



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Aislamiento, caracterización e identificación de enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de porcinos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo

Autores: Narváz Morales, María Margarita y Puchaicela Soliz, Adriana Lisbeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Directora: Naranjo Gaybor, Sandra PhD.

agosto del 2022

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN: 09/10/13

CÓDIGO: SGC.DI.260

VERSIÓN: 1.1



En aguas residuales provenientes de desechos de porcinos se ha encontrado carga bacteriana, posiblemente resistente a antimicrobianos, esto debido al mal uso de los antibióticos en la cría de cerdos (Partridge, 2015).



Dentro de la carga bacteriana contaminante existe la presencia de diferentes géneros de enterobacterias patógenas, en esta familia existen enterobacterias que han logrado generar un mecanismo de resistencia a antibióticos, los cuales han sido ocupados ampliamente para tratar y controlar la propagación de enfermedades en la producción porcícola

Objetivo general

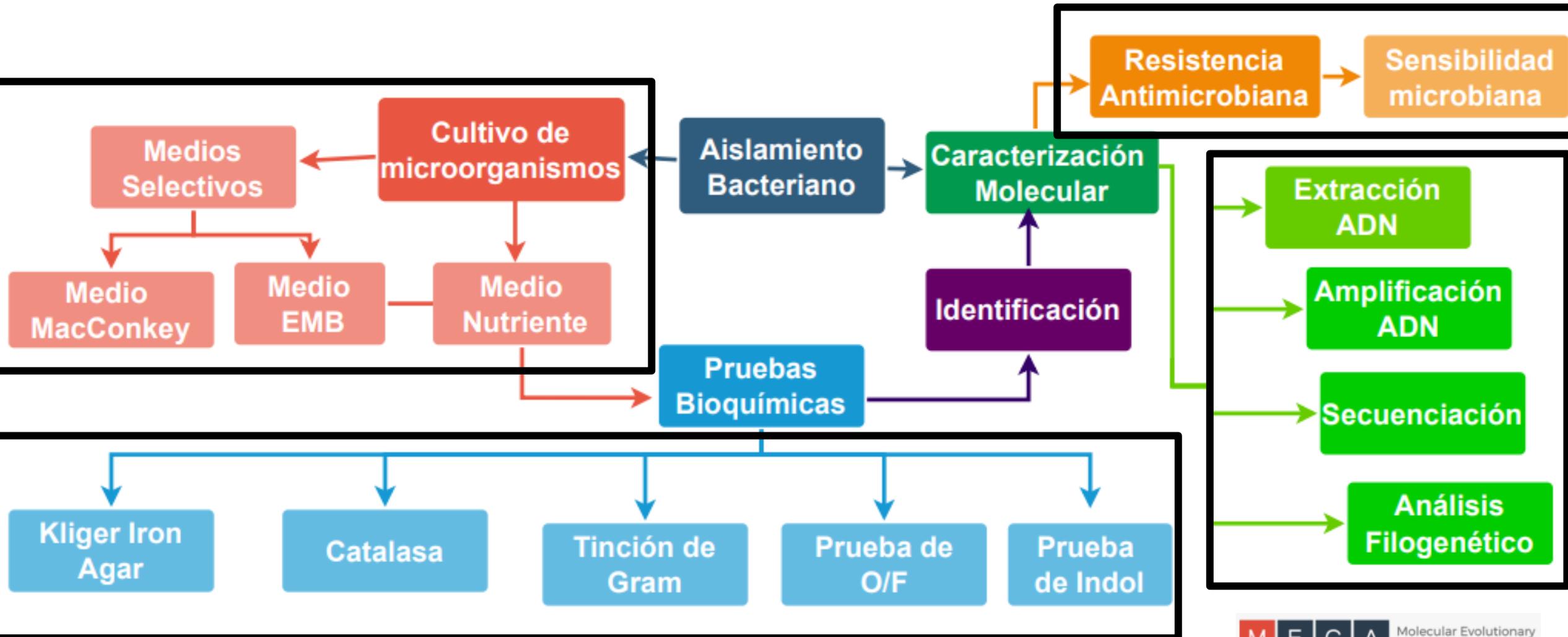
Aislar, caracterizar e identificar enterobacterias provenientes de las zonas de descarga de desechos líquidos de porcinos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.

Objetivos Específicos

- Aislar e identificar enterobacterias mediante la aplicación de técnicas bioquímicas y microbiológicas.
- Analizar la resistencia a antibióticos mediante la técnica de antibiograma por difusión con discos
- Caracterizar por técnicas moleculares enterobacterias aisladas



METODOLOGÍA

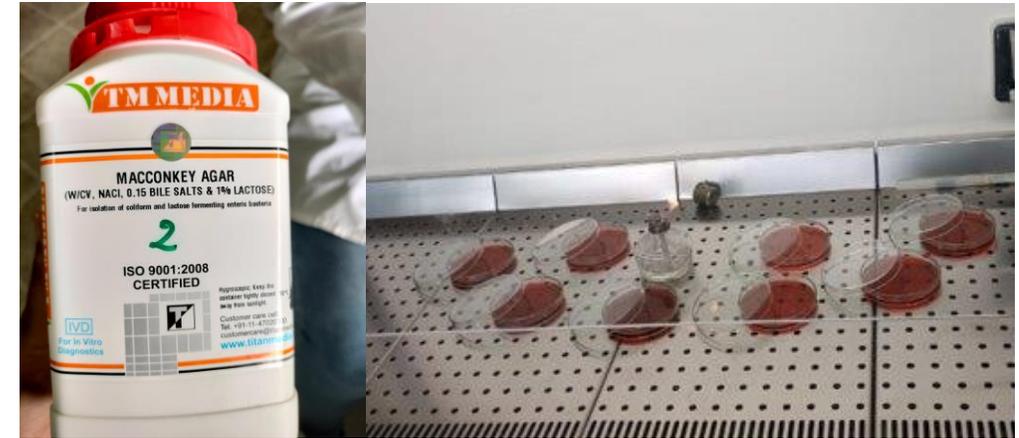


Aislamiento

Obtención de la muestra



Medio de Cultivo MacConkey



$$UFC/ml = \frac{A \text{ colonias enumeradas (media)}}{B \text{ ml sembrados}} \times \frac{1}{\text{Factor de concentración}}$$

