



# **ESPE**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACILOS GRAM POSITIVOS  
AISLADOS DE MUESTRAS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS, EN  
LA COOPERATIVA DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA “EL  
SALINERITO”, PROVINCIA BOLÍVAR-ECUADOR”**

**AUTORA: NAVARRETE GARCÍA, KATHERINE VANESSA**

**DIRECTORA: Mgs. KOCH KAISER, ALMA ROSEL**

**SANGOLQUÍ**

**2019**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación ***“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACILOS GRAM POSITIVOS AISLADOS DE MUESTRAS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS, EN LA COOPERATIVA DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA “EL SALINERITO”, PROVINCIA BOLÍVAR-ECUADOR”*** realizado por la señorita ***Navarrete García, Katherine Vanessa***, ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de similitud de contenido; el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 junio de 2019

*Alma Rosel Koch Kaiser*

Mgs. Alma Rosel Koch Kaiser

C.I.:.....*1708880792*.....



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, *Navarrete García, Katherine Vanessa*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Identificación molecular de bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria "El Salinerito", provincia Bolívar-Ecuador*, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

**Sangolquí, 20 junio de 2019**

---

**Katherine Vanessa Navarrete García**  
C.C. 1722418892



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### AUTORIZACIÓN

Yo, *Navarrete García, Katherine Vanessa*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *“Identificación molecular de bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar-Ecuador”*, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 20 de Junio de 2019

---

**Katherine Vanessa Navarrete García**  
C.C. 1722418892

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico principalmente a mi madre y mi padre, por haber sido el mejor ejemplo de lucha y superación, que supieron guiar mi camino a lo largo de mi vida, por todo el amor, la paciencia, los consejos y dedicación que me han brindado, especialmente por todo el apoyo que me han manifestado durante esta importante etapa de mi vida.

A mi amado Juan Francisco, por unir su camino con el mío y desde entonces estar junto a mí en cada momento, por ser mi fortaleza y motivación, por su paciencia, su esfuerzo, su dedicación como padre y pareja, por luchar junto a mí por alcanzar cada meta y sobre todo por brindarme su amor sin condiciones.

A mi hijo Francisco Rafael, mi más preciado tesoro, quien ha hecho que cada logro sea más gratificante, que con su ternura y chiquilladas me ha llenado de paciencia, inspiración y coraje para cada día luchar por lograr esta meta por él y para él.

A mis hermanos, Jesús y Luis por ser mis cómplices en cada travesura, por cuidarme y protegerme a pesar de ser menores, con este trabajo quiero inspirar el camino que aún les queda por recorrer.

A mis abuelos, que con su amor y consentimiento han sido elementos esenciales de mi formación personal y mi objetivo es volverlos orgullosos.

A mi tía Estela, que ha sido mi segunda madre, por compartir conmigo cada alegría y tropiezo en mi vida, apoyándome y aconsejándome.

**Katherine Vanessa**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero agradezco a mis padres, a Juan Francisco, a mis Hermanos y toda mi Familia por apoyarme en este proceso y luchar conmigo cada día para lograr este objetivo.

Gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por brindarme un espacio donde pude educarme y lograr ser profesional en Ingeniería en Biotecnología y por permitir el desarrollo de este proyecto en los laboratorios de sus instalaciones. Gracias al grupo de Investigación en sanidad animal por confiar en mí para la realización de este trabajo.

Agradezco a mi Directora del proyecto, la Mgs. Alma Koch, por compartir conmigo su conocimiento, soporte, su amistad y por sus consejos para aplicar dentro y fuera del área de trabajo. A la Doctora María Augusta Chávez por brindarme su apoyo y asesoría durante el desarrollo de este proyecto y al Doctor Jorge Ron director del proyecto de vinculación, por su paciencia y confianza.

A Cristian Andrade y Alex Sánchez, por compartir conmigo su trabajo y por brindarme las muestras y datos necesarios para la realización de este proyecto. A Alicia Maya, por apoyarme desde Bélgica con la secuenciación de las muestras de ADN que fueron claves en la culminación del trabajo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio de microbiología y del laboratorio de biotecnología animal por compartir conmigo muchos momentos durante realización del proyecto. Agradezco especialmente a la Ingeniera Cristina Cholota, por compartir conmigo cada etapa de este trabajo, con sacrificio y paciencia y por brindarme su conocimiento y ayuda.

Agradezco también a mis buenos amigos, Carly, Valeria y Luis, por tantas risas, a Wendy, Vanessa, por tantas aventuras, a Jessy y Susy por su apoyo, todos ustedes hicieron que esta etapa de universitaria sea única, gracias por compartir conmigo momentos inolvidables que ahora son parte de mí para siempre.

**Katherine Vanessa**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CARTA DE CERTIFICACIÓN</b> .....	i
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD</b> .....	ii
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1. Formulación del problema.....	17
1.2. Justificación del problema.....	18
1.3. Objetivos .....	21
1.3.1. Objetivo general .....	21
1.3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 Género <i>Bacillus</i> .....	22
2.1.1 Características generales .....	22
2.1.1.1 Cultivo y crecimiento .....	23
2.2 Mastitis.....	24
2.2.1 Tipos de mastitis.....	25
2.2.2 Tratamiento, control y prevención .....	25
2.2.3 Etiología de mastitis .....	26



2.2.3.1	Mastitis bacteriana.....	27
2.3	Técnicas moleculares de identificación.....	28
2.3.1	Técnicas basadas en ADN.....	28
2.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
2.3.3	Secuenciación Sanger.....	31
2.3.4	Análisis filogenético.....	32
2.4.	Hipótesis.....	33
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>34</b>
3.1	Zona de estudio .....	34
3.2	Procedimientos .....	34
3.2.1	Recepción y conservación de muestras.....	34
3.2.	Identificación de los cultivos mediante tinción Gram.....	35
3.2.3	Purificación de cepas aisladas .....	36
3.2.3.1	Condiciones óptimas del cultivo .....	37
3.2.4	Estandarización de un método para la extracción de ADN.....	37
3.2.4.1	Extracción manual de ADN bacteriano utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-alcohol isoamílico (CTAB/CAI) .....	38
3.2.4.2	Extracción de ADN utilizando Kit .....	39
3.2.4.3	Cuantificación de ADN e Integridad.....	40
3.2.5	Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). .....	40
3.2.5.1	Análisis mediante electroforesis.....	41
3.2.6	Secuenciación.....	42
3.2.6.1	Evaluación de similitud y homología.....	42
3.2.7	Análisis de filogenia.....	42
3.2.8	Análisis estadístico .....	43
<b>CAPÍTULO IV</b>		
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>44</b>
4.1	Tinción Gram .....	44
4.2	Aislamiento de cultivos mixtos .....	45
4.2.1	Establecimiento de condiciones óptimas de cultivo.....	46
4.2.1.1	Temperatura.....	46

4.2.1.2 Medio de cultivo y tiempo de incubación .....	46
4.3 Estandarización del método de extracción de ADN.....	47
4.3.1 Determinación de la composición del buffer de lisis .....	48
4.3.2 Incubación con RNAsa.....	49
4.3.3 Determinación del mejor método de extracción de ADN de Bacilos Gram positivos....	50
4.4 Reacción en cadena de polimerasa .....	52
4.5 Análisis de similitud y homología.....	53
4.6 Análisis de filogenia.....	55
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	<i>Definición de los tipos de mastitis en función de la severidad de los síntomas</i> .....	25
<b>Tabla 2</b>	<i>Descripción de los principales microorganismos patógenos de mastitis</i> .....	28
<b>Tabla 3</b>	<i>Coordenadas geográficas del origen de las muestras</i> .....	34
<b>Tabla 4</b>	<i>Componentes del Buffer de extracción</i> .....	39
<b>Tabla 5</b>	<i>Primers para el gen 16S</i> .....	40
<b>Tabla 6</b>	<i>Condiciones de reacción para PCR para el gen 16S de bacilos Gram positivos</i> .....	41
<b>Tabla 7</b>	<i>Condiciones de ciclo para PCR del gen 16S</i> .....	41
<b>Tabla 8</b>	<i>Evaluación de temperatura óptima</i> .....	46
<b>Tabla 9</b>	<i>Evaluación de medios de Cultivo a 24 horas</i> .....	47
<b>Tabla 10</b>	<i>Evaluación de medios de cultivo a 48 horas</i> .....	47
<b>Tabla 11</b>	<i>Identificación mediante alineamiento en BLAST a partir de secuencias del gen 16S</i> ..	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> a) Morfología de una célula vegetativa y b) estructura de la sección transversal de una espora cilíndrica de <i>Bacillus subtilis</i> (0.55-2µm). .....	22
<b>Figura 2</b> Curva de crecimiento bacteriano indicando las fases de crecimiento. ....	24
<b>Figura 3</b> Estructura del pezón y mecanismo de invasión bacteriana durante mastitis .....	27
<b>Figura 4</b> Esquema de la amplificación de ADN por PCR.....	31
<b>Figura 5</b> Esquema de la secuenciación Sanger Fuente: (Estevez, 2012) .....	32
<b>Figura 6</b> Estriado por agotamiento .....	36
<b>Figura 7</b> Bacilos Identificados mediante tinción Gram observados al microscopio óptico con aumento 100X. a) Bacilos Gram positivos b) Esporas y bacilos Gram positivos .....	44
<b>Figura 8</b> Cultivo Mixto (Esporas y cocos Gram positivos) identificado mediante tinción Gram observado al microscopio óptico con aumento 100X. ....	45
<b>Figura 9</b> Cultivo puro de bacilos Gram positivos .....	45
<b>Figura 10</b> Comparación de concentración de ADN en estandarización del buffer de lisis.....	48
<b>Figura 11</b> Comparación de pureza de ADN en estandarización del buffer de lisis .....	48
<b>Figura 12</b> Comparación de concentración de ADN para tipo de incubación con RNAsa .....	49
<b>Figura 13</b> Comparación de pureza de ADN para tipo de incubación con RNAsa .....	49
<b>Figura 14</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Análisis de integridad para tipo de incubación con RNAsa, donde M1 es la muestra 2ASCM, M2 es 3 ASCM, M3 es 4SARFCM, M4 es 7SARFB, M5 es 11SARF, M6 es 26EMB y M7 es 29AS. ....	50
<b>Figura 15</b> Comparación de concentración de ADN entre los métodos de extracción CTAB/CAI y KIT .....	51
<b>Figura 16</b> Comparación de Radios de pureza entre los métodos de extracción CTAB/CAI y KIT. a) Pureza respecto a proteínas y RNA, radio 260/280 b) Pureza química, radio 260/230 .....	51
<b>Figura 17</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Análisis de Integridad de ADN para los métodos de extracción A) Método de extracción CTAB/CAI, B) Método de extracción por KIT.....	52
<b>Figura 18</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Gradiente de Temperatura de hibridación óptima para los primers 27F y 1492R. Dónde CN es control negativo, CM control muerto, CP control positivo. ....	53

- Figura 19** Diagrama de pastel del porcentaje de muestras encontradas en cada especie .....55
- Figura 20** Árbol filogenético en base a 18 secuencias de nucleótidos del gen 16S de bacilos Gram positivos utilizando el método de máxima verosimilitud. Enraizado con *E. coli* como grupo externo. .... 56

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A</b> <i>Resistencia y susceptibilidad in vitro de bacterias asociadas a mastitis en Salinas de Guaranda</i> .....	77
<b>Anexo B</b> Comparación de resultados tinción Gram.....	78
<b>Anexo C</b> Análisis T de student para datos no apareados .....	81

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AND</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CAI (24:1)</b>	Cloroformo:Alcohol isoamilico (24:1)
<b>16S</b>	Gen 16S, rRNA
<b>Tm</b>	Temperatura de fusión de primer
<b>Ta</b>	Temperatura de hibridacion de primers
<b>Bp</b>	Pares de bases
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilandiaminotetracético
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>BLAST</b>	Basic local alignment search tool
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>MM</b>	Marcador de peso molecular
<b>MSA</b>	Manitol salt agar
<b>BHI</b>	Brain heart infusion

## RESUMEN

La mastitis bovina es una inflamación de las glándulas y conductos mamarios que altera el rendimiento de leche. La enfermedad es provocada principalmente por bacterias, entre las que se encuentran los bacilos Gram positivos que se encuentran típicamente en suelo, agua, polvo, aire, heces y vegetación. En la parroquia de Salinas de Guaranda, las principales actividades económicas incluyen la elaboración de productos derivados de la leche. Se ha determinado el 84.5% de prevalencia de mastitis por animal; sin embargo, no existe registro de las especies de bacilos Gram positivos asociados. Se busca identificar mediante técnicas moleculares bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de ganado bovino con mastitis a fin de aportar información sobre la diversidad de microorganismos asociados, para establecer programas de prevención y control. En esta investigación, se estandarizó y validó un método manual de extracción de ADN con el uso de CTAB/CAI a partir de bacilos Gram positivos aislados de leche de vacas con mastitis. Se obtuvieron las secuencias partiendo de los productos de PCR convencional del gen 16S. El análisis de homología en BLAST de once muestras determinó la presencia de tres especies: *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus subtilis* (36%), *Bacillus velezensis* (9%). Con estos resultados se realizó un análisis filogenético para demostrar la cercanía evolutiva entre las especies encontradas. Con este trabajo se demostró que las bacterias que afectan al ganado lechero en la parroquia Salinas de Guaranda son ambientales, por lo que se debe mejorar las prácticas de ordeño.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **MASTITIS BOVINA**
- **BACILOS GRAM POSITIVOS**
- **GEN 16S**
- **ÁRBOL FILOGENÉTICO**



## ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammation of the mammary glands and ducts that reduce milk yield. This disease is caused mainly by bacteria, like Gram-positive bacilli, which are typical in soil, water, dust, air, feces and vegetation. In Salinas de Guaranda, the main economic activities include the elaboration of milk products. The 84.5% prevalence of mastitis per animal was determined; however, there is no record of the associated Gram-positive bacilli species. The aim of this study is to identify Gram positive bacilli isolated from milk samples of cattle with mastitis using molecular techniques in order to provide information on the diversity of associated microorganisms, to establish prevention and control programs. In this research, a manual method of DNA extraction with the use of CTAB / CAI was standardized and validated from Gram positive bacilli isolated from the milk of cows with mastitis. The sequences were obtained starting from the conventional PCR products of the 16S gene. The BLAST homology analysis of eleven samples determined the presence of 3 species: *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus subtilis* (36%), *Bacillus velezensis* (9%). With these results, a phylogenetic analysis was carried out to demonstrate the evolutionary proximity between the species found. This work showed that bacteria that affect dairy cattle in Salinas de Guaranda are environmental, for this is important to improve milking practices.

### KEY WORDS:

- **BOVINE MASTITIS**
- **GRAM POSITIVE BACILLI**
- **16S GENE**
- **PHYLOGENETIC TREE**

# CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

## 1.1. Formulación del problema

A nivel mundial, el alto consumo de leche representa un reto para la industria láctea, especialmente en Ecuador donde las prácticas de manejo y ordeño carecen de controles sanitarios rigurosos (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). En Ecuador, la compra de leche representa el 8% del consumo de alimentos familiares mensuales (Lituma, 2011). El principal desafío que enfrenta la industria lechera es la mastitis, que representa grandes pérdidas económicas al alterar las características organolépticas de la leche y su composición (Wellenberg, Van der Poel, & Van Oirschot, 2002; Rabello, y otros, 2005).

La mastitis bovina es una inflamación de las glándulas y conductos mamarios y provoca una reducción en el rendimiento de leche, genera aumento del número de tratamientos clínicos y puede implicar el desecho temprano de animales (Bedolla & Ponce de León, 2008). Se ha encontrado que en Ecuador la mayoría de agentes causales de mastitis son ambientales, principalmente bacterias que son introducidas debido a las prácticas de campo por parte de veterinarios, cuidadores y propietarios de fincas (Amer S. , 2015).

