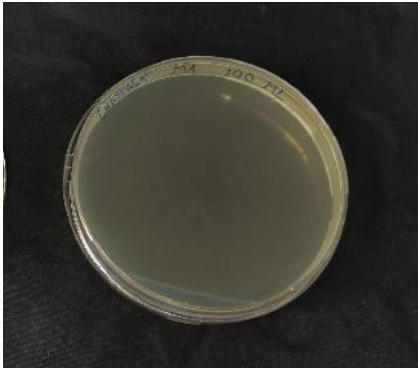
Anexo 3. Muestra de M1 con dilución 10^{-6} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 6. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (100 mL)



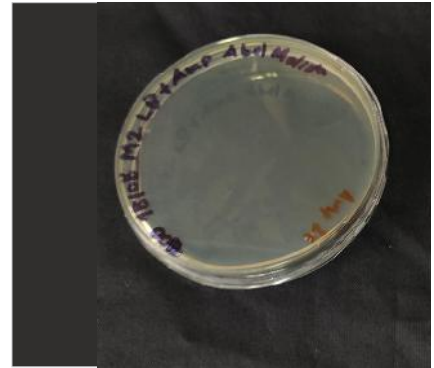
Anexo 9. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo LB+Colistina (200 mL)



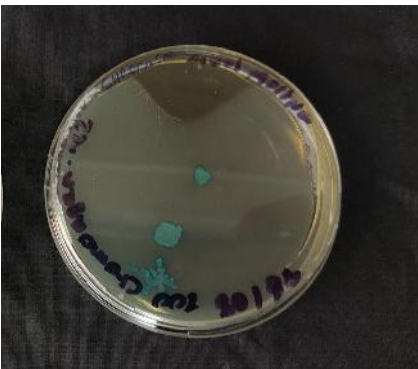
Anexo 10. Muestra de M1 directa en placa con medio de cultivo Chromagar (100 mL)



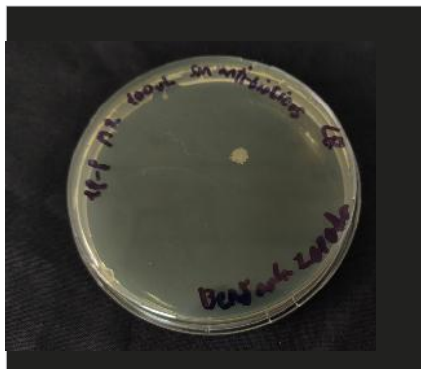
Anexo 13. Muestra de M2 con dilución 10^{-6} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 16. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (100 mL)



Anexo 11. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo Chromagar (100 mL)



Anexo 14. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 17. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (25 mL)



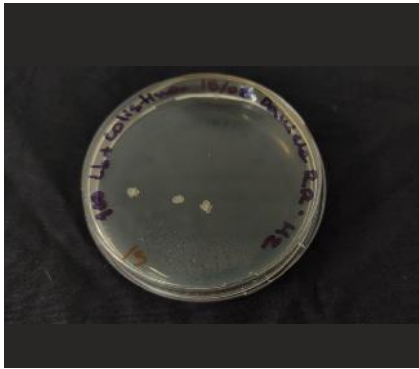
Anexo 12. Muestra de M2 con dilución 10^{-5} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 15. Muestra de M2 con dilución 10^{-4} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 18. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB+Colistina (200 mL)



Anexo 19. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB+Colistina (100 mL)



Anexo 22. Muestra de M3 con dilución 10^{-6} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



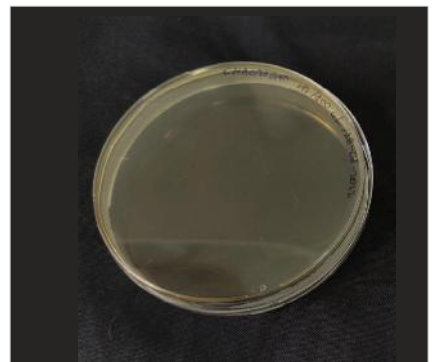
Anexo 25. Muestra de M3 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (100 mL)



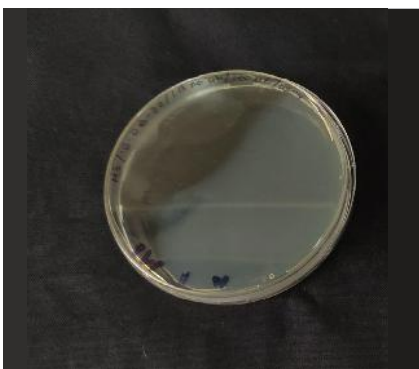
Anexo 20. Muestra de M2 directa en placa con medio de cultivo LB+Colistina (25 mL)



Anexo 23. Muestra de M3 directa en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 26. Muestra de M3 directa en placa con medio de cultivo Chromagar (100 mL)



Anexo 21. Muestra de M3 con dilución 10^{-4} en placa con medio de cultivo LB (100 mL)



Anexo 24. Muestra de M3 directa en placa con medio de cultivo LB+Ampicilina (25 mL)



Anexo 27. Muestra de M3 directa en placa con medio de cultivo LB+Colistina (100 mL)