Medio de Cultivo EMB



Pruebas Bioquímicas

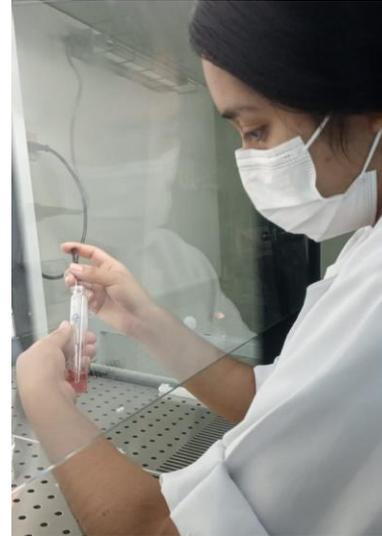
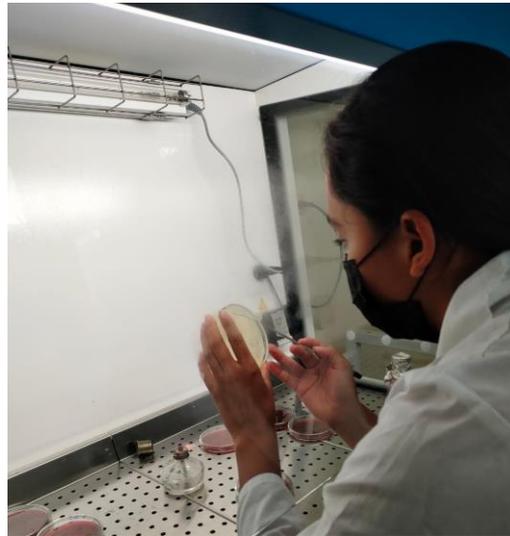
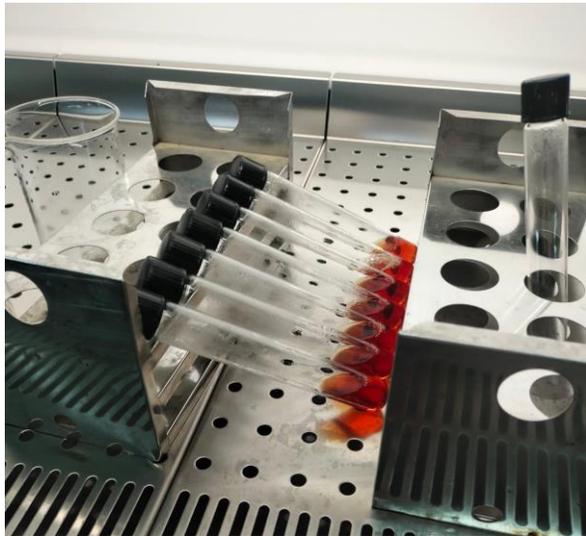
Kliger Iron Agar

Tinción de Gram

Catalasa

Prueba de O/F

Prueba de Indol



Caracterización molecular

- Extracción de ADN
- Secuenciación
- Amplificación
- Análisis filogenético

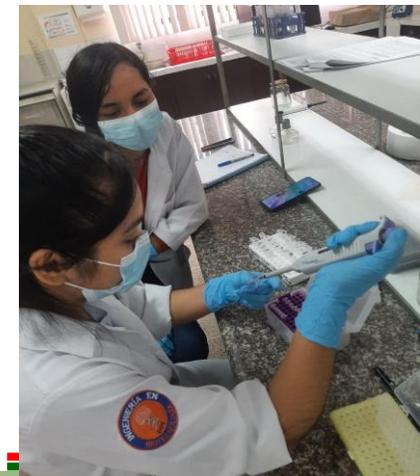
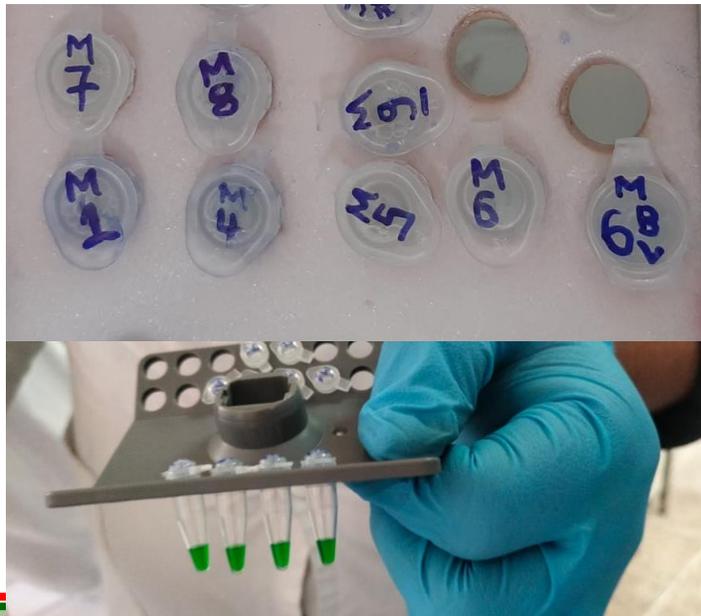
Cebadores (5' – 3')
 F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)
 R (ACGGATACCTTGTTACGACTT)

Tamaño
amplímero
 1500 pb

Referencia
Bibliográfica
 (Hou et al., 2018)

Tabla 1
Componentes utilizados en la PCR

Reactivo	Unidad	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de reacción (µL)	Volumen de reacción (µL)
Agua Ultrapura	-	-	-	10,5	84
BlasTaq 2X PCR	x	2x	2x	12,5	100
MasterMix					
Forward	µM	100	10	1	8
Reverse	µM	100	10	1	8
ADN				1	8



Antibiograma



Solución salina, 10 ml por tubo

Con hisopo estéril se sembró, Mueller-Hinton

Se midió los halos de inhibición (mm)