Gracias al alcance del proyecto de vinculación “Mejoramiento de la calidad de leche en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar, a través del diagnóstico de enfermedades zoonóticas y parasitarias en bovinos, y la implementación de buenas prácticas de manejo y sanidad animal, y manufactura de productos”, se han desarrollado investigaciones con el fin de evidenciar las condiciones productivas del sector y mejorarlas. Se ha

llegado a determinar que la prevalencia de mastitis por animal en la Cooperativa es de 84,5%, evidenciando su impacto en la producción de leche y en los consumidores (Andrade & Sánchez, 2018). Los estudios de identificación microbiana generalmente se basan en métodos bioquímicos tradicionales que han permitido llegar a determinar agentes causales; sin embargo, la identificación debe ser respaldada por métodos moleculares (Preethirani, y otros, 2015). En Ecuador se han realizado pocos estudios a nivel molecular acerca de la diversidad microbiana causante de mastitis (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). En la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar, no se han registrado datos al respecto. Este trabajo permitirá proporcionar una base de datos sólida y bien fundamentada para la realización de estudios posteriores, para implementar buenas prácticas de ordeño, establecer planes de control y manejo del ganado lechero con el fin de prevenir la enfermedad mejorando así la calidad de los productos lácteos.

## **1.2. Justificación del problema**

La producción y consumo de leche a nivel mundial han crecido a una tasa promedio anual de 1,9% a partir de 2006, llegando a su producción máxima histórico de 597 millones de toneladas en 2016 (USDA, 2018). Ecuador en 2018 alcanzó una producción de 5 022 056 litros de leche (INEC, 2018). En la región Sierra se encuentra el 90% de las principales industrias lácteas con un 76,5% de la producción nacional de productos como: leche pasteurizada, quesos y crema de leche (Contero, 2008).

En la parroquia de Salinas de Guaranda, las actividades económicas incluyen la elaboración de productos lácteos, confitería, embutidos y textiles; principalmente la producción y distribución de quesos (Balarezo & Poveda, 2018). Por lo que es importante mejorar la calidad y sabor de los productos lácteos al optimizar los controles sanitarios de los proveedores de leche (Andrade &

Sánchez, 2018). Se ha determinado como el principal problema de los pequeños, medianos y grandes productores en la zona a la mastitis, por lo que se debe mejorar factores como las buenas prácticas de ordeño, manejo y control de la enfermedad y brindar asesoramiento técnico (Balarezo & Poveda, 2018). La mastitis en la parroquia Salinas de Guaranda ha generado una pérdida promedio de 6,47 litros de leche por día y por vaca (Andrade & Sánchez, 2018).

La mastitis es considerada una de las enfermedades más importantes que afectan a la industria láctea, porque puede alterar la producción, el sabor y la apariencia de la leche (Booth, 1981). En Ecuador se ha encontrado que la incidencia de mastitis bordea el 80% (Amer, Aguilar, & Maza, 2015), evidenciando su gravedad. El impacto se da por la disminución en la producción y deterioro en la calidad de leche, también porque la inflamación puede llegar a provocar el sacrificio del animal (Chagunda, Friggens, Rasmussen, & Larsen, 2006). El 26,5% de las vacas lecheras sacrificadas en el continente americano son debidas a trastornos causados por la mastitis (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002); por lo que esta afección debe ser investigada a fondo con el fin de evitar pérdidas económicas en el sector pecuario.

La etiología de la mastitis muestra notables variaciones entre países, regiones, o incluso entre granjas y rebaños, por lo que es fundamental identificar los microorganismos relacionados antes de considerar un control de la enfermedad (Preethirani, y otros, 2015). Son muchos los factores que pueden causar mastitis, el principal es la presencia de microorganismos patógenos (Andrade, y otros, 2017). En la actualidad, el tratamiento consiste en el uso de antibióticos, generando resistencia por parte de los microorganismos o quedar residuos químicos en la leche (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). Por esto, la identificación de los agentes causales de la mastitis podría contribuir con la mejora de la calidad de los productos lácteos.

Se ha demostrado que en Ecuador, la presencia de infecciones intramamarias están directamente relacionadas con las prácticas de manejo del ganado, principalmente el ordeño y vacunación (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). Algunas de las bacterias causantes de mastitis pueden ser agentes de enfermedades zoonóticas como: la tuberculosis, la brucelosis bovina y la faringitis estreptocócica (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002). Se han encontrado varias especies de bacilos Gram positivos relacionados a mastitis: *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. altitudinis*, *B. pumilus*, *Corynebacterium freneyi* y *B. anthracis* (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). Muchos de estos bacilos pueden encontrarse en el entorno de la granja como heces, material de cama, plantas y suelo (Amer S. , 2015), por lo que el buen manejo y las condiciones de higiene son significativos en la salud del ganado (Ruiz, Ponce, & Gomes, 2011).

Se ha encontrado que las especies de *Bacillus* están fuertemente relacionadas, por lo que es necesaria su identificación mediante técnicas moleculares (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011). Estas técnicas han sido usadas en identificación de organismos por su precisión y su objetividad (Kawata, y otros, 2004). Los análisis moleculares permiten comprender la diversidad de microorganismos asociados a mastitis en una región y determinar la fuente de infección (Amer S. , 2015). Por esto, es importante determinar los agentes causales de mastitis mediante identificación molecular para y proponer estrategias de prevención y control.

Por todo lo expuesto anteriormente, el principal objetivo del presente proyecto de investigación es identificar mediante técnicas moleculares basadas en ADN, bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de ganado bovino infectado con mastitis. De esta manera se puede aportar información sobre la diversidad de microorganismos asociados a mastitis en la región, para así

establecer programas de prevención y control de la enfermedad en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Identificar mediante el uso de técnicas moleculares, bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar-Ecuador.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

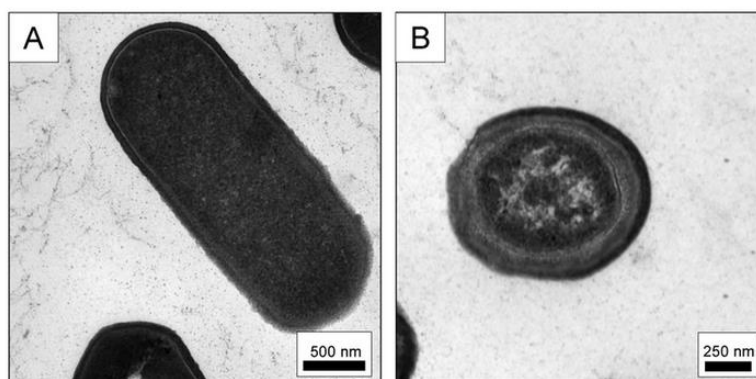
- Estandarizar un método para la extracción manual de ADN genómico de bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas infectadas con mastitis.
- Amplificar el gen 16S de bacilos Gram positivos mediante PCR convencional.
- Caracterizar bacilos Gram positivos mediante el análisis de los productos de PCR por secuenciación Sanger y alineamiento en BLAST.

## CAPÍTULO II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Género *Bacillus*

#### 2.1.1 Características generales

Las especies de bacterias del género *Bacillus* pertenecen a la división Firmicutes, familia Bacillaceae y se caracterizan por tener forma de bastón o vara (Figura 1A) (Gordon, 1973). La pared celular de *Bacillus* es una estructura rígida exterior a la célula cuya principal función es proteger la bacteria del ambiente exterior y mantener la forma de bastón (Scheffers, 2004). Está compuesta por ácido teicóico, ácido telurónico y peptidoglicanos (Graumann, 2012). Los bacilos son mayoritariamente aerobios estrictos o anaerobios facultativos, además, son formadores de catalasa y en condiciones estresantes forman una endospora resistente a calor, frío, radiación, desecación y desinfectantes (Turnbull, 1991). Los bacilos que forman esporas elipsoidales o cilíndricas (Figura 1B) son generalmente Gram positivos y pueden ser móviles o no móviles (Gordon, 1973). Los flagelos de la mayoría de los bacilos son peritricos, aunque se ha informado que algunas cepas móviles tienen flagelos polares (Graumann, 2012).



**Figura 1** a) Morfología de una célula vegetativa y b) estructura de la sección transversal de una espora cilíndrica de *Bacillus subtilis* (0.55-2 $\mu$ m).

Fuente: (Piktel, y otros, 2017)

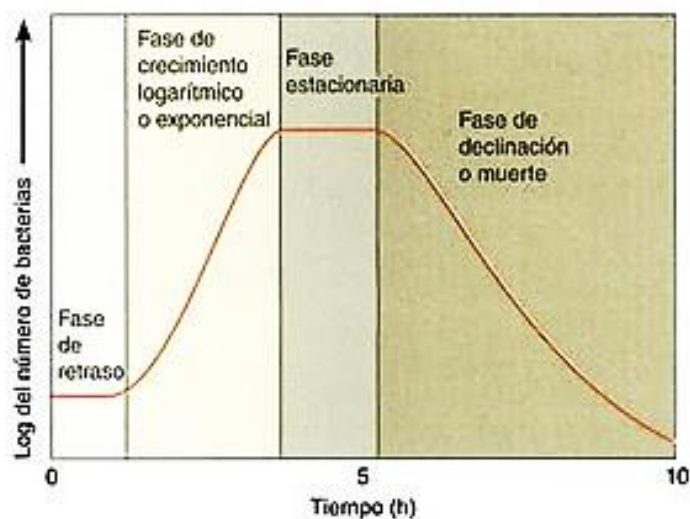
Algunas especies de bacilos tienen propiedades fisiológicas que les permiten vivir en todo ambiente natural, especialmente se encuentran distribuidas en el suelo, aire, agua de mar y ríos (Castañeda & Sánchez, 2016). Aunque ciertos bacilos Gram positivos son patógenos agresivos, la mayoría forman parte de la flora normal de cuerpo (Macedo, 2008). El manual de Bergey's de sistemática bacteriana describe 34 especies separadas en 10 grupos por estudios filogenéticos (Claus D, 1986).

### **2.1.1.1 Cultivo y crecimiento**

Las condiciones de cultivo y crecimiento óptimas para la multiplicación de células bacterianas permiten representar gráficamente el número de células viables por mililitro existentes en el medio en una unidad de tiempo (Madigan, y otros, 2009). Así, se observa un patrón de crecimiento con distintas etapas (figura 2).

La primera es la fase de latencia o fase de retraso, donde no hay variaciones en el número de bacterias, pero sí hay actividad metabólica sintetizándose las enzimas necesarias para su crecimiento, así como adaptándose al medio y condiciones de cultivo (Claus D, 1986). Pasado este periodo, el cultivo entra en fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de multiplicación es máxima. A continuación, la velocidad de crecimiento comienza a disminuir hasta llegar a cero (Romero, 2007). Aquí se alcanza la fase estacionaria, de equilibrio entre el número de bacterias vivas e inactivas por el agotamiento de los nutrientes, acumulación de productos metabólicos tóxicos o alteraciones en el pH (Madigan, y otros, 2009). Finalmente, se encuentra la fase de muerte o decline, donde la tasa de muerte supera a la de crecimiento (Tortora, 2007).





**Figura 2** Curva de crecimiento bacteriano indicando las fases de crecimiento.

Fuente: (Tortora, 2007)

En cuanto al crecimiento *in vitro*, las colonias formadas por las especies de *Bacillus* varían en cuanto a tamaño, forma y color; pero también se diferencian al microscopio mediante tinción Gram, por su agrupación (Gordon, 1973).

## 2.2 Mastitis

La mastitis bovina es una inflamación de las glándulas y conductos mamarios, que provoca dolor, molestia o estrés a la vaca (Yera & Ramírez, 2016). La inflamación puede tener niveles de gravedad, desencadenando trastornos serios como fibrosis, edema inflamatorio, atrofia del tejido mamario, abscesos o gangrena, con pérdida total o parcial de la ubre y, en consecuencia, el sacrificio del animal (Gazque, 2008). También cambia la composición de la leche con disminución en la síntesis de lactosa, grasa y caseína, así como la reducción de las proteínas del suero, cloruro, sodio y pH (Bedolla & Ponce de León, 2008).

### 2.2.1 Tipos de mastitis

La Federación Internacional de Lechería clasifica la mastitis en dos tipos: subclínica o clínica; y ésta última en leve, moderada y severa (tabla 1) (Griffin, 1987). La mastitis clínica se identifica porque el animal presenta inflamación de la glándula mamaria y cambios en las características organolépticas de la leche (Bogni, y otros, 2017). Por el contrario, la mastitis subclínica no presenta signos, por lo que muchas veces pasa desapercibida pero repercute en bajos niveles de producción y mala calidad de la leche (Bedolla & Ponce de León, 2008).

**Tabla 1**

*Definición de los tipos de mastitis en función de la severidad de los síntomas*

Tipo de Mastitis	Subtipo	Definición
Subclínica		No existe inflamación visible de la glándula, se diagnostica por incremento en recuento de células somáticas, existe disminución de la producción.
Clínica	Leve	Alteraciones observables en la leche, pocos signos de inflamación de glándulas mamarias.
	Moderada	Alteraciones visibles en la leche y ubre con hinchazón, calor y dolor.
	Severa	Inflamación evidente de la ubre, signo sistémicos y locales, fiebre, apatía, postración.

Fuente: Adaptado de (Le Maréchal, 2011)

### 2.2.2 Tratamiento, control y prevención

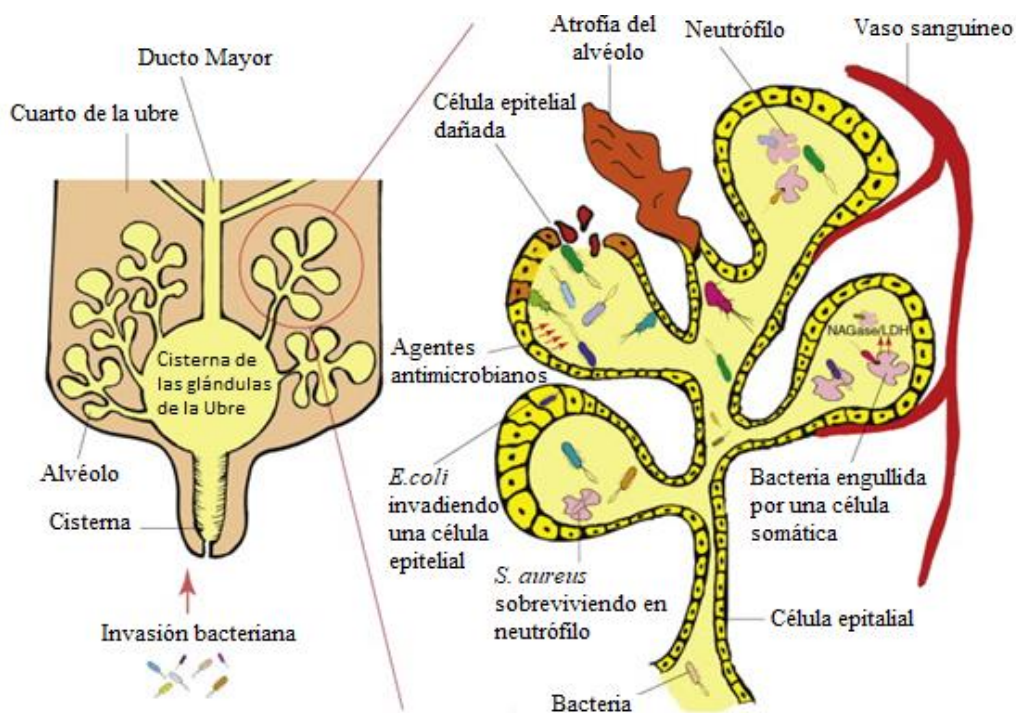
Actualmente, el tratamiento de las vacas afectadas por mastitis se basa en el uso de una amplia gama de antibióticos (Amer S. , 2015). Estudios han demostrado que su abuso es un problema, debido a la resistencia de los microorganismos al medicamento (Anexo A) (Bedolla & Ponce de León, 2008; Andrade & Sánchez, 2018). Además, se acumula en el organismo del animal, quedando residuos químicos en la leche (Bonifaz & Conlago, 2016). Este tratamiento además de

no ser completo, representa pérdidas económicas, por lo que implantar programas de prevención y control es necesario (Andrade, y otros, 2017). Para prevenir contagios, deben establecerse buenas prácticas de higiene durante el ordeño y un completo programa de asesoramiento al personal de fincas y granjas (Andrade & Sánchez, 2018). También corresponde realizar la identificación del agente causal de la infección, para proponer un método efectivo de control (Bedolla & Ponce de León, 2008).

### **2.2.3 Etiología de mastitis**

La mastitis es una inflamación multifactorial (Amer S. , 2015), provocada generalmente por una infección; sin embargo, también se debe a lesiones (heridas o golpes), alergias y neoplasmas (Menzies & Ramanan, 2001). Entre los agentes infecciosos hay parásitos, algas (*Prototeca*) (Bedolla & Ponce de León, 2008), levaduras (*Cryptococcus neoformans*, *Cándida albicans*) (Mbuk, Kwaga, Bale, & Umoh, 2006), y bacterias con mayor frecuencia (Amer S. , 2015; Bhatt, Patel, Joshi, & Kunjadia, 2011; Bjork, y otros, 2014; Calvinho & Tirante, 2005; Ruiz R. , 2008; Preethirani, y otros, 2015).

La mastitis ocurre cuando los microorganismos presentes en el ambiente penetran la primera línea de defensa de la ubre, el pezón (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002; DANE, 2014). El músculo del esfínter permanece cerrado y se dilata durante el ordeño, quedándose así por una o dos horas (Ruiz R. , 2008), permitiendo a las bacterias del ambiente o de la piel lesionada, ingresar al conducto mamario, multiplicarse en la ubre y colonizar otros tejidos (Figura 3) (Andrade, y otros, 2017).



**Figura 3** Estructura del pezón y mecanismo de invasión bacteriana durante mastitis  
Fuente: (Viguier C, 2009)

### 2.2.3.1 Mastitis bacteriana

Las bacterias son los principales agentes causales de la mastitis, algunos de los cuales son patógenos en humanos (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002). Pueden clasificarse en contagiosos, ambientales, oportunistas y otros (Blowey, 1995).

Entre los patógenos ambientales están especies de *Bacillus* se encuentran típicamente en suelo, agua, polvo, aire, heces y vegetación (Swartz & Petersson, 2016). Por eso, se ha mencionado prevalencia de bacilos Gram positivos causantes o asociados mastitis, incluyendo: *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. altitudinis*, *B. pumilus*, *B. anthracis* y *Corynebacterium freneyi* (Amer S. , 2015). También se ha comprobado que algunas nocardias pueden provocar la infección (Bedolla & Ponce de León, 2008). También se han encontrado enterobacterias (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002) y otras bacterias Gram positivas como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* (Mendoza, Vera, & Peña, 2017; Amer S. , 2015; Bedolla & Ponce de León, 2008). Entre los patógenos contagiosos más importantes

son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Ramírez, Fernandez, & Palacio, 2018; Bautista-Trujillo, y otros, 2013; Rabello, y otros, 2005; Fox & Gay, 1993).

**Tabla 2**

*Descripción de los principales microorganismos patógenos de mastitis*

	<b>Microorganismos contagiosos asociados a la ubre</b>	<b>Microorganismos menores asociados a la ubre</b>	<b>Microorganismos asociados al medio ambiente</b>
<b>Patógeno</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Estafilococos coagulasa negativos, <i>Corynebacterium bovis</i>	Género <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , enterococos, <i>Escherichia coli</i> , estafilococos coagulasa negativos
<b>Reservorio</b>	La ubre	Piel de la ubre, canal del pezón	Medio ambiente, piel de la ubre
<b>Transmisión</b>	En el momento del ordeño	En el momento del ordeño, por el ser humano	En el momento del ordeño, por el ser humano
<b>Profilaxis</b>	Higiene en el ordeño	Corrección de factores predisponentes	Corrección de factores predisponentes

Fuente: (Wolter, Castañeda, Kloppert, & Zschoeck, 2002)

## 2.3 Técnicas moleculares de identificación

El uso de técnicas de biología molecular en la identificación de organismos es cada vez más frecuente debido a su rápido desarrollo (Kawata, y otros, 2004). Sirven como herramientas de diagnóstico en mastitis bovina, por ser precisas y carecer de subjetividad (Kawata, y otros, 2004; Raemy, y otros, 2013). Los análisis moleculares permiten caracterizar la diversidad de microorganismos causales de mastitis en una región, determinar la fuente de infección y encontrar genes de resistencia (Amer S. , 2015). Con esta información se pueden desarrollar estrategias para el tratamiento y control (Mbuk, Kwaga, Bale, & Umoh, 2006)

### 2.3.1 Técnicas basadas en ADN

Ensayos de identificación basados en ADN, molécula estable, se han usado para la caracterización de patógenos a diferentes niveles taxonómicos de acuerdo con el objetivo del

estudio y los cebadores diseñados (El-Sayed, Awad, Abdou, & Castañeda, 2017). Estas técnicas permiten identificar organismos no viables o inactivados (Elhaig & Selim, 2015).

### **2.3.1.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se fundamenta en debilitar la membrana celular y solubilizar sus lípidos con los detergentes del buffer de extracción (SDS, CTAB, sarkosil), seguido de una ruptura mecánica o química (Quinga, 2012), que libera el material interior de las células incluyendo proteínas. Luego, el ADN es separado y concentrado mediante diálisis, desecación del medio de suspensión o el uso de alcoholes como etanol o isopropanol (Dalla-Costa, y otros, 2017). Finalmente, debe añadirse una solución o buffer de suspensión para mantener su integridad hasta su posterior uso.

La cantidad de ADN puede medirse mediante su concentración en masa de ADN extraído por volumen de solución y la calidad del ADN se basa en el grado de contaminación (Smith, Diggle, & Clarke, 2003). La calidad se mide de manera espectrofotométrica, calculando el radio  $A_{260}/A_{280}$ , determinando la contaminación por proteínas. Una buena pureza está dada por valores entre 1,8 y 2,0 (Lee, Kim, Liu, & Lee, 2002). Por otro lado, el radio  $A_{260}/A_{230}$  indica contaminación por residuos químicos (Dalla-Costa, y otros, 2017).

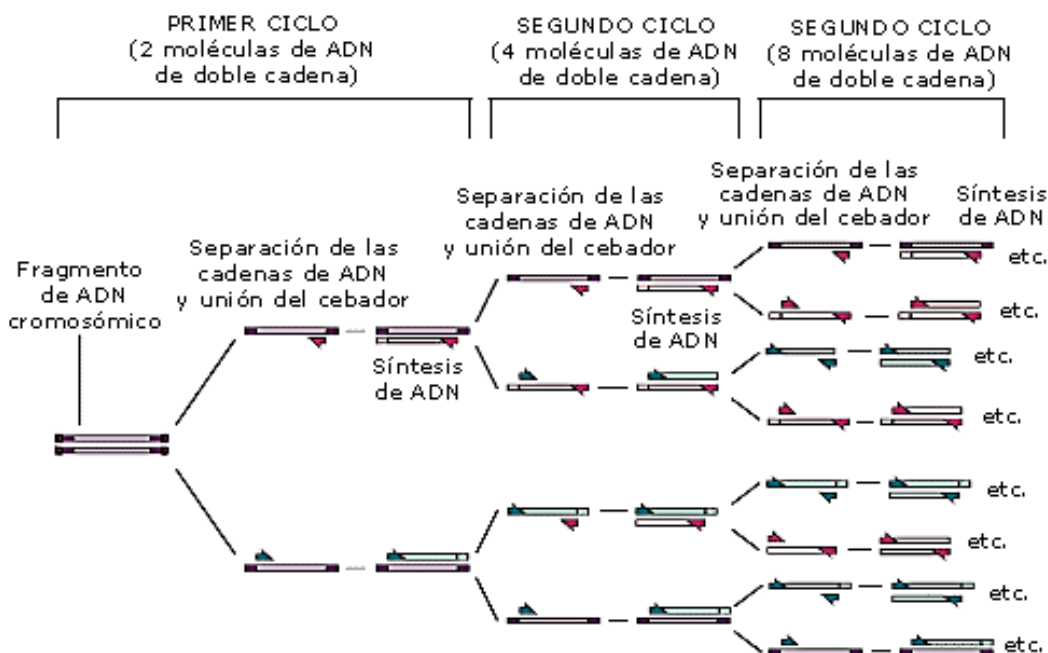
### **2.3.1.2 Gen ribosomal 16S**

El gen 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pb contenido en la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011). La filogenia bacteriana empezó a estudiarse a mediados de los 70s con el objetivo de usar la subunidad ribosomal 30S como herramienta para realizar estos análisis (Pylro, Vespoli, Duarte, & Yotoko,

2012). Actualmente, este gen es un standard para la identificación de bacterias y análisis taxonómicos (Goto, Omura, Hara, & Sadaie, 2000), ya que es de un gen de distribución universal, crítico en la función celular. Es útil también en análisis filogenéticos porque representa un cronometro molecular por su alto grado de conservación (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

### **2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una herramienta molecular bastante sensible usada para crear miles de copias de una secuencia de ADN de interés que sirve como molde (Holland, Abramson, Watson, & Gelfand, 1991). La técnica utiliza la capacidad de la ADN polimerasa para sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria, utilizando primers o cebadores que proporcionan una terminación 3'-OH libre (NCBI, 2017), necesario para iniciar la adición de los nucleótidos (dNTPs) y también permite delimitar la región de la secuencia útil para el investigador (Ozanich, y otros, 2017). La PCR convencional se desarrolla básicamente en cinco pasos: desnaturalización inicial, desnaturalización, alineamiento, extensión y extensión final, descritos en la figura 4. Los tres pasos intermedios toman de 25 a 40 ciclos, para obtener el número de copias requerido por la investigación.



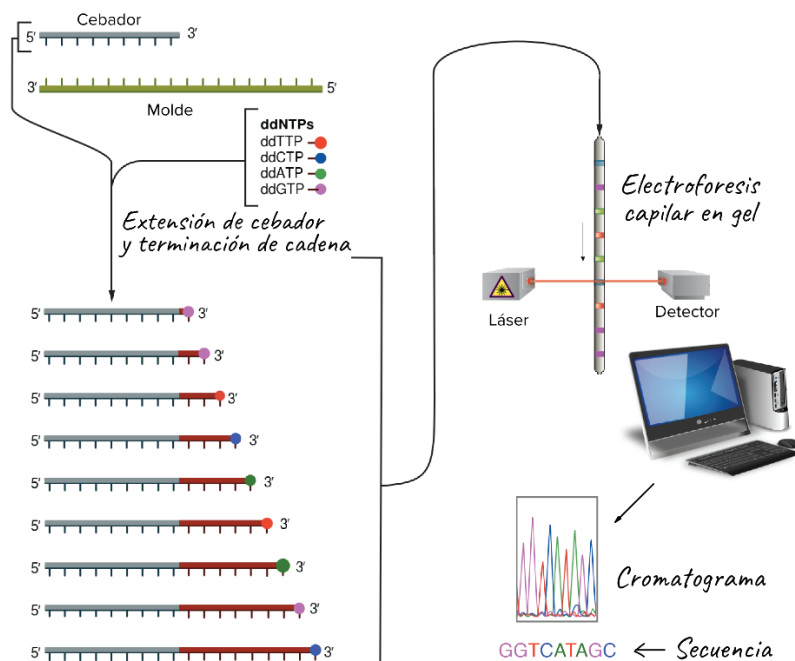
**Figura 4** Esquema de la amplificación de ADN por PCR

Fuente: (MINERD, 2005)

### 2.3.3 Secuenciación Sanger

Las técnicas de secuenciación han sido utilizadas para determinar los nucleótidos que componen una cadena de ADN de un organismo aislado (Amer, Aguilar, & Maza, 2015; Elhaig & Selim, 2015; Kawata, y otros, 2004; Lange, y otros, 2015; Mbuk, Kwaga, Bale, & Umoh, 2006; Preethirani, y otros, 2015). Esta técnica se basa en la síntesis secuencial de una hebra de ADN complementaria a otra de cadena simple que le sirve como molde (Men, Wilson, Siemering, & Forrest, 2008). Se necesita de la ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos y cuatro dideoxinucleótidos como nucleótidos de parada (Sanger, Nicklen, & Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitor, 1977). Así, se pueden generar fragmentos secuenciados de distinto tamaño dependiendo del lugar donde se adiciona el ddNTP, permitiendo dilucidar la secuencia mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 5) (Sanger & Coulson, 1978).





**Figura 5** Esquema de la secuenciación Sanger

Fuente: (Estevez, 2012)

### 2.3.4 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realiza con el fin de determinar las relaciones evolutivas entre especies, al inferir o estimar un ancestro evolutivo basándose en secuencias de ADN o proteínas (Waikagul & Thakham, 2014). Estas secuencias de ADN son un consenso producto de alinear tres o más secuencias biológicas que pueden ser ADN, ARN o proteínas, buscando compararlas, ordenar partes homólogas y permitiendo examinar patrones o zonas de similitud (Molina & David, 2017). Para conocer el organismo al que pertenece una secuencia desconocida, se pueden comparar secuencias del gen 16S con el fin de identificar especies y determinar relaciones taxonómicas entre sí, donde una alta relación está determinada por un porcentaje de similitud mayor a 97% (Janda & Abbott, 2007).

La historia filogenética es representada como un diagrama en forma de árbol, cuyas partes representan relaciones evolutivas y también proporcionan un patrón histórico de ascendencia,

divergencia y descendencia (Waikagul & Thaeckham, 2014). Un árbol filogenético consta de puntas de rama conocidas como nodos terminales que se unen con nodos internos, estos últimos representan eventos de especiación inferidos (Brinkman & Leipe, 2001). La bifurcación de ramas representa la división de linajes, es decir grupos hermanos descendientes y ancestros comunes de dos o más linajes relacionados (Brinkman & Leipe, 2001).

Partiendo de un nodo interno, se reconocen agrupaciones de unidades taxonómicas operativas (OTUs) que son conocidas como “clados” o “grupos monofiléticos” (Waikagul & Thaeckham, 2014). Este grupo representa a todos los miembros que se derivan de un ancestro común, mientras que un “grupo parafilético” excluye a uno o más componentes de la descendencia y un “grupo polifilético” incluye integrantes de diferentes linajes ancestrales (Gregory, 2008).

## **2.4 Hipótesis**

No1: El método de CTAB/CAI no obtiene concentraciones ni pureza óptimas de ADN para la identificación de bacilos Gram positivos.

Ho2: La PCR convencional no amplifica el gen 16S de bacilos Gram positivos.

Ho3: Los porcentajes de similitud del alineamiento en BLAST no fueron lo suficientemente altos para identificar bacilos Gram positivos.

## CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Zona de estudio

El presente trabajo parte del estudio realizado por Sánchez y Andrade, (2018), quienes proporcionaron un cepario de bacterias en agar nutriente. Este cepario se obtuvo a partir de muestras de leche de vacas infectadas con mastitis en cuatro fincas ganaderas de la cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito”, en la provincia de Bolívar, cantón Guaranda, parroquia Salinas. En la tabla 3 se detallan las coordenadas geográficas donde se realizó la toma de muestras.