Se colocó los disco con una pinza estéril

Incubó por 24 horas a 37°C



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Aislamiento

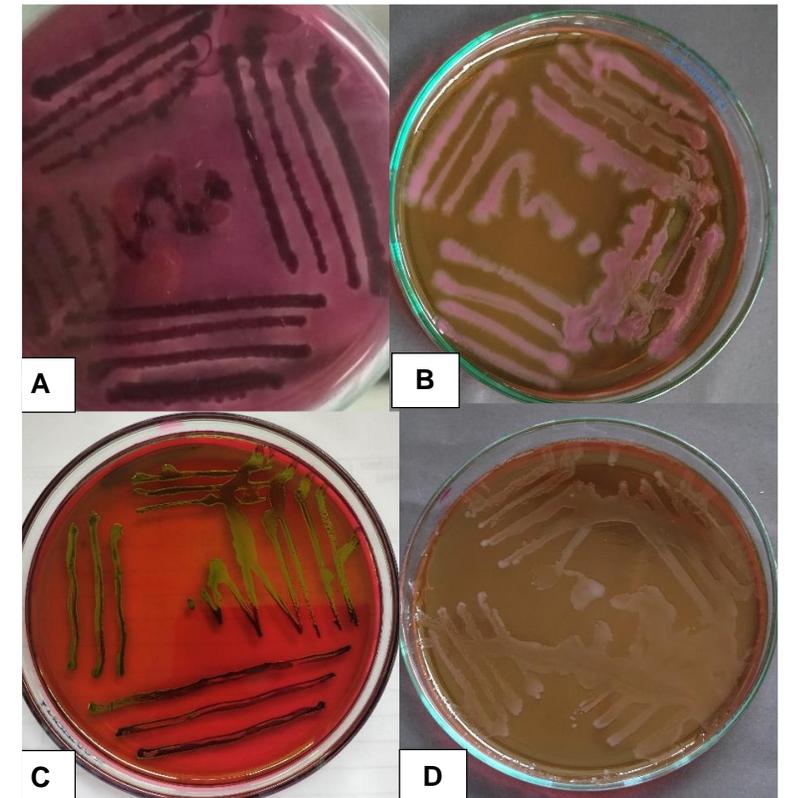
Conteo de coliformes totales



Medio de Cultivo MacConkey



Medio selectivo eosina y azul de metileno (EMB)



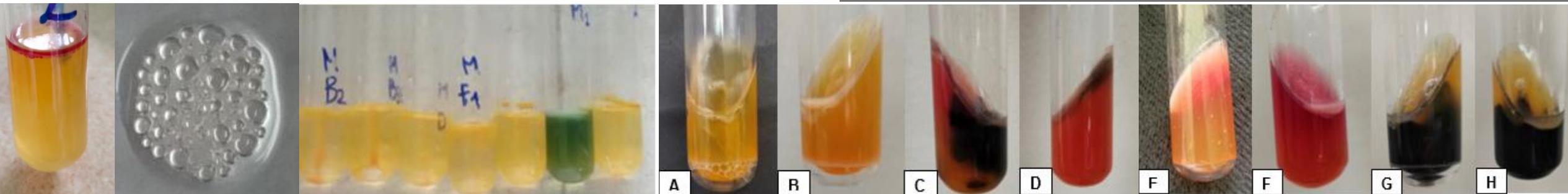
Pruebas Bioquímicas

Tabla 2
Pruebas bioquímicas para la identificación de los aislados cultivado

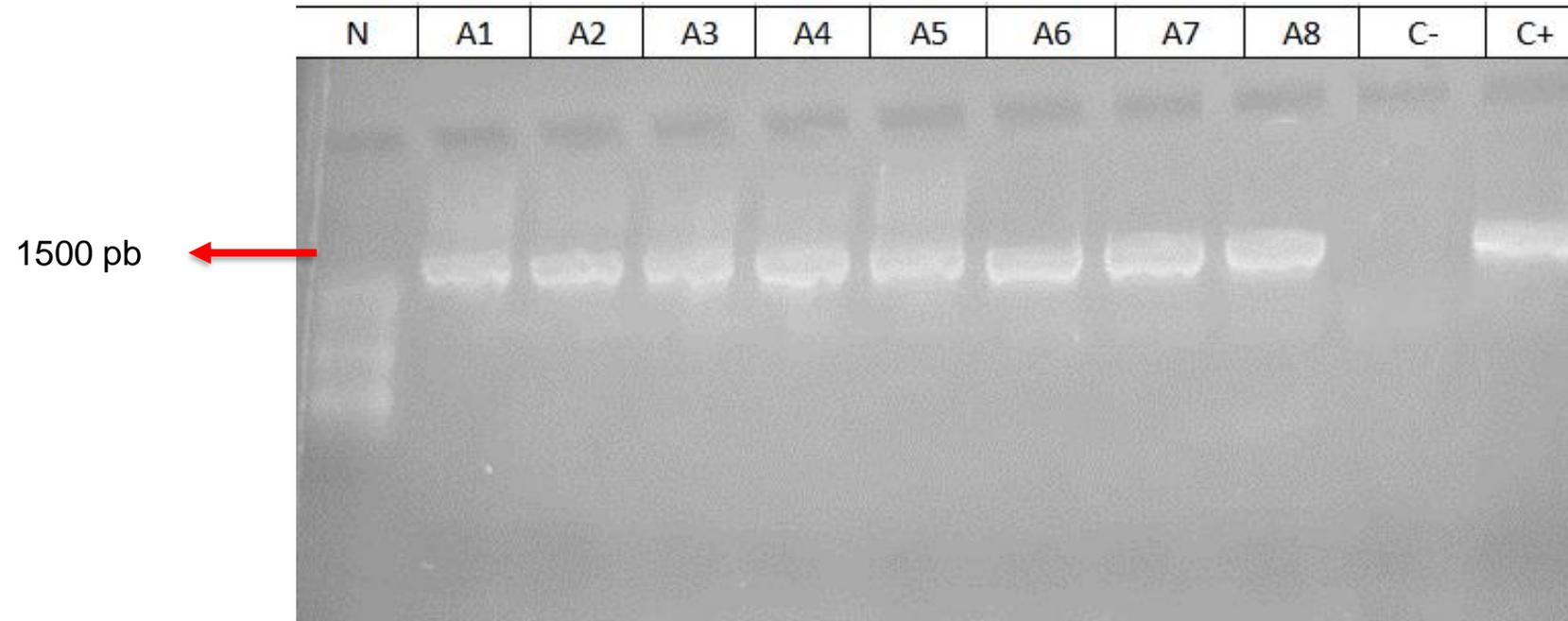
Aislado	Catalasa	Indol	O/F	Tinción de Gram
Aislado 1	+	+	F	Bacilo Gram negativo
Aislado 2	+	-	F	Cocobacilos Gram negativos
Aislado 3	+	-	F	Bacilo Gram negativo
Aislado 4	+	-	F	Bacilos Gram negativos
Aislado 5	+	-	F	Cocobacilos Gram negativo
Aislado 6	+	-	O	Bacilo Gram negativos
Aislado 7	+	+	F	Bacilo Gram negativos
Aislado 8	+	+	F	Bacilos Gram negativos