**Tabla 3**  
*Coordenadas geográficas del origen de las muestras*

Parámetro	Parroquia Salinas
Longitud	78° 58' 1" W
Latitud	1° 34' 8" S
Altitud	3550 m.s.n.m

Fuente: (Andrade & Sanches, 2018)

Los análisis y procedimientos necesarios para la realización del presente trabajo se realizaron en los Laboratorios de Biotecnología Animal y Microbiología, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicados en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

### 3.2 Procedimientos

#### 3.2.1 Recepción y conservación de muestras

Las muestras fueron receptadas en tubos de ensayo con tapa rosca, sembrados en agar nutriente inclinado, sin el uso de preservantes adicionales con el fin de conservar la integridad del ADN

(Quinga G. , 2012). Se conservaron en refrigeración a  $-4^{\circ}\text{C}$  con la realización de subcultivos para evitar contaminación e impedir que entren en deceso (Tortora, 2007).

### **3.2.2 Identificación de los cultivos mediante tinción Gram**

Se comprobó la pureza de los cultivos de microorganismos aislados de leche de vacas infectadas con mastitis, mediante tinción Gram. Para esto, se tomó una muestra del cultivo sembrado en agar inclinado y sobre una gota de agua destilada, con ayuda de un asa metálica se realizó un frotis a lo largo de una placa portaobjetos (Fessia, Dieser, & Odierno, 2018). El frotis se fijó pasándolo cinco veces por la llama del mechero y se tiñó los organismos para diferenciar las bacterias Gram positivas que se colorearon de azul o violeta de las Gram negativas que se pintan rosa o rojo (Tortora, 2007).

Para realizar la tinción Gram, primero se colocó colorante cristal violeta Merk® sobre las placas fijadas, se dejó reposar durante un minuto y se desechó el colorante enjuagando con agua destilada. Luego se puso lugol Merk® que actúa como solución mordiente permitiendo al cristal violeta fijarse a la pared de la célula bacteriana, durante un minuto, para enjuagarlo nuevamente. Se dejó caer diez gotas de alcohol cetona proporción 3:1 marca Merk® como decolorante (Fonseca, 2015). Se colocó Safranina Merk® como colorante de contraste y se enjuagó la placa con agua destilada. Finalmente, se dejaron secar las placas al ambiente y se observaron al microscopio óptico con un aumento de 100X y aceite de inmersión (Rivas, 2017). Del total de placas teñidas, se seleccionaron los cultivos mixtos para proceder al aislamiento de colonias y purificación de las bacterias en cultivos separados.

### 3.2.3 Purificación de cepas aisladas

Para la purificación de los cultivos mixtos encontrados, se prepararon cajas Petri con 20 ml de agar nutriente BD Difco™ o agar manitol salado Acumedia® (MSA). Se tomó una muestra del tubo con el cultivo en agar inclinado y con ayuda de un asa metálica, se realizó un estriado por agotamiento sobre el agar (Figura 6). Estas cajas se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 37°C durante un periodo de 18 a 24 horas para observar el crecimiento de colonias aisladas sin llegar a crecimiento masivo (Andrade & Sánchez, 2018). Todas las colonias aisladas identificadas, fueron tomadas cuidadosamente con un asa metálica y sembradas formando estrías en un tubo con agar nutriente Acumedia™ sólido inclinado e incubadas a 37°C por un periodo de 24 a 48 horas, hasta observar crecimiento (Amer S. , 2015). Estas cepas purificadas e incubadas fueron diferenciadas en el microscopio óptico mediante tinción Gram, de las cuales se seleccionaron todos los bacilos Gram positivos. Finalmente se almacenaron a -4°C para realizar los estudios posteriores.



**Figura 6** Estriado por agotamiento

### **3.2.3.1 Condiciones óptimas del cultivo**

Previo a las pruebas de extracción de ADN, fue necesario establecer las condiciones óptimas del cultivo, ya que se trabajó con bacilos Gram positivos, organismos formadores de esporas resistentes que pueden complicar el proceso de extracción de ADN. Para esto se probó el tiempo de incubación del cultivo (8h, 10h, 15h, 18h, 24h, 48h), la temperatura (28°C, 37°C, 50°C), el medio de incubación (Caldo nutriente, medio LB, Infusión de cerebro y corazón, medio enriquecido con caseína) y las condiciones de aireación del cultivo (con agitación y sin agitación) (Akpa E, 2007; Castañeda & Sánchez, 2016).

### **3.2.4 Estandarización de un método para la extracción de ADN**

El éxito de las técnicas moleculares de identificación de microorganismos depende de la extracción de ADN de buena calidad, por lo que el método seleccionado debe proporcionar una concentración y pureza apropiadas para las exigencias de la PCR (El-Sayed, Awad, Abdou, & Castañeda, 2017). Para dar inicio a la extracción de ADN, se tomó una muestra del cultivo puro con ayuda de un asa metálica esterilizada, se sembró en un tubo de ensayo tapa rosca con 10 ml de medio de cultivo infusión de cerebro y corazón bovino (BHI) y se incubó a 37°C durante 72 h. Luego, se homogenizó el tubo de ensayo, se vertió 2 ml de este cultivo en un microtubo Eppendorf<sup>TM</sup> de 2 ml con tres perlas de ebullición, se centrifugó a 14 500 rpm durante tres minutos y se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso hasta agotar el total del medio líquido del tubo de ensayo, hasta obtener un pellet con toda la biomasa, lista para aplicar cualquier método de extracción de ADN.

### **3.2.4.1 Extracción manual de ADN bacteriano utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-alcohol isoamílico (CTAB/CAI)**

Se utilizó el método empleado para la extracción de ADN de hongos propuesto en Minipreparación para extracción de DNA-CTAB por Francisco Jarrín (Weising, 2005). Se modificó la lisis celular, utilizando perlas de ebullición para ejecutar la ruptura mecánica de la pared celular. Al pellet se le colocó 1 ml de buffer de lisis (Tabla 4), donde se probó la mejor concentración de CETAB y  $\beta$ -mercaptoetanol y se llevó a vórtex durante tres minutos, observando la formación de espuma. Se adicionó 400 $\mu$ l de cloroformo: isoamil-alcohol (24:1) a la solución anterior, se homogenizó en vórtex durante dos minutos y se incubó en termobloque ProvoCell ESCO a 50°C durante 30 minutos a 300 rpm (Rivas, 2017). Se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, aquí se observó la formación de tres fases. Se transfirió la fase superior del sobrenadante, que contiene el ADN, sin tocar la interfase a otro microtubo estéril sin perlas de ebullición, se añadió de uno a uno y medio volúmenes de isopropanol y se los dejó a -20°C para precipitar el ADN (Factos & Estefanía, 2016).

Posteriormente, se centrifugó a 14500rpm durante cinco minutos, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet de ADN dos veces con 500 $\mu$ l de etanol al 70% filtrado. En cada lavado se volvió a concentrar el pellet por centrifugación. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar los tubos de 30 a 60 minutos, permitiendo que todo el etanol se evapore (Quinga G. , 2012). Para terminar, se resuspendió el pellet de ADN en 50 $\mu$ l de buffer TE Ph 8; finalmente, de ser necesario, se probó el uso de 3 $\mu$ l de RNAsa con y sin incubación y se almacenaron las muestras a -20 °C para su posterior análisis.

**Tabla 4**  
*Componentes del Buffer de extracción*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>Tris HCl Ph=8</b>	220 Mm
<b>EDTA</b>	22 Mm
<b>NaCl</b>	800 Mm
<b>Sarkosyl</b>	1%

Fuente: (Weising, 2005), adaptación de F. Jarrín.

### **3.2.4.2 Extracción de ADN utilizando Kit**

Se utilizó el kit de extracción Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit de Promega, siguiendo las recomendaciones y especificaciones del fabricante con pocas modificaciones (Promega Corporation, 2017). Se colocó 500µl de EDTA 50mM, más 250µl de lisozima y se pipeteó hasta homogenizar; se incubó en termobloque ProvoCell ESCO a 37°C durante 1 hora y 30 minutos a 300rpm, se centrifugó a 14500rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadió 600µl de solución de lisis de núcleo, se homogenizó mediante pipeteo, se incubó a 80°C por 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Luego, se adicionó 3µl de RNAsa Invitrogen, se homogenizó por inversión del tubo, se incubó a 37°C durante 60 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A las células lisadas, se les colocó 200µl de solución de precipitación de proteínas, se homogenizó vigorosamente en vórtex durante 30 segundos, se refrigeró a -20°C por 5 minutos y se centrifugó a 14 500rpm durante 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo estéril con 600µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión hasta observar la formación de un hilo enroscado. Posteriormente, se centrifugó a 14 000rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se drenó el tubo en papel absorbente. Se lavó el pellet con 600µl de etanol filtrado al 70%, se centrifugó a 14 000rpm durante



3 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el tubo hasta eliminar el total del etanol. Finalmente se añadió 50 µl de solución de rehidratación de ADN, se dejó la solución a 4°C durante la noche y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

### 3.2.4.3 Cuantificación de ADN e Integridad

El éxito del método se midió en la calidad y rendimiento del producto final, para esto, se llevaron las muestras al equipo de espectrofotometría GénovaNano JENWAY, donde se colocó 2 µl de la muestra y se determinó su concentración, su radio de absorbancia a  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ .

Además, se realizó un análisis de integridad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%; para esto, se disolvió la agarosa en buffer TBE 1X y se añadió 7 µl de visualizador SYBR® Safe Invitrogen. Se cargaron 3 µl de ADN con 1 µl de buffer de carga 10X Blue Juice™ Invitrogen en cada pocillo y se dejó correr el gel utilizando una fuente de poder a 120 Voltios durante una 40 minutos. Finalmente, se observó la integridad con el sistema de imagen Chemidoc™ BioRad.

### 3.2.5 Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron como se ha informado previamente en otros estudios (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991; Lange, y otros, 2015), utilizando el par de primers 27F y 1492R que se detallan en la tabla 5. Para la amplificación del gen 16S, se utilizó Go Taq® Green Master Mix, siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega), indicadas en la tabla 6.

**Tabla 5**

*Primers para el gen 16S*

Nombre	Secuencia	Gen	Referencia
27F	AGATTTGATYMTGGCTCAG	16S rRNA	(Cihan et.,a., 2012)
1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT		(Sherwood & Presting, 2007)

**Tabla 6***Condiciones de reacción para PCR para el gen 16S de bacilos Gram positivos*

REACTIVO	Concentración del Stock	Volumen por reacción
Agua libre de RNAsa		6,5 µl
Go Taq® Green Master Mix	2X	12.5 µl
Primer F	10uM	1,5 µl
Primer R	10uM	1,5 µl
ADN	40ng/µl	3 µl
<b>TOTAL</b>		25 µl

Fuente: adaptación de (Promega Corporation, 2017)

Las reacciones ensambladas se llevaron al termociclador Proflex 3 Bloque (Thermo Fisher) y se estandarizó un programa para el par de primers con las condiciones detalladas en la tabla 7.

**Tabla 7***Condiciones de ciclo para PCR del gen 16S*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	1 ciclo
94°C	30 seg	
<b>Grad. temperatura</b>	30 seg	35 ciclos
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	1 ciclo
4°C	5 min	

Fuente: adaptación de (Promega Corporation, 2017)

### 3.2.5.1 Análisis mediante electroforesis.

Para el análisis de los amplicones se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con buffer TBE 1X y 7µl de visualizador SYBR® Safe. En los pocillos se cargaron 7µl de producto de PCR con 1µl de buffer de carga Blue Juice 10X y otro pocillo se cargó con 3µl de marcador molecular 1kb abm para comprobar el tamaño de molécula (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). Se

dejó correr el gel utilizando una fuente de poder a 120V durante 50 minutos y se observó el resultado de la PCR en el sistema de imagen Chemidoc™ BioRad.

### **3.2.6 Secuenciación**

Los productos de la extracción de ADN de bacilos Gram positivos fueron enviados a la Universidad de Lovaina en Bélgica, donde fueron analizados y enviados a la empresa MacroGen para realizar su secuenciación. Se enviaron 11 muestras seleccionadas de bacilos Gram positivos, con volúmenes de 50µl, concentraciones >100ng/µl y radios de absorbancia cercanos a 2.

#### **3.2.6.1 Evaluación de similitud y homología**

Los resultados de la secuenciación fueron analizados, curados para proceder a su alineamiento y formar la secuencia consenso. Se usó del software para el análisis múltiple de secuencias: “Blenchling”, (<https://www.benchling.com/>). Posteriormente, estas secuencias consenso fueron analizadas con secuencias referencia de la base de datos de GenBank “NCBI nonredundant nucleotide database, nt.

### **3.2.7 Análisis de filogenia**

A partir de las secuencias de nucleótidos del gen 16S rRNA de las bacterias identificadas en BLAST, se procedió a realizar un alineamiento múltiple de las secuencias utilizando la herramienta MUSCLE del software MEGA-X (Felsenstein, 1985). Finalmente, se construyó un árbol filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el programa informático MEGA-X (<http://www.megasoftware.net>) con 1000 boorstraps, usando cuatro secuencias referencia y enraizando el árbol en el grupo externo formado por *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*.

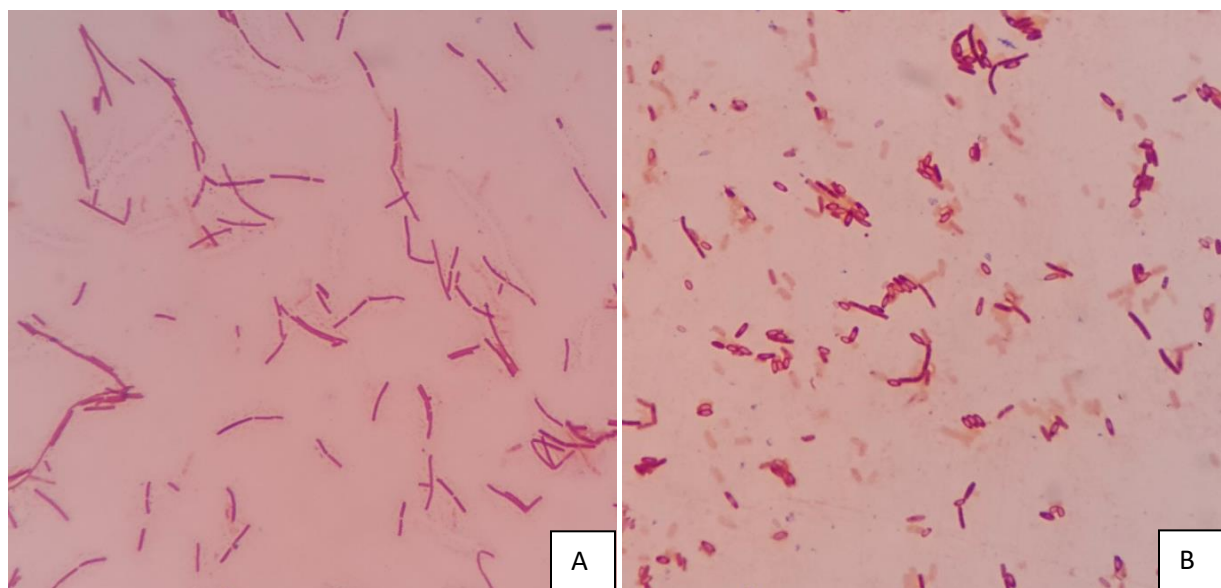
### **3.2.8 Análisis estadístico**

La generalidad de los resultados de este proyecto son netamente descriptivos, por lo que no fue necesario el análisis estadístico (Factos & Estefanía, 2016). Sin embargo, en la estandarización del método de extracción de ADN se validó el método CETAB/CAI respecto al uso de un Kit de extracción. Esta comparación se la realizó mediante una prueba T-student para dos muestras no relacionadas, con el fin de analizar la diferencia significativa entre ambos métodos, para esto se utiliza en el software estadístico GraphPad Prism 8.1.2 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

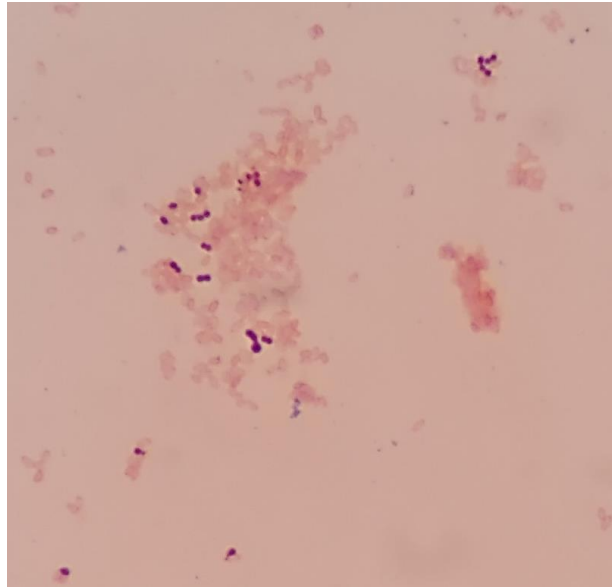
## CAPÍTULO IV RESULTADOS

### 4.1 Tinción Gram

Partiendo de los resultados obtenidos en el proyecto “Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar-Ecuador”, realizado por Sánchez y Andrade (2018). Se realizó tinción Gram para identificar y seleccionar los bacilos Gram positivos (Figura 7a), esporas (Figura 7b) y cultivos mixtos (Figura 8).



**Figura 7** Bacilos Identificados mediante tinción Gram observados al microscopio óptico con aumento 100X. a) Bacilos Gram positivos b) Esporas y bacilos Gram positivos



**Figura 8** Cultivo Mixto (Esporas y cocos Gram positivos) identificado mediante tinción Gram observado al microscopio óptico con aumento 100X.

#### **4.2 Aislamiento de cultivos mixtos**

De todas las muestras identificadas mediante tinción Gram, se seleccionaron los cultivos mixtos para obtener subcultivos puros a partir de colonias aisladas. En la figura 9 se observa un cultivo puro de bacilos Gram positivos aislados de los cultivos mixtos.



**Figura 9** Cultivo puro de bacilos Gram positivos

## 4.2.1 Establecimiento de condiciones óptimas de cultivo

### 4.2.1.1 Temperatura

Para establecer la temperatura óptima de crecimiento, los cultivos puros se incubaron a 28 °C, 37 °C y 50 °C durante 24h. La temperatura que proporcionó un mayor crecimiento de los cultivos fue a 37 °C porque las muestras presentaron mayor índice de turbidez y formación de nata (Tabla 8).

**Tabla 8**  
*Evaluación de temperatura óptima*

Muestra	28°C		37°C		50°C	
	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata
M1	2	1	1	1	1	0
M2	1	0	2	1	1	0
M3	1	0	2	1	1	0
CN	0	0	0	0	0	0

### 4.2.1.2 Medio de cultivo y tiempo de incubación

Se evaluaron cuatro medios de cultivo líquidos para obtener el mejor crecimiento de las bacterias durante 24h y 48h. Se midieron los parámetros de turbidez y formación de nata asignando los valores de 0 para la ausencia, 1 para poco y 2 para mucho. Se seleccionó el medio de Infusión de Cerebro y Corazón bovino (BHI) debido a que presentó mayor turbidez y formación de nata, tanto para las 24h (Tabla 9) como a 48h (Tabla 10) de incubación. Se demostró experimentalmente la obtención de la mayor cantidad de biomasa se obtiene sometiendo los cultivos a incubación BHI, a 37 °C durante 48h, a pesar de obtener gran cantidad de esporas.

**Tabla 9***Evaluación de medios de Cultivo a 24 horas*

Muestra	Medio LB		Caldo Nutriente		Medio Caseína		Infusión de cerebro y corazón	
	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata
<b>M1</b>	1	0	1	1	1	2	1	2
<b>M2</b>	0	0	1	1	1	1	2	1
<b>M3</b>	1	1	1	1	1	1	2	2
<b>CN</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 10***Evaluación de medios de cultivo a 48 horas*

Muestra	Medio LB		Caldo Nutriente		Medio Caseína		Infusión de cerebro y corazón	
	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata	Turbidez	Formación de nata
<b>M1</b>	1	1	1	1	1	2	2	2
<b>M2</b>	1	0	1	2	1	2	2	2
<b>M3</b>	1	1	1	1	1	1	2	2
<b>CN</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

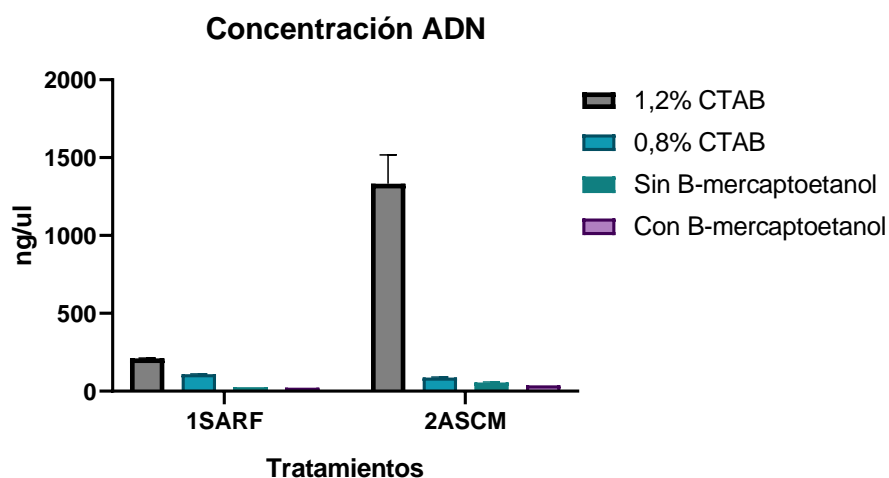
### 4.3 Estandarización del método de extracción de ADN

Todos los cultivos puros sometidos a las condiciones de crecimiento estandarizadas se utilizaron para la extracción de ADN genómico.

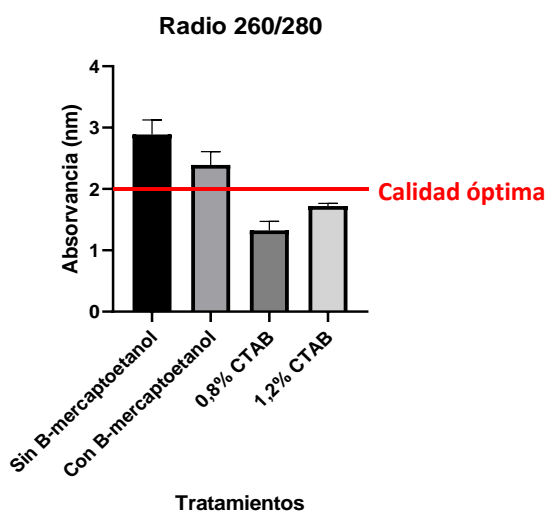


### 4.3.1 Determinación de la composición del buffer de lisis

Se varió la concentración de CTAB y de  $\beta$ -mercaptoetanol, obteniendo mayor concentración de ADN al utilizar CTAB al 1,2%, pero no se observaron diferencias en cuanto al uso de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 10). Por otro lado, en la figura 11 se demuestran ratios de absorbancia 260/280 más cercanos a 2 si el buffer lisis contiene 1,2% de CTAB y 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol.



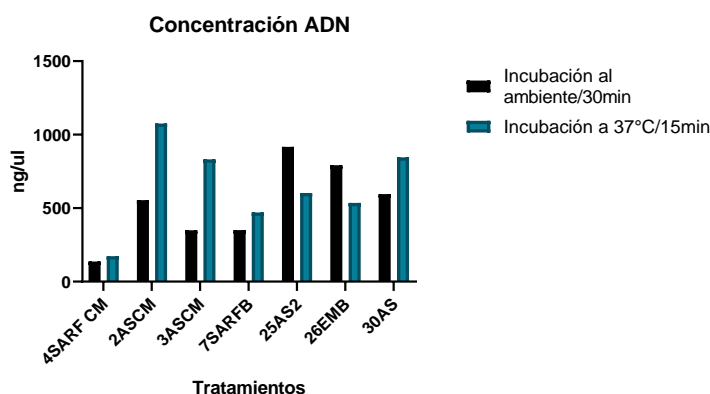
*Figura 10* Comparación de concentración de ADN en estandarización del buffer de lisis



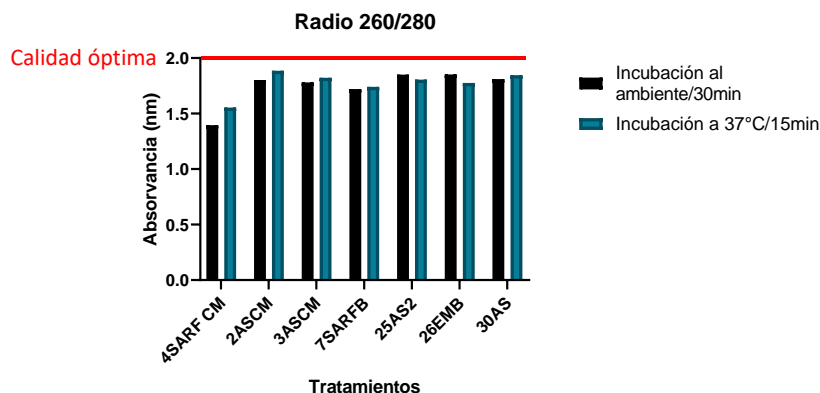
*Figura 11* Comparación de pureza de ADN en estandarización del buffer de lisis

### 4.3.2 Incubación con RNAsa

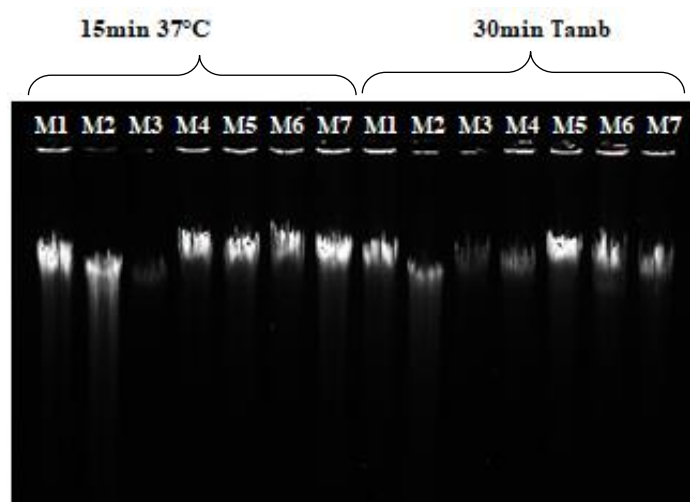
Los pellet de ADN se lavaron con etanol y se resuspendieron en solución de rehidratación, para lo que se probó su incubación con RNAsa a 37°C durante 15 min o incubación a temperatura ambiente durante 30 min. No se observan diferencias en el análisis de la concentración de ADN obtenido (Figura 12); sin embargo, se lograron mejores ratios  $A_{260/280}$  en las muestras incubadas a 37°C durante 15 minutos (Figura 13). Finalmente por los datos poco concluyentes se analizó la integridad del ADN. Se observó un barrido en el gel, indicando la degradación del ADN por ambos tratamientos. La incubación al ambiente presentó menor cantidad de barridos (Figura 14).



**Figura 12** Comparación de concentración de ADN para tipo de incubación con RNAsa



**Figura 13** Comparación de pureza de ADN para tipo de incubación con RNAsa



**Figura 14** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Análisis de integridad para tipo de incubación con RNAsa, donde M1 es la muestra 2ASCM, M2 es 3 ASCM, M3 es 4SARFCM, M4 es 7SARFB, M5 es 11SARF, M6 es 26EMB y M7 es 29AS.

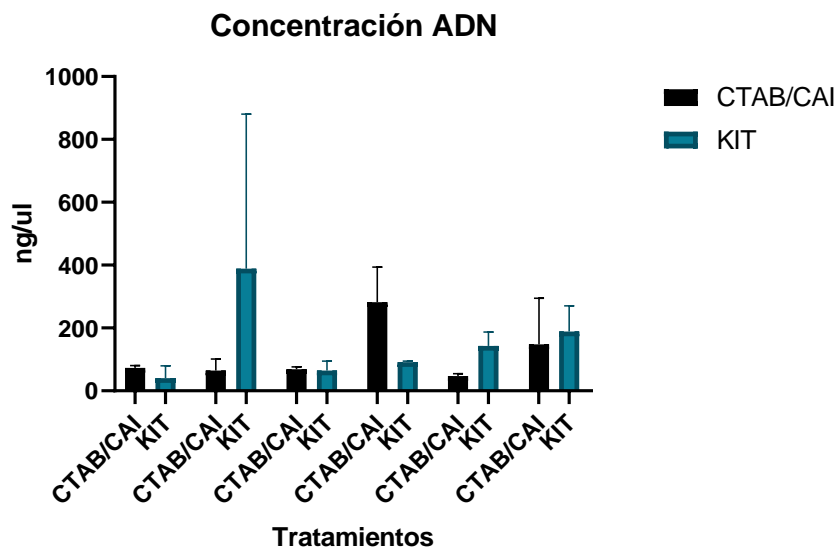
Posteriormente se probó con éxito no usar RNAsa e incubar a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 20 h para rehidratar el pellet, conservando mejor el ADN (datos no mostrados).

#### 4.3.3 Determinacion del mejor método de extraccion de ADN de Bacilos Gram positivos

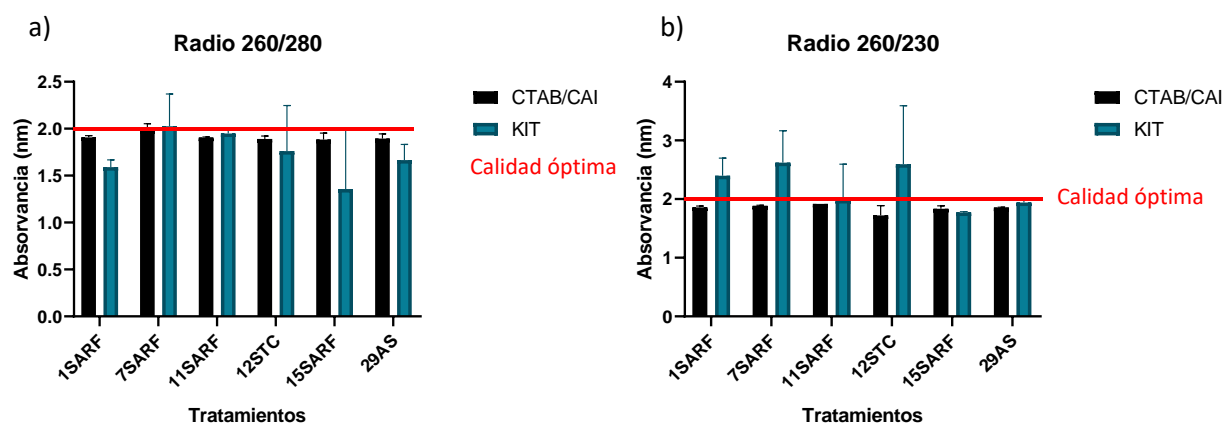
Finalmente el método estandarizado CTAB/CAI, se comparó con una prueba “Gold Standard” para la extracción de ADN de bacilos Gram positivos. Se aplicó una prueba T de Student, indicando que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ambos métodos en cuanto a concentración de ADN obtenido (Figura 15). Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) aplicando la misma prueba a datos del radio de absorbancia  $A_{260/280}$  (Figura 16a).