Tabla 3
Resultados obtenidos en la prueba de Kligler Iron Agar

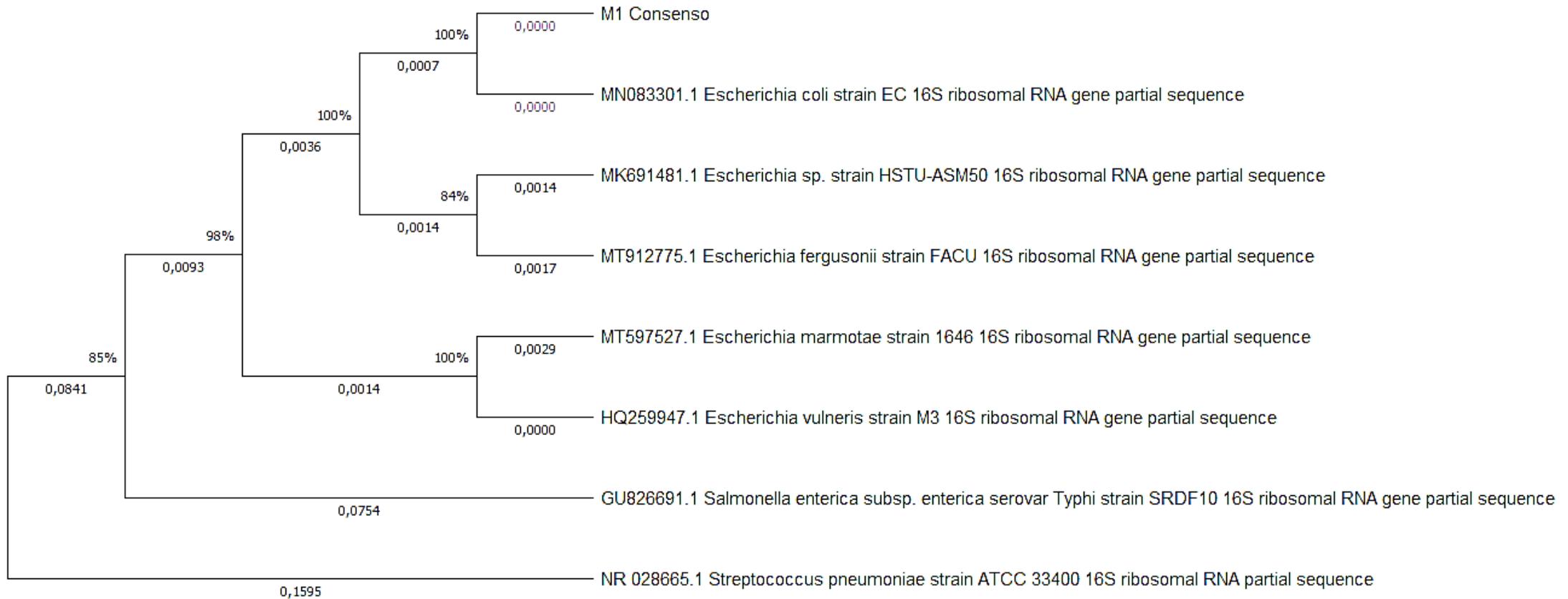
Aislados	Superficie/Fondo	Producción de gas	Producción de SH_2
Aislado 1	A/A	+	-
Aislado 2	A/A	+	-
Aislado 3	K/A	-	+
Aislado 4	K/K	-	+
Aislado 5	K/A	-	-
Aislado 6	K/K	-	-
Aislado 7	A/A	+	+
Aislado 8	A/A	-	+