La misma prueba para el radio de absorbancia  $A_{260/230}$ , si se obtuvo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos métodos observándose la extracción de ADN por CTAB/CAI con los radios más cercanos a 2 (Figura 16b). También se comparó la integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, identificándose mayor cantidad de bandas definidas y sin barridos para el

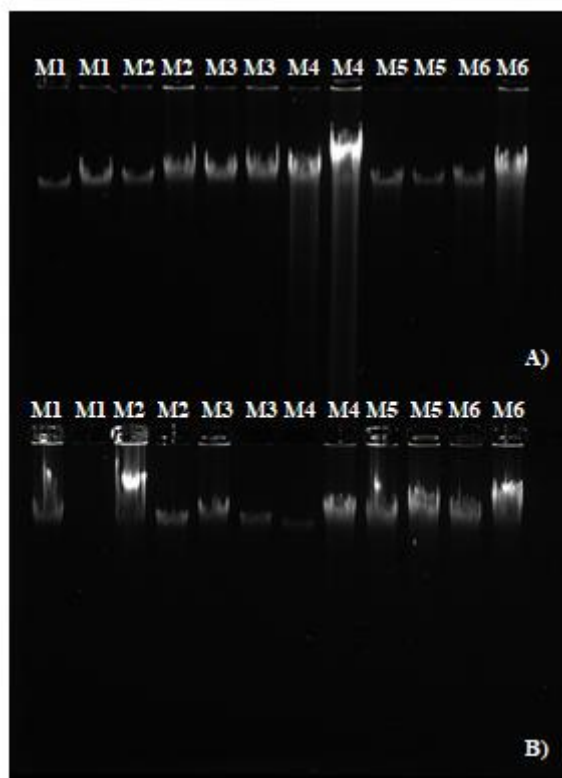
método estandarizado, demostrando que el método de extracción de ADN CTAB/CAI conserva mejor las muestras por lo que se revelan con mejor integridad (Figura 17). Con estos resultados se demostró que el método CTAB/CAI no obtiene mayor concentración de ADN, pero si mejor calidad e integridad.



**Figura 15** Comparación de concentración de ADN entre los métodos de extracción CTAB/CAI y KIT



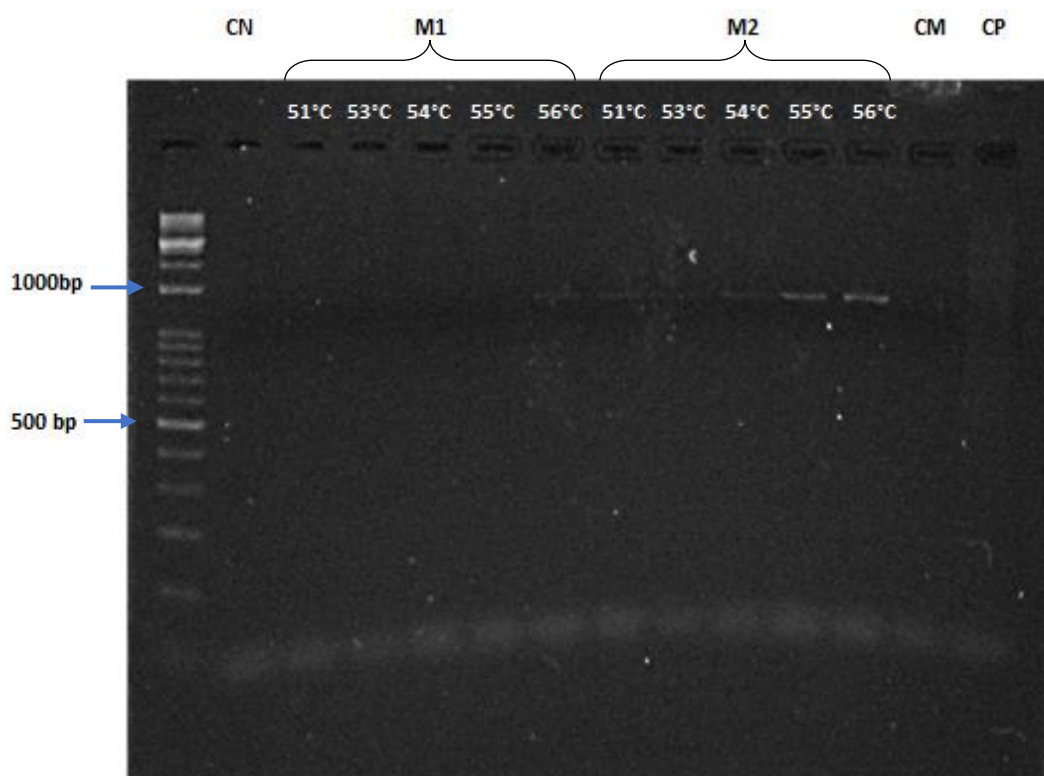
**Figura 16** Comparación de Radios de pureza entre los métodos de extracción CTAB/CAI y KIT.  
a) Pureza respecto a proteínas y RNA, radio 260/280 b) Pureza química, radio 260/230



**Figura 17** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Análisis de Integridad de ADN para los métodos de extracción A) Método de extracción CTAB/CAI, B) Método de extracción por KIT

#### 4.4 Reacción en cadena de polimerasa

Se realizó la PCR utilizando el Green Go Taq Master Mix y los primers para el gen 16S 27F y 1492R según lo especificado en la tabla 6. Se probó un gradiente de temperatura para definir la temperatura de annealing (Figura 18). Se muestran bandas más prominentes si la temperatura es 56°C, por lo que finalmente se decidió trabajar la PCR para el gen 16S rRNA con esta temperatura.



**Figura 18** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Gradiente de Temperatura de hibridación óptima para los primers 27F y 1492R. Dónde CN es control negativo, CM control muerto, CP control positivo.

#### 4.5 Análisis de similitud y homología

Las secuencias consenso en formato FASTA se compararon con las secuencias de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST. Se seleccionó la opción de colección de nucleótidos, obteniéndose en varias secuencias identidades iguales para distintas especies de *Bacillus*. Por esta razón, se delimitó la base de datos a secuencias del gen 16S RNA ribosomal para bacterias y Archaeas. Ambos resultados y su porcentaje de identidad y Query se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11**

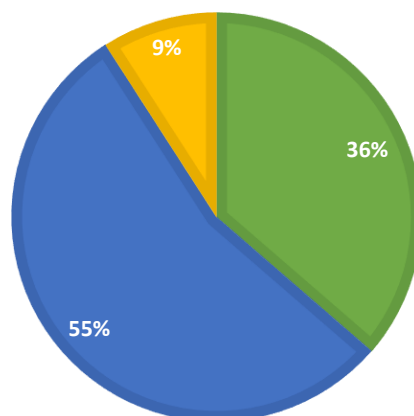
*Identificación mediante alineamiento en BLAST a partir de secuencias del gen 16S*

Muestra	Colección de nucleótidos			Secuencias de RNA ribosomal 16S		
	Organismo	Query	P. identidad	organismo	Query	P. identidad
<b>2 SARF</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,06%	<i>Bacillus tequilensis</i>	100%	99,06%
<b>3 AS</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,39%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,30%
<b>2 AS</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,80%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,80%
<b>7 SARFB</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,58%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,36%
<b>5 AS</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,80%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,69%
<b>11 SARF</b>	<i>Bacillus sp.</i>	99%	98,86%	<i>Bacillus velezensis</i>	99%	98,86%
<b>26 EMB</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,24%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,09%
<b>29 AS</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,50%	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	99,50%
<b>30 AS</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	100%	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,90%
<b>32 STC</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,34%	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,34%
<b>14 EMB</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,58%	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99,50%

Teniendo en cuenta el número de coincidencias encontradas, se estableció que la muestra 2SARF se asemeja más a *Bacillus subtilis* y 11SARF a *Bacillus velezensis*. De este modo, se han identificado en total once muestras en tres especies de bacterias, 55% de *Bacillus licheniformis*, 36% de *Bacillus subtilis*, 9% de *Bacillus velezensis*, (Figura 19).

## ESPECIES DE BACTERIAS ASOCIADAS A MASTITIS

■ *Bacillus subtilis* ■ *Bacillus licheniformis* ■ *Bacillus velezensis* ■ ■



**Figura 19** Diagrama de pastel del porcentaje de muestras encontradas en cada especie

### 4.6 Análisis de filogenia

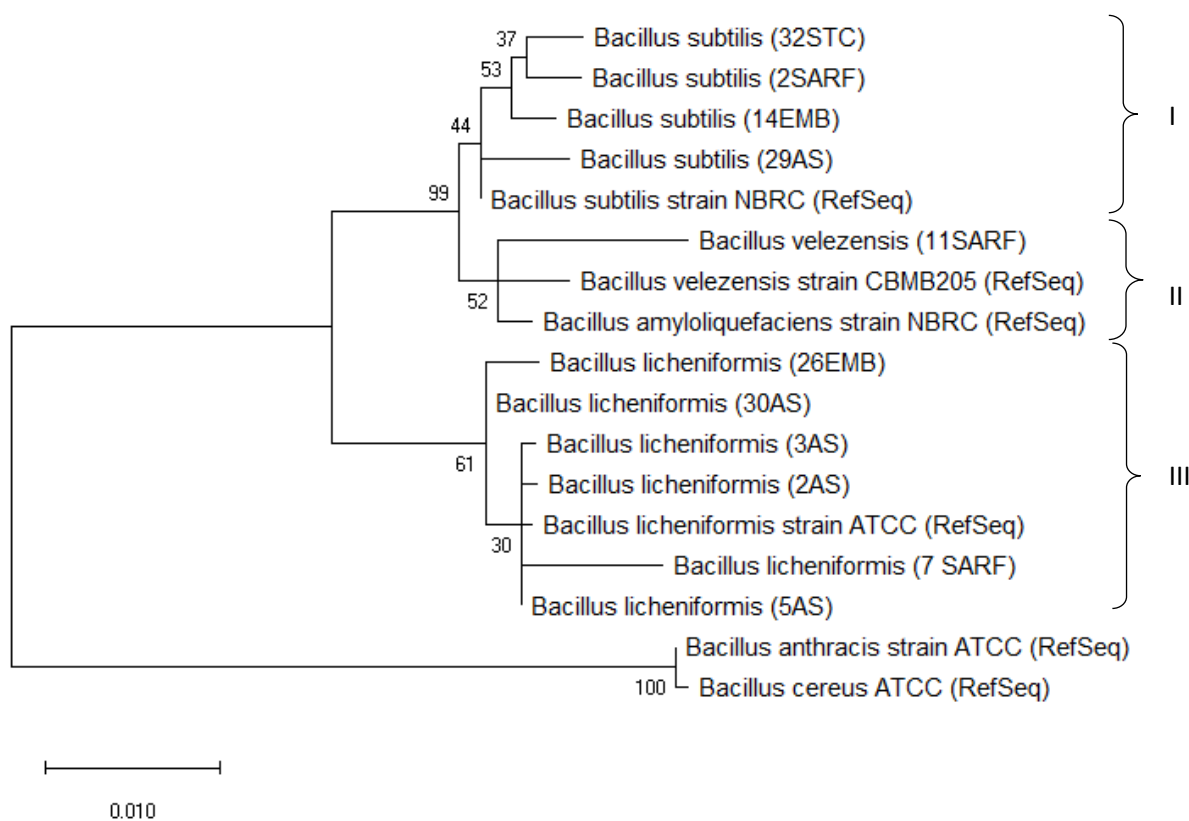
Se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias curadas, referencia y grupo externo o outgroup, usando la herramienta MUSCLE de las opciones del software informático MEGA-X. Posteriormente, se construyó un árbol filogenético para inferir la historia evolutiva, utilizando el método de Maxima verosimilitud y el Modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993).

Esta inferencia se estableció a partir de una búsqueda basada en algoritmos de unión por vecindad (NJ) aplicada a una matriz de distancias pares estimadas mediante el enfoque de Probabilidad compuesta máxima. En las ramas se indica el porcentaje de los árboles en los que los taxones asociados se agruparon (Felsenstein, 1985). Las longitudes de las ramas de ambos árboles son medidas a escala respecto al número de sustituciones por sitio (Kumar & Stecher, 2018).

El árbol se construyó en base las secuencias del gen 16S de los Bacilos Gram positivos, utilizando como outgroup *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus* (Hernández, Prieto, Valencia, Moreno, &



Santoyo, 2014), se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-3205,65). La tasa de variación permitió tener sitios invariables ([+I], 45.13%). Aquí se observa la formación de dos clados, el primero se dividió en dos grupos, el primero de cinco taxones, el segundo de tres, el segundo clado formado por siete taxones. En todos los grupos los taxones se ven agrupados con buen soporte y claramente formando dicotomías (Figura 20). En el árbol se puede observar que las cepas de *B.subtilis* y *B. licheniformis* forman grupo monofiléticos, también se demuestra que *B. velezensis* y *B. amylequefaciens* pueden tener un ancestro común.



**Figura 20** Árbol filogenético en base a 17 secuencias de nucleótidos del gen 16S de bacilos Gram positivos utilizando el método de máxima verosimilitud. Enraizado en el grupo formado por *Bacillus anthracis* y *B. cereus*.

## CAPÍTULO V DISCUSIÓN

En este estudio se presentó el uso de técnicas moleculares y bioinformáticas para caracterizar las bacterias asociadas a muestras de leche de vacas con mastitis, las cuales son difíciles de determinar por técnicas rutinarias de cultivo o métodos bioquímicos. Se realizaron ensayos basados en el gen 16S rRNA a partir de muestras tomadas en cuatro granjas de la Cooperrativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” provincia Bolívar–Ecuador, donde Sánchez y Andrade (2018) encontraron una prevalencia de mastitis subclínica de 84,5%. Este gen ha sido ampliamente usado en ensayos de identificación y formación de filogenias ya que tiene baja tasa de mutación (Factos & Estefanía, 2016; Amer, Aguilar, & Maza, 2015; Lange, y otros, 2015). Además, tiene zonas específicas altamente conservadas y un tamaño de 1542 bp, lo que ayuda a los análisis informáticos (Herrera, 2005).

Para seleccionar los microorganismos problema es importante diferenciar todos los cultivos bacterianos mediante microscopía óptica usando tinción Gram. Esto fue realizado por Sánchez y Andrade (2018), quienes de un total de 111 muestras encontraron 27,03% de bacilos Gram positivos que fueron identificados por técnicas moleculares en el presente trabajo. Las especies de *Bacillus*, son fuertemente relacionadas, por lo que los métodos de identificación tradicionales pueden generar una identificación probable y no definitiva (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011). Para este estudio se tomaron estos cultivos, las esporas y los cultivos mixtos que fueron aislados.

Para tener una buena extracción de ADN, en cuanto a rendimiento, se debe tener en cuenta la cantidad de muestra de la que se dispone para el procedimiento, por lo que es importante establecer las condiciones óptimas de crecimiento para las bacterias (Rivas, 2017). Por esta razón, con los

cultivos puros aislados en agar inclinado, se establecieron las condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano. En esta investigación se probaron 3 temperaturas, 28 °C, 37°C y 50°C ya que se ha encontrado un amplio rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de bacilos, como bacilos termófilos cuya temperatura de crecimiento varía entre 41°C y 75°C (Rivas, 2017; Faz Tapia, 2018), o psicrófilos que crecen a temperaturas de -5°C a 28°C (Gordon, 1973), pero generalmente son mesófilos que muestran crecimiento a temperaturas entre 29°C y 40°C (GARCÍA-ARMESTO, 1997). Como resultado se obtuvo que a 37°C las condiciones de crecimiento bacteriano fueron mejores, tal como se ha indicado en otros estudios (Preethirani, y otros, 2015; Amer S. , 2015; Kabir, y otros, 2001).

Se ha reportado que el crecimiento de los bacilos, depende de la cantidad de sustratos esenciales como fuente de carbono y nitrógeno; cuando escasean, los bacilos se estresan y rápidamente forman esporas (Akpa E, 2007; Turnbull, 1991; Thomas, y otros, 2013). Por esta razón, se probaron medios nutritivos que resulten en el mayor crecimiento de las bacterias, siendo este la Infusión de Cerebro y Corazón bovino, que ha sido anteriormente usado con éxito para el cultivo de bacterias asociadas a mastitis (Preethirani, y otros, 2015). El tiempo de incubación de 48 horas para el crecimiento de los bacilos resultó ser el mejor lo que concuerda con el estudio de Kabir, y otros, (2001). Sin embargo por la nutritiva composición del medio, se pudo aumentar a 72 horas teniendo suficiente cantidad de biomasa para obtener un buen rendimiento durante la extracción de ADN.

La técnica de extracción de ADN aplicada va a influir en la cantidad, calidad y pureza de ADN obtenido, ya que los residuos químicos del procedimiento pueden afectar la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (Thomas, y otros, 2013). En este estudio se presentó una variante del método de extracción de ADN con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y Cloroformo Alcoholisoamílico (CAI), que es usualmente recomendado para células vegetales, ya

que debilita la pared celular permitiendo la liberación del material interior de la célula, por lo que puede ser utilizado con éxito en bacterias que tienen pared celular o que forman esporas (Bermúdez, y otros, 2016; Burbano. E, VOtero, & Álvarez, 2017). Este método ha sido probado exitosamente en estudios moleculares y filogenéticos de bacilos Gram positivos (Niemi, Heiskanen, Wallenius, & Lindström, 2001; Quinga G. , 2012; Yanez Torres, 2007; Párraga Solórzano, 2008; Faz Tapia, 2018; Factos & Estefanía, 2016).

Se optimizó el buffer de lisis, al probar la concentración de CTAB y  $\beta$ -mercaptoetanol, obteniendo un ADN de mejor calidad si el buffer tiene 1,2% de CTAB y 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bermúdez, y otros, (2017), donde logran rendimientos de ADN significativamente superiores si se utiliza  $\beta$ -mercaptoetanol y mayor concentración de CTAB. El  $\beta$ -mercaptoetanol ayuda a la desnaturalización de proteínas ya que rompe los puentes disulfuro, mientras que el CTAB forma complejos insolubles con las moléculas de ADN, lo que ayuda a su precipitación y eliminación de glicoproteínas (Molina & David, 2017). Es importante que el buffer de lisis conserve la estructura del ADN durante los pasos de ruptura y purificación, por lo que además de detergentes, debe contener sales (NaCl) para mantener la fuerza iónica y EDTA que actúa como inhibidor de DNAsas (Surzycki, 2000).

La separación de proteínas es un proceso sumamente importante, ya que las proteínas presentes en la leche pueden inhibir la PCR (Preethirani, y otros, 2015). Para esto se utilizan solventes orgánicos, en este caso cloroformo que desnaturaliza las proteínas y junto con el Alcohol isoamílico, en proporción 24:1 (v/v), previene la formación de espuma y facilita la separación de la fase acuosa y orgánica (Burbano. E, VOtero, & Álvarez, 2017). La separación se lleva a cabo gracias a las diferencias entre las propiedades físicas de los ácidos nucleicos y las proteínas (Quinga, 2012).

Se probó también el uso de RNAsa, demostrando que se tiene mejor integridad de ADN si no se utiliza esta enzima y las muestras se incuban durante la noche a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Los tratamientos con RNAsa no presentan diferencias significativas en cuanto a rendimiento ni pureza, pero si en la integridad del ADN. El uso de RNAsa se restringe únicamente a las muestras que se demuestre que presentan contaminación por RNA. Esta enzima rompe los enlaces fosfodiéster de las ribosas y grupos fosfato del RNA (Sambrook, Russell, & Sambrook, 2001). Pero se ha demostrado que el uso de temperaturas mayores a  $4^{\circ}\text{C}$  puede degradar el ADN, por lo que es recomendable mantener baja la temperatura de las muestras durante el proceso (Bermúdez, y otros, 2016).

Se validó el método optimizado al compararlo con el uso del Wizard genomic DNA purification Kit. En este trabajo, al aplicar el método de extracción con CTAB y CAI se obtuvieron concentraciones entre 38,45 y 362,12 ng/ul, radios de absorbancia  $A_{260/280}$  entre 1,835 y 2,1045 nm y radios  $A_{260/230}$  entre 0,914 y 2,1045 nm, mientras que con Kit las concentraciones fueron similares, pero los radios  $A_{260/230}$  en la mayoría de los casos fue superior a 2 variando entre 1,5535 y 3,2995 nm, lo que indica contaminación por ARN, a pesar de haber usado RNAsa (Faz Tapia, 2018). Se demostró que se puede extraer un ADN con buen rendimiento, pureza e integridad a partir de cultivos puros de bacilos Gram positivos, sin la necesidad de utilizar un kit específico para extracción de ADN (Figura 19). Esto se demostró previamente en otra optimización del método para la extracción de ADN a partir de muestras fecales de lobo de páramo (Quinga G. , 2012). Además, a pesar de que los kits comerciales son métodos más rápidos, estos representan un alto costo por reacción, lo que no es aplicable a la realidad el país, especialmente si se trabaja con un alto número de muestras (Quinga G. , 2012; El-Sayed, Awad, Abdou, & Castañeda, 2017).

La PCR ha sido ampliamente utilizada en la investigación y caracterización de organismos aislados (Amer S. , 2015; Bentahir, Ambroise, Delcorps, Pilo, & Gala, 2018; El-Sayed, Awad,

Abdou, & Castañeda, 2017; Timofte, y otros, 2014). En la leche existen varios inhibidores de PCR, por lo que una extracción y purificación de mala calidad da lugar falsos negativos (Thomas, y otros, 2013). También pueden existir falsos positivos si las condiciones de PCR son poco rigurosas o si el cebador diseñado no es lo suficientemente específico (Smith, Diggle, & Clarke, 2003). Entonces, el uso de controles internos ayuda a diferenciar entre resultados verdaderos y falsos. Se estableció una PCR usando el GoTaq® Green Master Mix, para amplificar el gen 16S de bacilos Gram positivos usando el par de primers universales 27F y 1492R (Amer, Aguilar, & Maza, 2015). Para este estudio se establecieron las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante, y las condiciones de ciclo optimizadas en este estudio concuerdan con las establecidas en el trabajo de Faz, (2018).

Los 11 productos de PCR del gen 16S para bacilos Gram positivos que presentaron bandas bien marcadas y definidas, se enviaron MacroGen para su secuenciación. Las secuencias recibidas se sometieron a un análisis de homología con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI utilizando la herramienta de BLAST, como lo han hecho en varios estudios de identificación (Amer S. , 2015; Faz Tapia, 2018; Rivas, 2017; El-Sayed, Awad, Abdou, & Castañeda, 2017; Elhaig & Selim, 2015; Mbuk, Kwaga, Bale, & Umoh, 2016; Molina & David, 2017; Lange, y otros, 2015). Se identificaron 3 especies de bacterias asociadas a mastitis: *Bacillus licheniformis* 55%, *Bacillus subtilis* 36%, *Bacillus velezensis* 9%, Amer (2017) indica que estas bacterias se encuentran distribuidas en el medio ambiente y que su posible reservorio es el suelo o el agua de lavado de ubres (Andrade & Sánchez, 2018). Se sugiere que las bacterias que típicamente se encuentran en el medio ambiente juegan un rol importante en las infecciones mamarias, coincidiendo con otros estudios realizados en el país (Amer, Aguilar, & Maza, 2015; Amer S. , 2015; Andrade & Sánchez, 2018).

*Bacillus subtilis*, es un microorganismo mesófilo y *Bacillus licheniformis* es termófilo facultativo, ambos se encuentran típicamente en el ambiente. En este estudio, ambas bacterias tuvieron una ocurrencia significativa, lo que concuerda con otros estudios de identificación (Amer S. , 2015; Nieminen, y otros, 2007). Es importante mencionar que algunas cepas de *B. licheniformis* tienen propiedades de toxicidad, por lo que están asociados a infecciones mamarias (Nieminen, y otros, 2007). También pueden producir péptidos antimicrobianos que pueden inhibir la actividad de otras bacterias (León, y otros, 2015).

*Bacillus velezensis* no ha sido reportada previamente en casos de mastitis. Esta cepa fue encontrada por primera vez en el río Velez en Malaga (Ruiz, Bejar, Martinez, Llamas, & Quesada, 2005). Esta bacteria fue descrita como productora de surfactantes. Su taxonomía basada en el gen 16S muestra homología con *Bacillus amylequefaciens* de 99,7% por lo que este gen puede no ser suficiente identificar la especie con precisión (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011). Por esto, es recomendable realizar análisis de secuencia basados en otras dianas moleculares y de coincidir el resultado, este sería el primer trabajo donde se reporta *Bacillus velezensis* como agente causal de mastitis.

Para demostrar la relación evolutiva de las 3 especies encontradas, se realizó un estudio de filogenia basándose en el gen (16S rRNA), para esto se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud y con 1000 bootstraps (Kuehn, 2013). Se ha reportado que este método presenta valores de bootstraps más altos que otros, además muestra enfoques más ventajosos, por lo que ha sido utilizado en varios estudios de filogenia bacteriana (Priest, 2004; Amer S. , 2015; Wang & Sun, 2009; Hernández, Prieto, Valencia, Moreno, & Santoyo, 2014; Kuang, y otros, 2009). En el árbol se incluyen 15 taxones divididos en dos grupos. Estos resultados son similares a los encontrados por Wang y otros, (200), donde se muestra que *B. velezensis* y *B.*

*amylequefaciens*, están dentro del grupo de *B. subtilis*. En este estudio se dividió el árbol en 3 grupos para demostrar su cercanía evolutiva.

El grupo I incluye todas las cepas de *Bacillus subtilis*, el grupo II las cepas de *B. velezensis* y *B. amylequefaciens* y el grupo III las cepas de *B. licheniformis*, siendo el grupo I y III homogéneos. El grupo II demuestra que la cepa encontrada es más reciente y se confirma que está más relacionada con *B. velezensis* que con *B. amylequefaciens*. El árbol está enraizado en el grupo formado por los organismos de referencia, *B. cereus* y *B. anthracis*, demostrando que no se relaciona evolutivamente con las bacterias halladas y que tienen un ancestro más antiguo que los grupos anteriores (Wang & Sun, 2009; Wang, Lee, Tai, & Kuo, 671-675).

Se observa que algunos taxones en los grupos no se encuentran separadas evolutivamente de sus cepas de referencia, es decir tienen un ancestro común reciente (Brinkman & Leipe, 2001). El gen 16S rRNA es una diana de acción para algunos antimicrobianos, provocando mutaciones que generan resistencia (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011), lo que sugiere la adquisición de genes de resistencia a antibióticos producto del tratamiento de esta enfermedad en Ecuador (Reva, 1995).

En este estudio se demuestra que la comparación de secuencias del gen 16S es una herramienta aceptable para realizar identificación y estudios filogenéticos entre bacterias (Lange, y otros, 2015; Gordon, 1973). Se logró identificar a nivel de especie, un total de 11 bacterias asociadas a mastitis y se logró establecer las relaciones filogenéticas y evolutivas a partir de un árbol construido mediante el método de máxima verosimilitud. Demostrando que las bacterias que afectan al ganado lechero en la parroquia Salinas de Guaranda son ambientales.



## CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

Se identificaron en total tres especies de bacilos Gram positivos en las siguientes proporciones: 55% *Bacillus licheniformis*, 36% *Bacillus subtilis* y 9% *Bacillus velezensis*.

En la base de datos NCBI no se han reportado estudios donde se relacione a *B. velezensis* con la mastitis bovina.

Se obtuvo mayor crecimiento bacteriano con formación de esporas, en medio de BHI, a 37°C durante 72h.

Se estandarizó el método CTAB/CAI para la extracción de ADN de bacilos Gram positivos esporulados aislados de muestras de leche de vacas infectadas con mastitis, demostrando tener mejor calidad de ADN que la extracción con kit Wizard genomic DNA purification. El ADN extraído por kit presentó mayor degradación y barridos.

Se amplificó el gen conservado 16S rRNA mediante PCR convencional, utilizando los primers 27F y 1492R, con bandas definidas a una temperatura de hibridación de 56°C.

El análisis filogenético basado en el gen 16S rDNA del género *Bacillus* presentó grupos homogéneos para *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*, pero no para *B. velezensis* y *amiloliquefaciens*.

## **CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES**

Se recomienda el uso de primers específicos y genes 5S rRNA, Gyr $\beta$ , Rpo $\beta$ , ISR o ITS para continuar con la identificación de bacilos Gram positivos asociados a mastitis bovina conservado en el cepario del laboratorio de microbiología de la carrera de ingeniería en Biotecnología.

Se sugiere extender el alcance de la investigación a otras zonas lecheras de la región sierra de Ecuador, para establecer la diversidad microbiana asociada a mastitis.

Al encontrarse bacterias ambientales en la leche de vacas con mastitis, se recomienda adoptar las medidas de prevención y control correspondientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akpa E, J. P. (2007). Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 101-8.
- Almeida, D. I. (2015). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test e identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche en la comunidad San Pablo Urco, Olmedo–Cayambe–Ecuador, 2014* . Cayambe: Universidad Politécnica Salesiana.
- Amer, S. (2015). *Epidemiología molecular de la bacteriana mastitis en el ganado vacuno en la provincia de El Oro, Ecuador: Impacto económico y medidas de control* . Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Amer, S., Aguilar, L., & Maza, W. (2015). Implication of environmental bacteria in bovine mastitis in Ecuador: A pilot Study.
- Andrade, C., & Sánchez, A. (2018). *Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la cooperativa de producción agropecaria "El Salinerito", provincia Bolívar-Ecuador*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Andrade, R. M., Espinoza, M. M., Rojas, J. A., Tirado, P. O., Salas, R. G., & Falcón, V. V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. . *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-16.
- Balarezo, K., & Poveda, M. (2018). *Determinacion del perfil sanitario del ganado bovino en la Coopertiva de Produccion Agropecuari "El Salinerito", Bolivar-Ecuador*. Sngolquí.
- Barkema HW, S. Y. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* , 1877–1895 .
- Bautista-Trujillo, G., Solorio-Rivera, J., Renteria-Solorzano, I., Carranza-German, S., Bustos-Martínez, J., Arteaga-Garibay, R., . . . Valdez-Alarcon, J. (2013). Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. . *Journal of Medical Microbiology*, 369-376.
- Bedolla, C., & Ponce de León, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-26.
- Bentahir, M., Ambroise, J., Delcorps, C., Pilo, P., & Gala, J. L. (2018). Sensitive and specific recombinase polymerase amplification set of assays for fast screening, detection and identification of *Bacillus anthracis* in a field setting. . *Applied and environmental microbiology*.