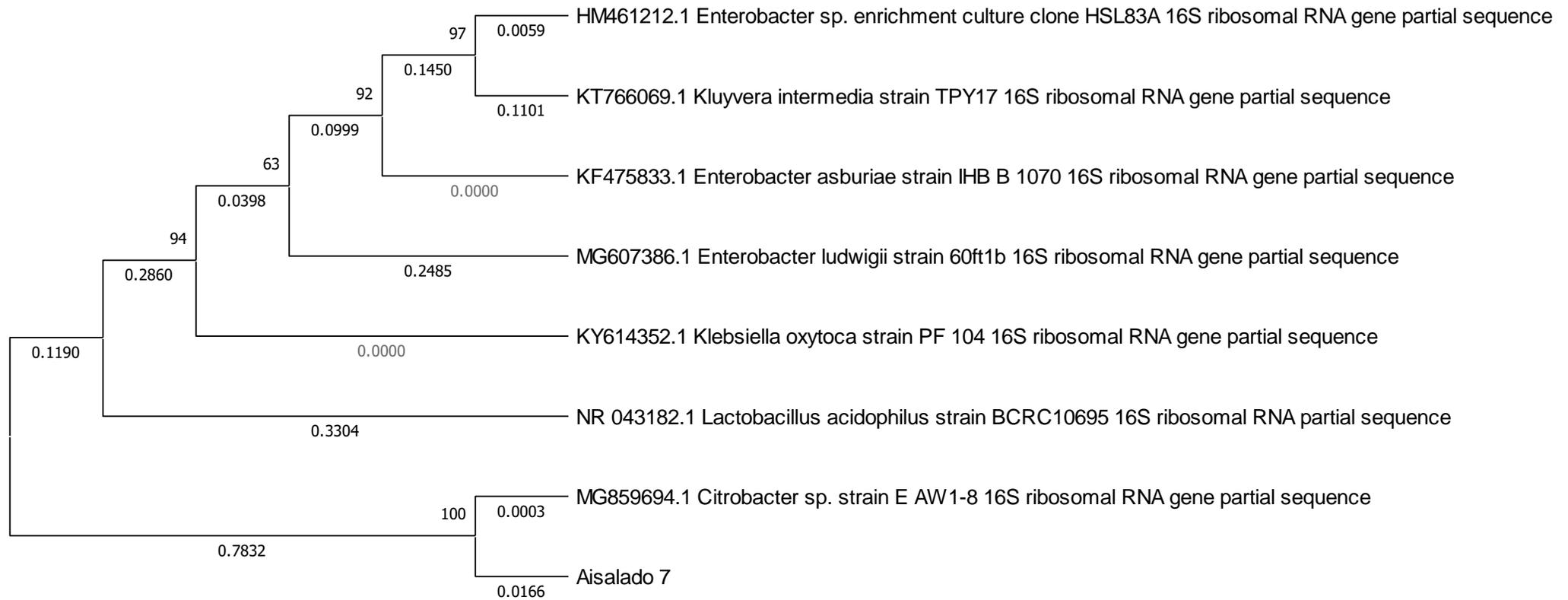
Caracterización molecular



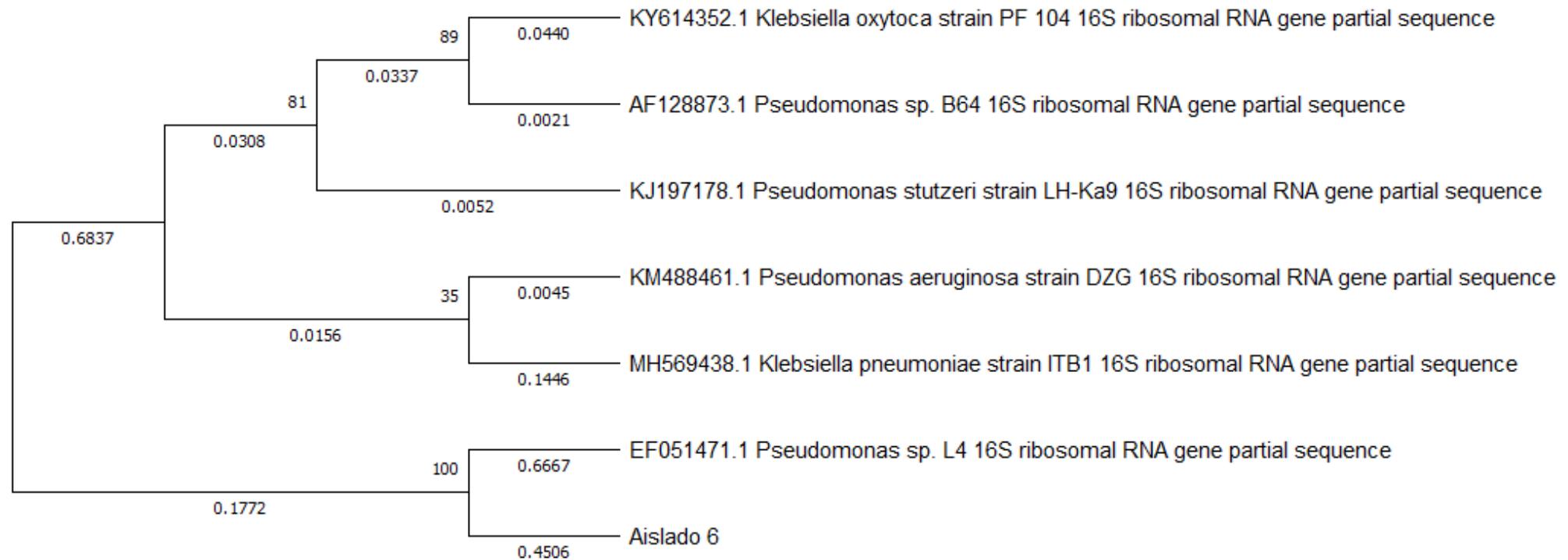
Árbol filogenético de *Escherichia coli*



Árbol filogenético de *Citrobacter* sp



Árbol filogenético del *Pseudomona* spp.



Diseño Experimental

Tabla 4

Análisis de varianza para el halo de inhibición

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Factor A (Bacterias)	356,9	4	89,225	101,61	0,0000
B: Factor B (Antibiótico)	1843,65	3	614,55	699,89	0,0000
C: Repeticiones	0,6333	2	0,316667	0,36	0,6996
INTERACCIONES					
AB	1710,43	12	142,536	162,33	0,0000
RESIDUOS	33,3667	38	0,87807		
TOTAL (CORREGIDO)	3844,98	59			

Tabla 5

Resultados de la prueba de significancia para el Factor A (Bacterias)

Enterobacterias	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>Salmonella typhi</i>	12	14,08	0,270504	A
<i>Pseudomona spp</i>	12	15,67	0,270504	B
<i>Escherichia coli</i>	12	16,42	0,270504	B
<i>Citrobacter spp.</i>	12	17,58	0,270504	C
Control	12	21,33	0,270504	D

Tabla 6

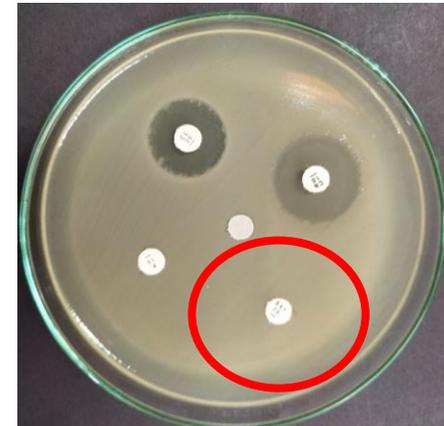
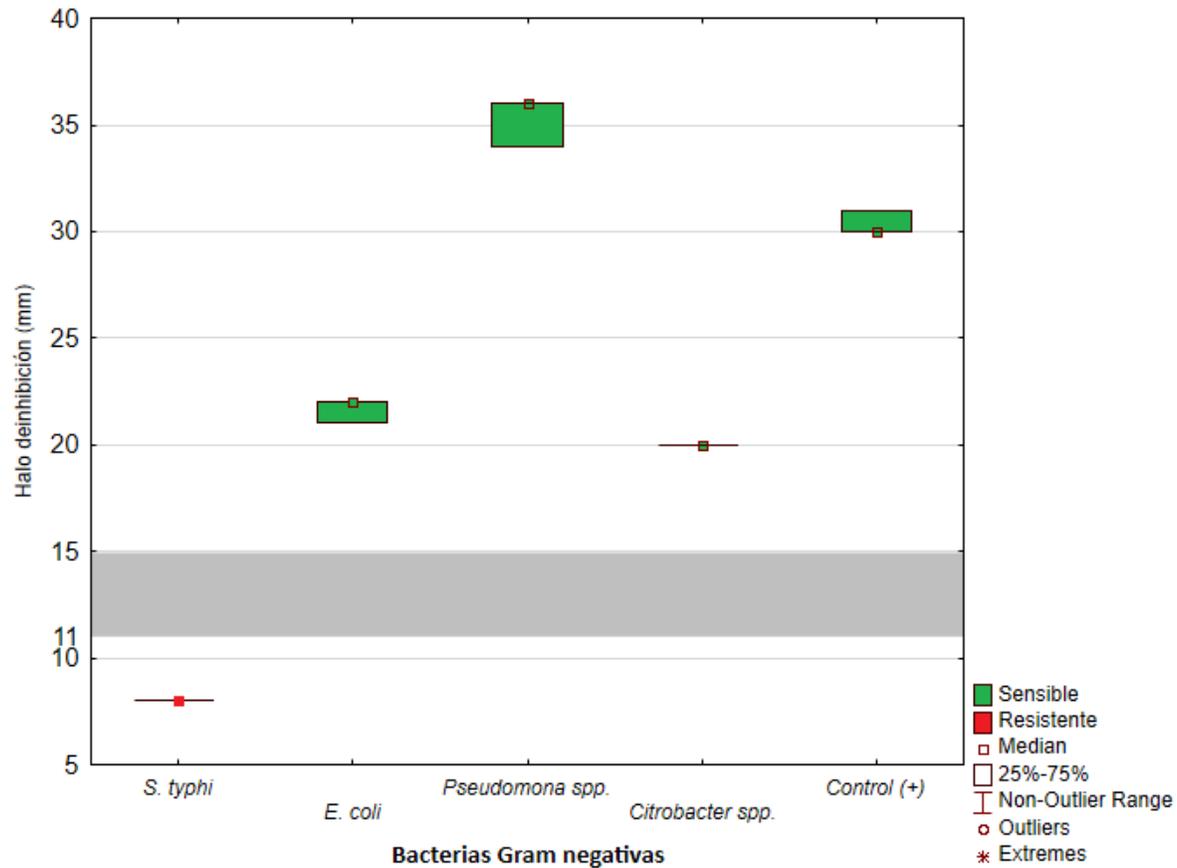
Resultados de la prueba de significancia Factor B (Antibiótico)