- Bermúdez, M., Guzmán, S., Orozco, M., Velázquez, J., Buenrostro, M., & Michel, C. (2016). Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*
- Bhatt, V., Patel, M., Joshi, C., & Kunjadia, A. (2011). Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Animal Biotechnology*, 163-169.
- Bjork, S., Bage, R., Kanyima, B., Andre, S., Nassuna-Musoke, M., Owiny, D., & Persson, Y. (2014). Characterization of coagulase negative staphylococci from cases of subclinical mastitis in dairy cattle in Kampala, Uganda. *Irish Veterinary Journal*.
- Blowey, R. (1995). *Mastitis control in dairy herds*. UK: Farming Press Books.
- Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., . . . Bettera, S. (2017). War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Revista Argentina de microbiología*.
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (. (2016). *Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiastancia, Ecuador*. Univerisdd Politecnica Salesiana.
- Booth, J. (1981). The importance of udder health in relation to milk quality improvement and control. *Milk Quality and Control*. Eds. J.D. Collins and J. Hannan. *University College Dublin*, 1-11.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 601-608.
- Brinkman, F., & Leipe, D. (2001). *Phylogenetic analysis: in Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. New York: Jon Wiley and Sons, Inc.
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030*. Earthscan: Food and Agriculture Organization (FAO).
- Burbano, E, C. B., VOtero, I., & Álvarez, S. (2017). *Manual de Biología Molecular: Procedimientos Básico*. Nariño: Editorial universitaria.
- Calvinho, L., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. *FAVE*.
- Castañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Baillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *SciELO*, 53-62.
- Chagunda, M., Friggens, N., Rasmussen, M., & Larsen, T. (2006). A Model for Detection of Individual Cow Mastitis Based on an Indicator Measured in Milk. *J Dairy Sci*, 89:2980-98.

- Claus D, B. R. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Contero, R. (2008). La calidad de la leche: un desafío en el Ecuador. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 25-28.
- Dalla-Costa, L. M., Morello, L. G., Conte, D., Pereira, L. A., Palmeiro, J. K., Ambrosio, A., . . . Raboni, S. M. (2017). Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 61-66.
- DANE. (2014). La Mastitis Bovina, enfermedad infecciosa de gran impacto en la producción lechera. *Boletín Insumos y Factores Asociados a la Produccion Agropecuaria*, 1-4.
- De Pinho Manzi, M., Nóbrega, D., Faccioli, P., Troncarelli, M., Menozzi, B., & Langoni, B. (2012). *Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis*. Obtenido de Res Vet Sci: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.010>
- dos Reis, C., Barreiro, J., Moreno, J., Porcionato, M., & Santos, M. (2011). Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *Journal of Dairy Science*, 4406-4412.
- Elhaig, M., & Selim, A. (2015). Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. . *Tropical Animal Health and Production*, 271-276.
- El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N., & Castañeda, H. (2017). Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*.
- Estevez. (19 de Diciembre de 2012). *Secuenciación Sanger*. Estados Unidos.
- Factos, A., & Estefanía, J. (2016). *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- FAO. (10 de septiembre de 2018). *Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura*. Obtenido de Portal Lácteo: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/>
- Faz Tapia, V. J. (2018). Aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo . *Universidad de las Américas*.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 1-15.
- Fessia, A., Dieser, S., & Odierno, L. (2018). Identificación de *Streptococcus uberis* aislados de muestras de leche bovina . *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus* , 82-87.
- Fonseca, L. S. (2015). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico del agente etiológico, en el centro de acopio*

*de leche ce la comunidad el Chaupi, Cayambe–Ecuador*. Cayambe: Univeridad Politécnica Salesiana.

- Fox, L., & Gay, J. (1993). Contagious Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 475-487.
- García, M. (1997). Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *Journal of Dairy Research*, 261-270.
- Garrigues, F. (18 de Septiembre de 2018). *Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación*. Obtenido de Revista Genética Médica: <https://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>
- Gazque, R. G. (2008). Mastitis Bovina. *Enciclopedia Bovina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 176-182.
- Gordon, R. E. (1973). The genus bacillus. *US Department of Agriculture handbook*, 109-126.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., & Sadaie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*
- Gowdaman, V., Kumar, R. M., Venkatachalam, S., & Prabakaran, S. R. (2014). Comparison of DNA fingerprinting analysis for identification of *Bacillus* species. *Int J Res Adv Technol*, 278-288.
- Graumann, P. (2012). *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. Caister Academic Press.
- Gregory, T. (2008). Understanding evolutionary trees. *Evo Edu Outreach* .
- Griffin, T. K. (1987). Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. . *International Dairy Federation Bulletin*, 211-224.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O., & Hogeveen, H. (2007). Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quaterly*, 18-31.
- Hernández, J., Prieto, C., Valencia, E., Moreno, G., & Santoyo, G. (2014). Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with  $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. *Genetics and Molecular Research*, 4967-4975.
- Herrera, J. (2005). *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA I*. Iztacala: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 7276-7280.
- INEC. (2018). *Encuesta de superficie y prduccion agropecuaria continua*. Quito: Instituto de estadísticas y censos.

- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., & Mushonga. (2015). Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. . *Journal of the South African Veterinary* .
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J of clinical microbiology*, 2761-2764.
- Jansen, J., Van den Borne, B., Renes, R., van Schaik, G., Lam, T., & Leeuwis, C. (2009). Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming, the influence of farmers' attitudes and behaviour. *Preventive Veterinary* , 210-223.
- K, R., Haine, D., Dohoo, I., & Revie, C. (2012). Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens-a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 6483-6502.
- Kabir, M. H., Ershaduzzaman, M., Giasuddin, M., Nazir, K. N., Mahmud, M., Islam, M. R., & Ali, M. Y. (2001). Prevalence and molecular detection of the causal agents of sub-clinical mastitis in dairy cows in Sirajganj and Pabna districts, Bangladesh. *ournal of Advanced Veterinary and Animal Research*,, 378-384.
- Kawata, K., Anzai, T., Senna, K., Kikuchi, N., Ezawa, A., & Takahashi, T. (2004). Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 237(1): 57-64.
- Koskinen, M., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., & Kelton, D. (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 952-959.
- Kuang, Y., Tani, K., Synnott, A., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H., & Tanji, Y. (2009). Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. . *Biochemical Engineering Journal*, 76-81.
- Kuehn, J. S. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PloS one*.
- Kumar, S., & Stecher, G. L. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* , 1547-1549.
- Lange, C., Brito, M., Reis, D., Machado, M., Guimaraes, A., Azevedo, A., . . . Meurer, I. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. . *Veterinary Microbiology*, 382-388.
- Le Maréchal, C. T. (2011). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Science & Technology*, 247-282.

- Lee, Y., Kim, H., Liu, C., & Lee, H. (2002). A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Journal of Microbiological Methods*, 245-250.
- León, M., Barboza, J., Lechuga, A., Valencia, M., Aguayo, D., Cedillo, C., & Gutierrez, A. (2015). Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. *BioMed research international*.
- Lituma, S. (2011). *Comercialización de Leche Bovina*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Macedo, M. &. (2008). *Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. Temas de bacteriología y virología médica*. Universidad de la República, Instituto de Higiene: FEFMUR.
- Madigan, M., Martinko, J., Barrachina, C., Berlanga, M., Gonzalo, M., Diaz, C., & Ruiz, F. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. México: Pearson Education.
- Mavangira, V., Angelos, J., Samitz, E., Rowe, J., & Byrne, B. (2013). Gangrenous mastitis caused by *Bacillus* species in six goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 836-843.
- Mbuk, E. U., Kwaga, J. K., Bale, J. O., & Umoh, J. U. (2006). Molecular identification of yeasts associated with raw cow milk from peri-urban farms in Kaduna State, Nigeria. *Citar*, 39-46.
- Mdegela, R., Ryoba, R., Karimuribo, E., Phiri, E., Loken, T., Reksen, O., . . . Urio, N. (2009). Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk on smallholder dairy farms in Tanzania. *Journal of the South African Veterinary Association*, 163-168.
- Melnick, R., Zidack, N., Bailey, B., Maximova, S., Gultinan, M., & Backman, P. (2005). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Crop Prot*, 46-56.
- Men, A. E., Wilson, P., Siemering, K., & Forrest, S. (2008). Sanger DNA sequencing. *Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*, 1-11.
- Mendoza, J., Vera, Y., & Peña, L. (2017). Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, Norte de Santander. *Rev Med Vet Zoot*, 11-24.
- Menzies, P. I., & Ramanoon, S. Z. (2001). Mastitis of sheep and goats. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*, 333-358.
- MINERD. (Noviembre de 2005). *Educando*. Obtenido de Portal de educación Dominicana: <http://www.educando.edu.do/centro-de-recursos/multimedia/infografias/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa/>



- Molina, M., & David, F. (2017). *Identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal "Chachimbiro" mediante técnicas microbiológicas y moleculares*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus Subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim Pol*, 495-508.
- NCBI. (9 de Noviembre de 2017). *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. Obtenido de Polymerase Chain Reaction (PCR): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Niemi, R. M., Heiskanen, I., Wallenius, K., & Lindström, K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of microbiological methods*, 155-165.
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A., Ali-Vehmas, T., Seppala, A., . . . Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Veterinary Microbiology*, 329-339.
- Nojima, H. (2005). *A group of genes which is differentially expressed in peripheral*.
- Økstad O.A., K. A. (2011). Genomics of *Bacillus* Species. En Z. W. Wiedmann M., *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. (págs. 29-53). New York: Food Microbiology and Food Safety. Springer.
- Olmos, A. F. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 5-9.
- Ostensson, K., Lam, V., Sjogren, N., & Wredle, E. (2013). Prevalence of subclinical mastitis and isolated udder pathogens in dairy cows in Southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 979-986.
- Ozanich, R. M., Colburn, H. A., Victry, K., Bartholomew, R. A., Arce, J. S., Heredia-Langner, A., . . . Bruckner-Lea, C. J. (2017). Evaluation of PCR systems for field screening of *Bacillus anthracis*. *Health security*, 70-80.
- Párraga Solórzano, P. K. (2008). *Diseño y evaluación de un sistema de alta capacidad para aislamiento de DNA para análisis de ácidos nucleicos de patógenos en muestras clínicas*. Sangolquí: ESPE.
- Peña, J., & Uffo, O. (2013). Producción de biofilm en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Rev. Salud Animal*, 189-196.
- Persson, Y., Nyman, A., & Gronlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36.

- Philpot, W., & Nickerson, S. (2000). Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. *Westfalia-Surge*, 44-53.
- Piktel, E., Pogoda, K., Roman, M., Niemirowicz, K., Tokajuk, G., Wróblewska, M., & Bucki, R. (2017). Sporicidal activity of ceragenin CSA-13 against *Bacillus subtilis*. *Scientific reports*, 44452.
- Pitkala, A., Haveri, M., Pyorala, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001- prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 2433-2441.
- Preethirani, P. L., Isloor, S., Sundareshan, S., Nuthanalakshmi, V., Deepthikiran, K., Sinha, A. Y., & Hegde, N. R. (2015). Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from bubaline subclinical mastitis in south India. *PloS one*, 10(11), e0142717.
- Priest, F. G. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of bacteriology*, 7959-7970.
- Promega Corporation. (Mayo de 2017). *Promega*. Obtenido de Wizard genomic DNA Purification Kit: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)
- Pylro, V. S., Vespoli, L. D., Duarte, G. F., & Yotoko, K. S. (2012). Detection of horizontal gene transfers from phylogenetic comparisons. *International journal of evolutionary biology*.
- Quinga, G. (2012). *Estandarización de un protocolo para la extracción de ADN de muestras fecales de lobo de páramo (Lycalopex culpaeus)*. Sangolquí: ESPE.
- Rabello, R. F., Souza, C., Duarte, R. S., Lopes, R., Teixeira, L. M., & Castro, A. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered.
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., & Graber, H. U. (2013). Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1): 53.
- Ramírez, N., Fernandez, J., & Palacio, L. (2018). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Rev. Med. Vet*, 75-87.
- Realpe, M. E. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomedica*, 106-109.
- Reva, O. N. (1995). Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 409-411.
- Rheims, H., Fruhling, A., Schumann, P., Rohde, M., & Stackebrandt, E. (1999). *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 795-802.

- Rivas, R. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal "Aguas Hediondas", ubicada en la provincia Carchi, cantón Tulcán, Ecuador*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana-Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México: Editorial médica panamericana.
- Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J. L., & Cullor, J. S. (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci*, 132-138.
- Rucci, E. (2013). *Computación eficiente del alineamiento de secuencias de adn sobre cluster de*. Facultad de Informática.
- Ruiz, A., Ponce, P., & Gomes, G. e. (2011). Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernanbuco, Brazil. *Revista de Salud Animal*, 57-64.
- Ruiz, C., Bejar, V., Martinez, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 191-195.
- Ruiz, G., Peña, R., & Remón, D. (2016). Mastitis bovina en Cuba. *Artículo de revisión. Rev. Prod. Anim.* , 39-50.
- Ruiz, R. (2008). Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico. *UNAM*.
- Salinerito. (2018). *Salinerito*. Obtenido de Economía solidaria: <http://www.salinerito.com/economia-solidaria/que-es-la-economia-solidaria>
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory .
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1978). The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS letters*, 107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 5463-5467.
- Scheffers, D. J. (2004). PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery. *Journal of bacteriology*, 5153-5156.
- Smith, K., Diggle, M., & Clarke, S. (2003). Comparison of Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of Bacterial Genomic DNA from Whole-Blood Samples . *J of clinical microbiology*, 2440–2443 .
- Surzycki, S. (2000). Basic techniques in Molecular Biology . *Heidenberg: Springer-Verlag Berlín*.

- Swartz, T., & Petersson, C. (2016). *Bacillus* spp. A practical summary for controlling mastitis. *Virginia Tech*.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 512-526.
- Tenhagen, B., Koster, G., Wallmann, J., & Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science* , 2542–2551 .
- Thomas, M., Shields, M., Hahn, K., Janzen, T., Goji, N., & Amoako, K. (2013). Evaluation of DNA extraction methods for *Bacillus anthracis* spores isolated from spiked food samples. *Journal of Applied Microbiology* , 156-162.
- Timofte, D., Maciuca, I., Evans, N., Williams, H., Wattret, A., Fick, J., & Williams, N. (2014). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12  $\beta$  lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 789-794.
- Tortora, G. J. (2007). *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana.
- Turnbull, P. C. (1991). *Bacillus*. *Manual of clinical microbiology*. 296-303.
- USDA. (19 de Septiembre de 2018). *United States Department of Agriculture*. Obtenido de Foreign Agriculture Service: <https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>
- Viguié C, A. S. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. . *Trends Biotecnol*, 486-493.
- Vizcaíno, D. (2014). *Manual de Buenas Prácticas Pecuarias de producción de leche*. Agrocalidad.
- Waikagul, J., & Thakham, U. (2014). Approaches to research on the systematics of fish-borne trematodes. *Academic Press*.
- Wang, L., Lee, F., Tai, C., & Kuo, H. (671-675). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2008.
- Wang, W., & Sun, M. (2009). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*, 505-521.
- Watters, M., Barkema, H., Leslie, K., von Keyserlingk, M., & DeVries, T. (2014). Relationship between postmilking standing duration and risk of intramammary infection in freestall-housed dairy cows milked 3 times per day. *Journal of Dairy Science*, 3456-3471.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., & Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 697-703.

- Weising, K. (2005). DNA fingerprinting in plants and fungi; Principles, methods, and applications. 55-56.
- Wellenberg, G. J., Van der Poel, W., & Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 2-21.
- Wolter, W., Castañeda, V., Kloppert, B., & Zschoeck, M. (2002). *La Mastitis Bovina*. Guadalajara: Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse, Universidad de Guadalajara.
- Wu, F., Doyle, M., Beuchat, L., Wells, J., Mintz, E., & Swaminathan, B. (2000). Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *Journal of food protection*, 568-572.
- Yanez Torres, P. I. (2007). *Diseño y optimización de un sistema de detección de Mycobacterium tuberculosis complex a partir de cultivos aislados de muestras clínicas y cepas tipo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Sangolquí: ESPE.
- Yera, G., & Ramírez, W. (2016). La prevalencia de mastitis clínica en vacas mestizas Holstein x Cebú. *REDVET*, Vol. 17(3), 1-7.
- Zhang, L., Xu, Z., & Patel, B. (2007). *Bacillus decisifrondis* sp. nov., isolated from soil underlying decaying leaf foliage. *nt. J. Syst. Evol. Microbiol.*, nt. J. Syst. Evol. Microbiol.