Antibiótico	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Penicilina	15	8,07	0,241946	A
Cefalexina	15	17,47	0,241946	B
Gentamicina	15	19,47	0,241946	C
Trimetoprima/Sulfametoxazol	15	23,07	0,241946	D



Antibiograma

Trimetoprima/Sulfametoxazol [25MCG]



S. typhi



E. coli

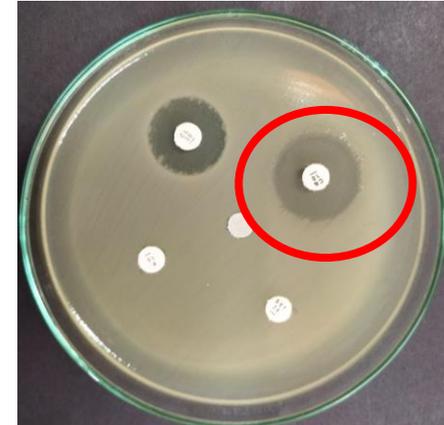
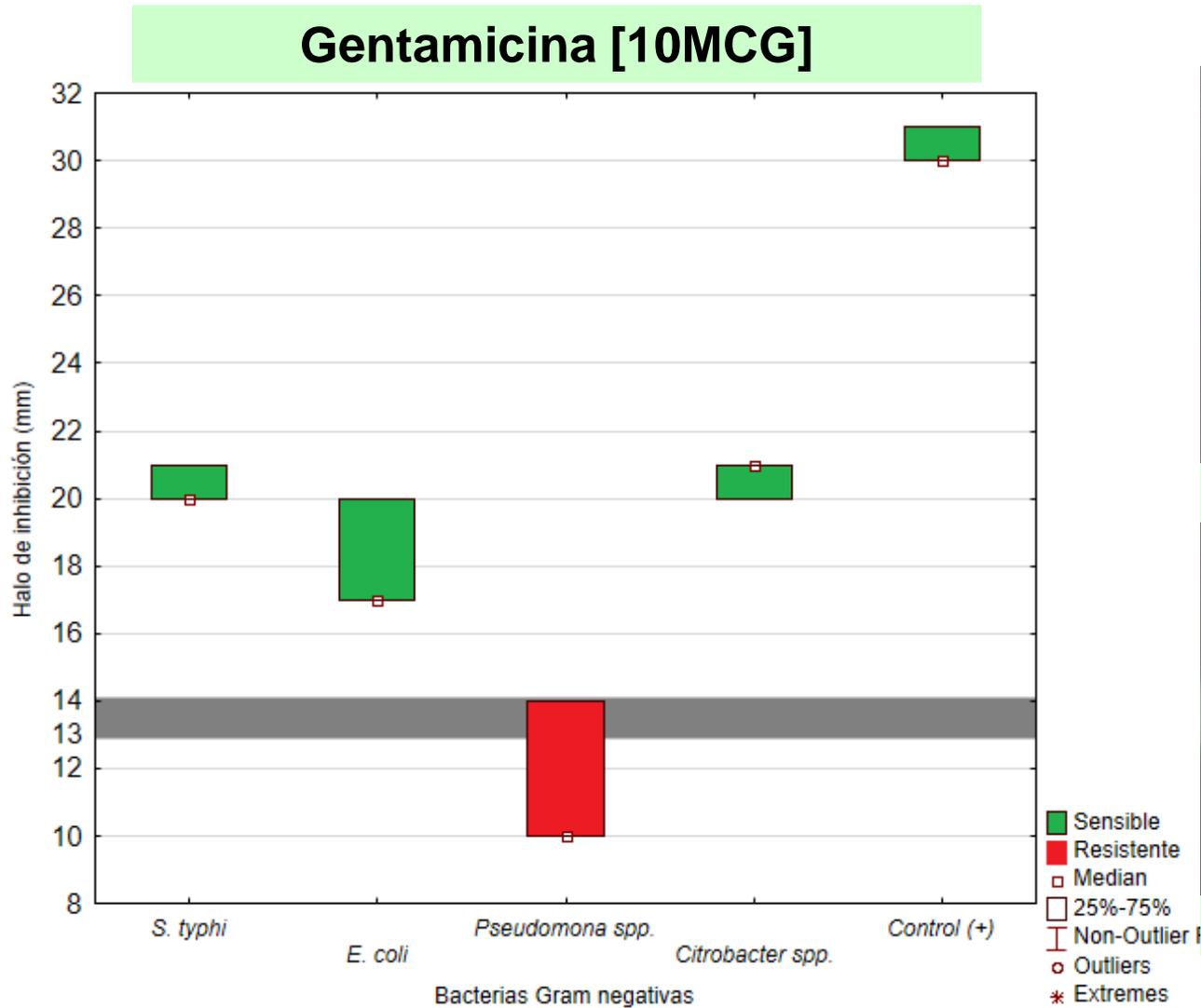


Pseudomona spp.



Citrobacter spp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



S. typhi



E. coli

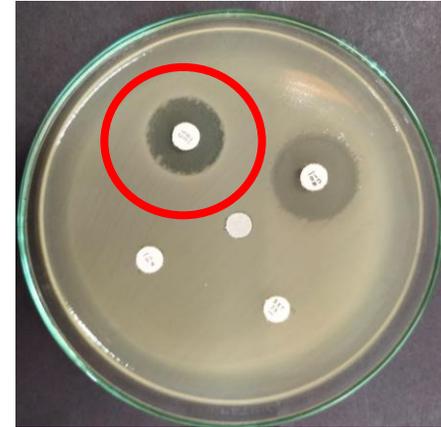
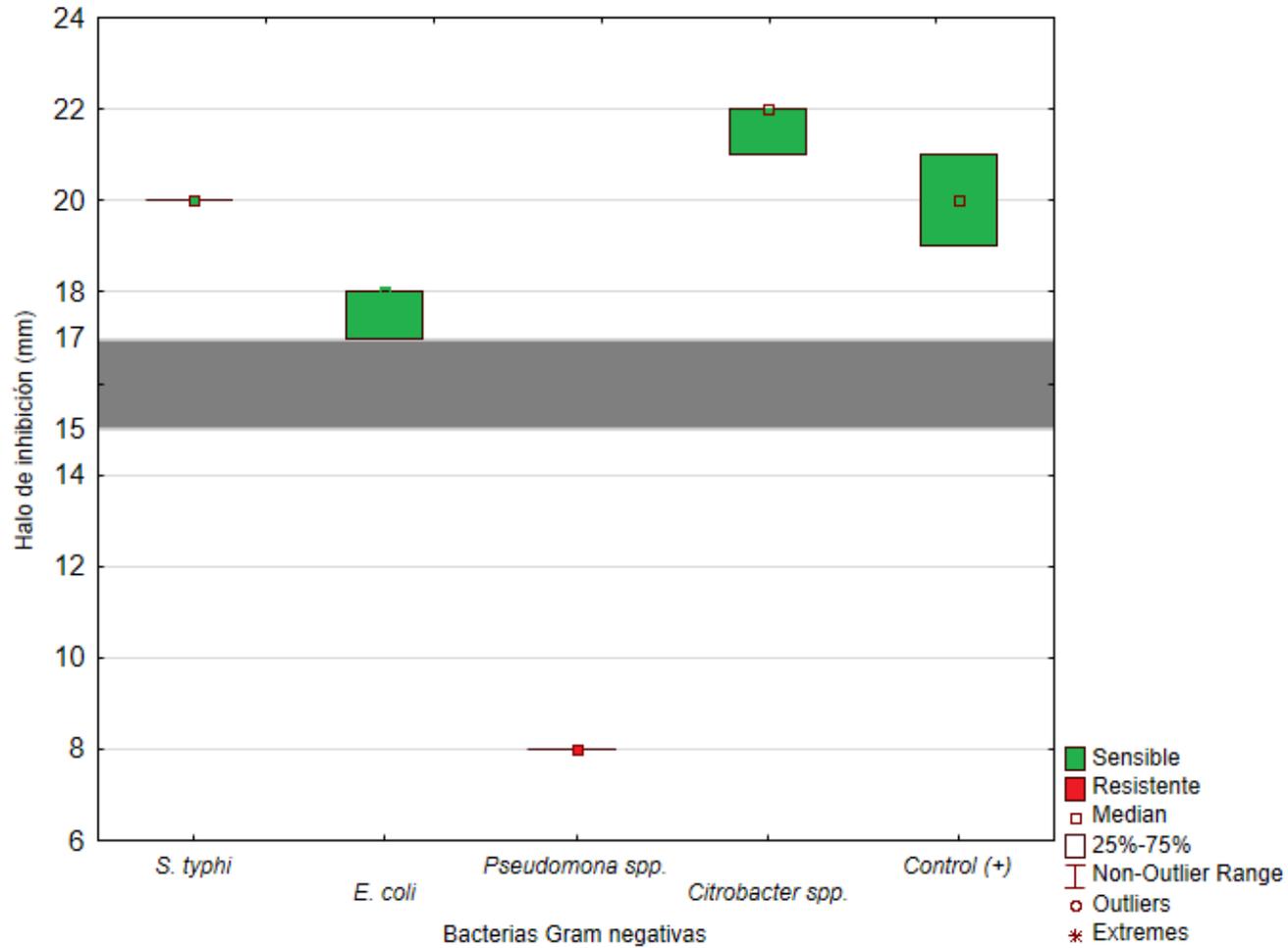


Pseudomona spp

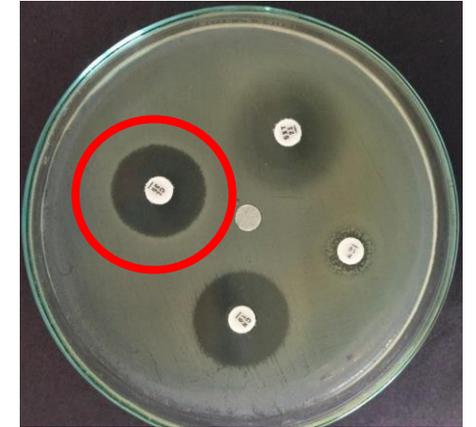


Citrobacter spp

Cefalexina [30MCG]



S. typhi



E. coli



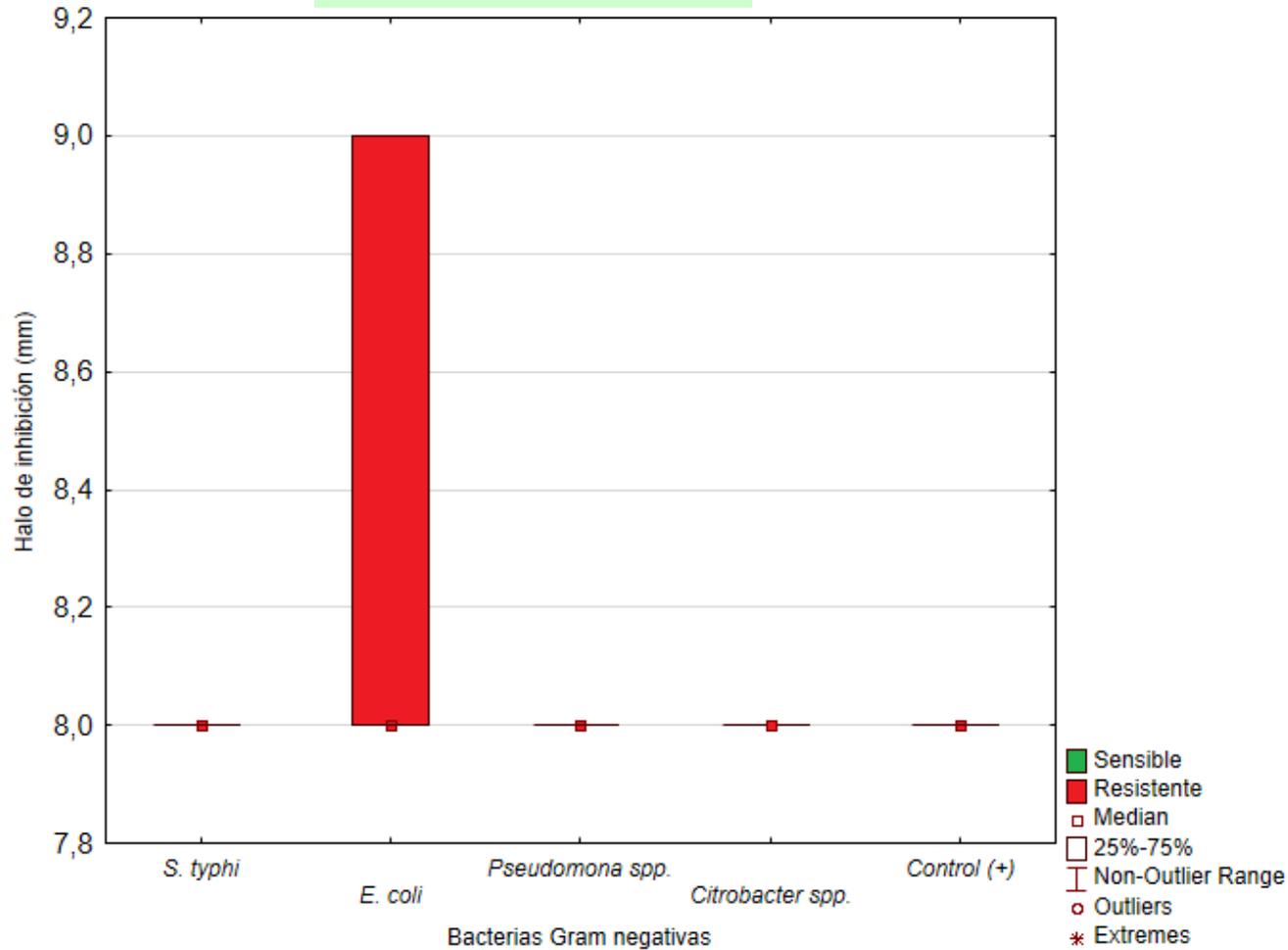
Pseudomona spp



Citrobacter spp

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Penicilina [10iu]



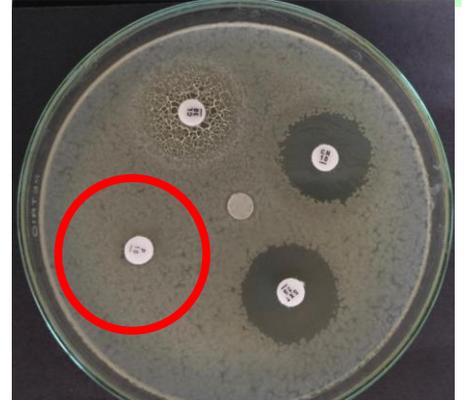
S. typhi



E. coli



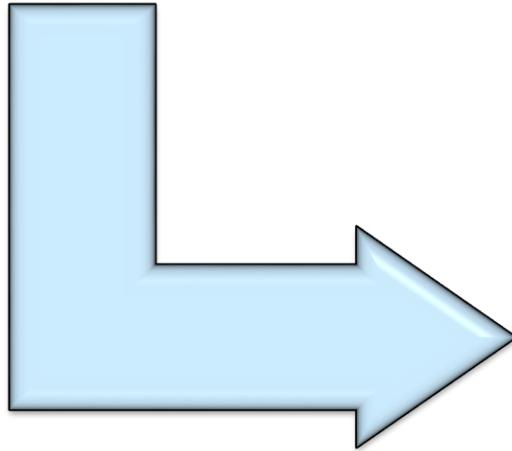
Pseudomona spp



Citrobacter spp

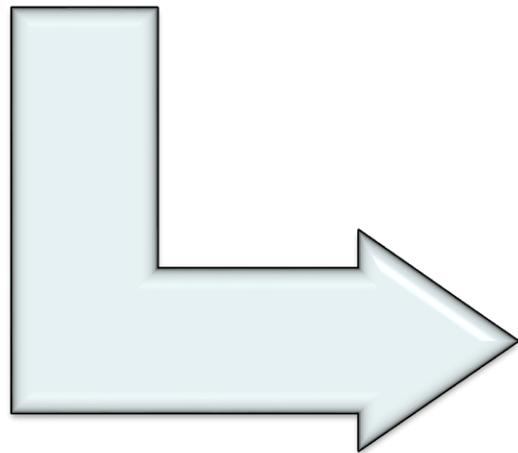


Se logró aislar e identificar mediante caracterización bioquímica y molecular cuatro bacterias de la clase Gammaproteobacteria, de las cuales tres pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y una a la familia Pseudomonadaceae. Estas fueron *Citrobacter spp*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas spp* respectivamente.



Mediante la técnica de antibiograma por difusión con disco determinamos la susceptibilidad antimicrobiana, donde *Salmonella typhi* presentó resistencia adquirida a Trimetoprima/Sulfametoxazol y en *Pseudomonas spp* presentó resistencia a cefalexina y gentamicina.

Para la identificación presuntiva por técnicas microbiológicas y bioquímicas, se debe tener en cuenta que, los microorganismos a menudo dan resultados contradictorios, ya sea por el tipo de medio utilizado durante el aislamiento, el cultivo y el mantenimiento, o por mutación. Por ello, se recomienda realizar la mayor cantidad de pruebas bioquímicas para tener mejores posibilidades de una detección acertada.



Se recomienda estandarizar el protocolo de extracción de ADN para enterobacterias, de manera que, se garantice la pureza de las muestras, así como, la ausencia de contaminantes para un mejor análisis y amplificación.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA