



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

Narváez Morales, María Margarita y Puchaicela Soliz, Adriana Lisbeth

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

16 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Identical Words	74
Words with Minor Changes	30
Paraphrased Words	62
Omitted Words	1629

Firma:



Naranjo Gaybor, Sandra Judith PhD.

C.C.: 1709384422

Directora del proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"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 de Santo Domingo"** fue realizado por las señoritas **Narváez Morales María Margarita y Puchaicela Soliz Adriana Lisbeth**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**SANDRA JUDITH
NARANJO GAYBOR**

Naranjo Gaybor, Sandra Judith. PhD.

C.C.: 1709384422

Directora del proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Nosotras, **Narváez Morales María Margarita y Puchaicela Soliz Adriana Lisbeth**, con cédulas de ciudadanía 1720788262 y 2350688301, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **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** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto del 2022

Firmas:

Narváez Morales María Margarita

C.C.: 1720788262

Puchaicela Soliz Adriana Lisbeth

C.C.: 2350688301



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Nosotras **Narváez Morales María Margarita y Puchaicela Soliz Adriana Lisbeth**, con cédulas de ciudadanía 1720788262 y 2350688301, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **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** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de agosto 2022

Firmas:

Narváez Morales María Margarita

C.C.: 1720788262

Puchaicela Soliz Adriana Lisbeth

C.C.: 2350688301

Dedicatoria

Margarita Narváez

Dedico este trabajo a mis padres y a Dios por impulsarme en mi formación académica, especialmente a mi madre por apoyarme incondicionalmente y confortarme en los momentos difíciles.

Adriana Puchaicela

Quiero dedicar el presente trabajo a las personas más importantes y que siempre han estado presente durante el transcurso de mi formación académica, que con esfuerzo y dedicación me han visto lograr con éxito; mi familia, mis padres Ángel Puchaicela y Carmen Soliz por recordarme cada día que puedo ser capaz de lograr todas mis metas, confiando en Dios y trabajando con ahínco para lograrlo.

Agradecimiento

A la Dr. Sandra Judith Naranjo Gaybor a quien le expresamos nuestro más sincero agradecimiento por guiarnos en el trabajo de integración curricular, por su tiempo, paciencia y conocimientos brindados.

Al Dr. Armando Reyna Bello por estar presente a lo largo de nuestra formación académica, motivándonos a continuar por el camino de la ciencia y siempre estar dispuesto a ayudarnos.

Agradecemos a todos nuestros amigos por las experiencias compartidas durante toda la carrera universitaria.

A nuestros padres y hermanos por inspirarnos y alentarnos en nuestros estudios, confiando en nuestras capacidades y habilidades para lograr todas las metas propuestas.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Tablas	12
Lista de Abreviaturas.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Planteamiento del problema	16
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivos de la investigación.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos Específicos.....	18
Capítulo II: Marco Teórico	19
Microorganismos presentes en aguas residuales porcinas	19

Identificación de bacterias aerobias Gram- negativas	19
Enterobacterias.....	20
Características para la identificación inicial	21
Tinción Gram.....	21
Morfología de las colonias	22
Medios selectivos	22
Morfología	27
Antibióticos utilizados en Porcinos	29
β-lactámicos	29
Capítulo III: Materiales y métodos	33
Localización	33
Obtención de la muestra.....	33
Diluciones Seriadas	34
Conteo de coliformes totales.....	34
Aislamiento microbiológico.....	34
Identificación bioquímica.....	35
Prueba de Kliger Iron Agar (KIA)	35
Tinción de Gram.....	35
Prueba catalasa	35
Prueba de Indol.....	35
Prueba óxido/ fermentación.....	35

	10
Caracterización molecular.....	36
Extracción de ADN	36
Amplificación de ADN.....	37
Secuenciación	38
Análisis filogenético	38
Resistencia a antibióticos.....	39
Diseño experimental	39
Factores y niveles	40
Tratamientos a comparar	41
Tipo de diseño experimental.....	42
Capítulo IV: Resultados y discusión	43
Conteo de coliformes totales.....	43
Aislamiento microbiológico.....	43
Identificación bioquímica.....	48
Caracterización molecular.....	52
Análisis filogenético	54
Resistencia a antibióticos.....	59
Capítulo V: Conclusiones	70
Capítulo VI: Recomendaciones	71
VII. Bibliografía	72

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Morfología de Enterobacterias</i>	28
Figura 2 <i>Estructura química básica de las diferentes familias de β-lactámicos</i>	30
Figura 3 <i>Mecanismo de acción de los betalactámicos</i>	31
Figura 4 <i>Zona de recolección de la muestra y posterior sedimentación</i>	33
Figura 5 <i>Cultivo de microorganismos Gram negativos en medio de cultivo MacConkey</i>	44
Figura 6 <i>Crecimiento de bacterias en agar EMB</i>	47
Figura 7 <i>Resultados de la prueba de KIA</i>	49
Figura 8 <i>Prueba de catalasa</i>	50
Figura 9 <i>Reacciones obtenidas en la prueba de O/F</i>	50
Figura 10 <i>Tinción Gram de los aislados seleccionados para identificación molecular</i>	51
Figura 11 <i>Fragmentos de ADN genómico-amplificados visualizados por electroforesis</i>	52
Figura 12 <i>Árbol filogenético de Escherichia coli</i>	54
Figura 13 <i>Árbol filogenético de Citrobacter sp</i>	55
Figura 14 <i>Árbol filogenético del S. enterica subsp. typhi</i>	56
Figura 15 <i>Árbol filogenético del Pseudomona spp.</i>	58
Figura 16 <i>Halo de inhibición de Salmonella typhi</i>	63
Figura 17 <i>Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por Trimetoprima/Sulfametoxazol</i>	64
Figura 18 <i>Halo de inhibición de Pseudomona</i>	65
Figura 19 <i>Diagrama de cajas del halo inhibición producido por gentamicina</i>	66
Figura 20 <i>Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por Cefalexina</i>	67
Figura 21 <i>Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por penicilina</i>	68

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Secuencia de cebadores utilizados en el estudio</i>	37
Tabla 2 <i>Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR para el ADN bacteriano</i> 38	
Tabla 3 <i>Factores y niveles aplicados para el análisis la resistencia a antibióticos mediante la técnica de antibiograma por difusión con discos</i>	40
Tabla 4 <i>Tratamientos a comparar para el análisis la resistencia a antibióticos mediante la técnica de antibiograma por difusión con discos</i>	41
Tabla 5 <i>Diluciones seriadas sembradas en pretrifilm</i>	43
Tabla 6 <i>Características morfológicas de las colonias cultivadas en medio MacConkey</i>	45
Tabla 7 <i>Características morfológicas de las colonias cultivadas en medio EMB</i>	46
Tabla 8 <i>Resultados obtenidos en la prueba de Kliger Iron Agar</i>	48
Tabla 9 <i>Pruebas bioquímicas para la identificación de los aislados cultivado</i>	49
Tabla 10 <i>Porcentaje de identidad de las bacterias</i>	53
Tabla 11 <i>Análisis de varianza para el halo de inhibición</i>	59
Tabla 12 <i>Resultados de la prueba de significancia de Tukey < 0,05 para el Factor A (Bacterias)</i>	60
Tabla 13 <i>Resultados de la prueba de significancia Tukey < 0,05 para el Factor B (Antibiótico)</i>	60
Tabla 14 <i>Prueba de significancia de Tukey < 0,05 de la interacción AxB (Bacteria x Antibiótico)</i>	61

Lista de Abreviaturas

mm Milímetros

UFC Unidades formadoras de colonias

pb Pares de bases

KIA Kliger Iron Agar

EMB Eosina azul de metileno agar

SXT Trimetoprima/Sulfametoxazol

CL Cefalexina

CN Gentamicina

P Penicilina

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

Resumen

Las enterobacterias son bacterias gramnegativas que producen diversas infecciones que atentan contra la salud humana y animal. En los cerdos se detectan comúnmente enterobacterias patógenas resistentes a antimicrobianos, estas pueden llegar a causar infecciones difíciles de tratar, que puede ser ocasionada por la mutación en genes cromosómicos de enterobacterias. Los antibióticos más utilizados en la producción porcícola son los betalactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas, macrólidos y quinolonas y que se usan no solo para tratar enfermedades bacterianas sino para mejorar la digestión de los porcinos. Un factor fundamental para la aplicación adecuada de antibióticos es conocer la resistencia de los patógenos a antimicrobianos, por ello, en este estudio se tuvo como objetivo aislar e identificar enterobacterias provenientes del punto de descarga de aguas residuales producidas por la producción porcícola de la Universidad de la Fuerzas Armadas Espe sede Santo Domingo. Para el aislamiento se tomó muestras del punto de descarga de la producción porcícola y mediante técnicas microbiológicas, pruebas bioquímicas y técnicas moleculares se identificó tres tipos de Enterobacterias: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, y otro de los aislados obtenidos correspondía a *Pseudomonas spp.*, que pertenece a la familia *Pseudomonaceae* pero pertenece a la clase de gammaproteobacterias. A las bacterias aisladas e identificadas se les aplicó un ensayo por el método de antibiograma por difusión en disco para determinar la sensibilidad frente a cefalexina, gentamicina, penicilina y trimetoprima/sulfametoxazol, de este análisis se estableció la resistencia a gentamicina y penicilina por *Pseudomonas spp.*, también se observó resistencia en *Salmonella typhi* a trimetoprima/sulfametoxazol. Algo interesante es que se encontró que todas las bacterias aisladas reportaron resistencia a penicilina, lo que se puede justificar por la resistencia intrínseca o adquirida de las bacterias.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, ADNr 16S, filogenia, aguas residuales porcinas

Abstract

Enterobacteriaceae are gram-negative bacteria that cause various infections that threaten human and animal health. Pathogenic enterobacteria resistant to antimicrobials are commonly detected in pigs and can cause infections difficult to treat, which can be caused by mutation in chromosomal genes of enterobacteria. The most used antibiotics in swine production are beta-lactams, tetracyclines, sulfonamides, lincosamides, macrolides and quinolones, which are used not only to treat bacterial diseases but also to improve the digestion of pigs. A fundamental factor for the adequate application of antibiotics is to know the resistance of pathogens to antimicrobials. For this reason, the objective of this study was to isolate and identify enterobacteria from the discharge point of wastewater produced by the swine farm of the Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE, Santo Domingo. For the isolation, samples were taken from the discharge point of the pig farm and by means of microbiological techniques, biochemical tests and molecular techniques, three types of Enterobacteriaceae were identified: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. and another isolate obtained corresponded to *Pseudomona* spp, which belongs to the Pseudomonaceae family but belongs to the class of gammaproteobacteria. The bacteria isolated and identified were tested by the disk diffusion antibiogram method to determine the sensitivity to cephalexin, gentamicin, penicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole, from this analysis it was established the resistance to gentamicin and penicillin by *Pseudomona* spp, resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole was also observed in *Salmonella typhi*. Interestingly, it was found that all isolated bacteria reported resistance to penicillin, which can be justified by the intrinsic or acquired resistance of the bacteria.

Keyword key: Enterobacteriaceae, 16S rDNA, phylogeny, swine wastewater

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Las enterobacterias son patógenos ampliamente distribuidas en el medio ambiente, entre los géneros de relevancia veterinaria se encuentran: *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella* (Quinn et al., 2011). Los antimicrobianos son fundamentales para tratar enfermedades producidas por enterobacterias, sin embargo, la propagación e incremento de la resistencia a antimicrobianos es un grave problema de salud pública (Partridge, 2015).

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 (Homeier-Bachmann et al., 2021).

Según Van Boesckel *et al.* (2015) se estima que entre 2010 y 2030 la demanda mundial de antibióticos se incrementará un 67%, debido al aumento del consumo de antimicrobianos en las explotaciones porcícolas.

Se ha demostrado que la cantidad de antibióticos ocupados en granjas porcinas fue mayor que las utilizadas en otras categorías de cría, debido a que, para producir un kilogramo de carne de res y pollo se ocupan entre 45 y 148 mg de antibióticos respectivamente, estas cantidades son menores a los 172 mg de antimicrobianos que se utiliza para producir la misma cantidad de carne de cerdo (Van Boeckel et al., 2015). El consumo excesivo de antibióticos en granjas porcinas se debe a que además de ser usados para tratar y prevenir enfermedades se utilizan como promotores de crecimiento lo cual es un problema ya que esto ayuda a incrementar la resistencia antimicrobiana (Wandee et al., 2021).

Justificación

La porcicultura en el Ecuador es una actividad que genera ingresos económicos al país, sin embargo, todo el proceso que conlleva esta actividad causa problemas ambientales. La acumulación de desechos sólidos y líquidos provenientes de la actividad porcícola ha causado efectos significativos, por la contaminación que en algunos casos es eliminada a los diferentes cuerpos de agua. La falta de un tratamiento previo de los desechos líquidos de esta actividad ha ocasionado, concomitantemente un efecto negativo en la salud de las personas que se ven de alguna forma ligados a esta actividad. De manera adicional se conoce sobre la presencia de bacterias con resistencia adquirida, que han sido aisladas de las zonas de descarga de desechos líquidos de porcinos. Por lo expuesto, es importante identificar el tipo de bacterias patógenas que pueden encontrarse en las descargas en el área de porcinos, dentro de este grupo se encuentran las enterobacterias, que se conoce están registradas actualmente como un grupo de procariontes con un impacto médico, sanitario y veterinario a nivel mundial. Están asociadas a una amplia gama de síndromes clínicos y son un importante agente causante de infecciones zoonóticas. Los animales son considerados como un importante reservorio de genes de resistencia o bacterias resistentes a antimicrobianos que pueden llegar a causar infecciones bacterianas en los humanos.

Hipótesis

- **Hipótesis Nula (H_{01}):** No hay presencia de enterobacterias en el punto de descarga de desechos líquidos de porcinos
- **Hipótesis nula (H_{02}):** Las enterobacterias no presentaron resistencia a los antibióticos empleados.
- **Hipótesis alternativa (H_{a1}):** Al menos hay presencia de una enterobacteria en las aguas residuales provenientes de la zona de descarga de desechos líquidos de porcinos

- **Hipótesis alternativa (Ha₂):** Al menos una enterobacteria presenta resistencia a los antibióticos empleados.

Objetivos de la investigación

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

Capítulo II: Marco Teórico

Microorganismos presentes en aguas residuales porcinas

Alcántara *et al.* (2008) afirman que la actividad ganadera porcicultura genera un impacto negativo en la calidad del aire agua y suelo; siendo la contaminación del agua cada vez más preocupante; del agua que ingresa a una granja aproximadamente el 82% sale como agua residual acompañada de heces, orina, desperdicios de alimentos y otros materiales. De esta forma, la carga contaminante que se genera en una granja porcina es mayor a la de residuos municipales, como lo demuestran los análisis de otros parámetros como la cantidad de sólidos suspendidos totales y la DBO que se pueden encontrar elevados con referencia a las normas ambientales establecidas (Alcántara *et al.*, 2008).

Entre las bacterias que se encuentran en los efluentes líquidos están *Salmonella spp*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Brucella spp.*, *Leptospira spp.*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Clostridium perfringen*, dependiendo del grado de contaminación se puede encontrar gran cantidad de estos microorganismos patógenos (Alcántara *et al.*, 2008).

Identificación de bacterias aerobias Gram- negativas

Las bacterias Gramnegativas aerobias son ubicuas, es decir, las podemos encontrar en muchos sitios distribuidos por todo el mundo, parte de estas bacterias son inofensivas e incluso beneficiosas, otras son responsables de una gran cantidad enfermedades gastrointestinales. La identificación de estas bacterias puede llevarse a cabo por diversos métodos que incluyen pruebas fenotípicas convencionales basadas en reacciones químicas, kits comerciales y análisis moleculares (Green & Goldman, 2021).

Dentro de las pruebas bioquímicas se encuentran varios tipos que incluyen la capacidad para fermentar glucosa y producir ácido en Kligler Hierro Agar o en TSI agar, otras pruebas bioquímicas para caracterizar aún más una bacteria Gram-negativa aerobia son: motilidad, ácido de carbohidratos, catalasa, descarboxilasas, citrato, licuefacción de gelatina, hidrólisis de esculina, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, reducción de nitratos y ureasas, sin embargo, algunas bacterias son difíciles de identificar mediante las pruebas bioquímicas mencionadas, por ello, se suele realizar ensayos de espectrometría de masas, PCR específica o PCR en tiempo real para su identificación, incluso el análisis de secuencias del gen 16S ADNr para identificar miembros inusuales (Green & Goldman, 2021).

Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo extenso de bacilos gram negativos que comprende muchos géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsilla*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia* y *entre otros*; no forman endosporas ni microquistes; no son ácidos resistentes y pueden crecer en presencia y ausencia de oxígeno; su huésped natural es el intestino humano y animal, sin embargo, a pesar de ser parte del microbiota intestinal están asociadas con diversas infecciones graves (De Agelis et al., 2020).

Crece bien en peptona, extracto de carne y en el medio MacConkey a excepción de *Calymmatobacterium*, fermentan la glucosa, a menudo producen gas, la mayoría son catalasa positiva (*Shigella dysenteriae*), oxidasa negativa (excepto *Plesiomonas*) y reducen el nitrato a nitrito (excepto *Saccharobacter fermentatus* y algunas cepas de *Erwinia* y *Yersinia*), la mayoría crece bien a una temperatura que oscila entre los 22 – 35°C, sin embargo, el crecimiento óptimo se produce a 25 -28°C, *Enterobacteriaceae* crecen en el agar MacConkey en 24-48 horas (Brener & Farmer, 2015).

Características para la identificación inicial

Los esquemas para identificación de organismos Gramnegativos comienzan con la realización de Tinción de Gram, observación de la morfología de la colonia y la capacidad para fermentar glucosa y crecer en agar MacConkey.

Tinción Gram

Para identificar una especie bacteriana el paso inicial es la tinción Gram, una técnica diferencial para distinguir bacterias gramnegativas de bacterias grampositivas.

Las bacterias Grampositivas se constituyen de una pared celular conformada por una capa gruesa de peptidoglicano que recubre la membrana interna y no posee membrana externa a diferencia de las bacterias gramnegativas que poseen una membrana externa gruesa conformada por una bicapa de fosfolípidos, la pared celular de las Gramnegativas también cuenta con una fina capa de peptidoglicano.

En la tinción se utiliza tanto tintes primarios como secundarios, la reacción de tinción Gram depende del tipo de estructura de la pared celular bacteriana, las Grampositivas se tornan moradas y las bacterias Gramnegativas se tiñen de rosa (Cangliang & Yifan , 2022). Esta prueba bioquímica necesita cuatro soluciones:

1. Un tinte básico (cristal violeta): Tiene afinidad por la pared celular que cuenta con peptidoglicano.
2. Un mordiente (Lugol): Forma un complejo cristal violeta-Yodo que retiene el tinte ya que este complejo satura los espacios del peptidoglicano de la membrana celular.
3. Alcohol-cetona: Actúa como agente decolorante, deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros. En el caso de bacterias Gramnegativas destruye la membrana externa debido a que esta es soluble en solventes orgánicos.
4. Una contratinción (safranina)

Las diferentes estructuras de pared celular bacteriana son la clave en la clasificación de bacterias ya que cuando la tinción es positiva se mantiene el color violeta del tinte primario debido a que el cristal violeta tiene afinidad por el peptidoglicano de la pared celular por lo tanto retienen con mayor fuerza el complejo cristal violeta-Yodo, cuando esta tinción es negativa las bacterias no se tiñen con el cristal violeta debido a que las gramnegativas eliminan el complejo de yodo cristal violeta que poseen y se vuelven incoloras posterior al lavado, en cambio las bacterias grampositivas no pierden el complejo CV-I y mantienen el color morado. Al colocar safranina en las bacterias grampositivas estas mantienen su coloración por otro lado las bacterias gramnegativas al estar incoloras son teñidas por la safranina tornándose rosa, en el caso de enterobacterias siempre se tornan rosa debido a que son gramnegativas (Shen & Zhang, 2022).

Morfología de las colonias

Esta característica clave se basa en la identificación en base a la observación del tamaño, forma y textura de las colonias bacterianas que crecen en medios de agar, la familia *Enterobacteriaceae* tienden a tener colonias húmedas y grandes.

Medios selectivos

Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás. Entre estos tenemos (Jung & Hoilat, 2020):

Agar MacConkey

El agar MacConkey (MAC) es un medio de cultivo bacteriano, llamado así por el bacteriólogo Alfred MacConkey, selectivo y diferencial para el crecimiento de bacterias Gramnegativas de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos obtenidos de muestra clínicas, alimentos y agua, además permite diferenciar organismos en función del metabolismo de la lactosa, se utiliza tanto para investigación como para aplicaciones clínicas (Jung & Hoilat, 2020).

Fundamento

La fermentación de la lactosa produce ácidos orgánicos, en particular al ácido láctico, haciendo que disminuya el pH del agar, el medio de cultivo agar MacConkey contiene un indicador de pH que en condiciones ácidas se vuelve rosado, por lo tanto, las bacterias gramnegativas que fermenten lactosa formaran colonias de color rosado, por el contrario, aquellas que no fermentan lactosa, formaran colonias opacas de color blanquecino (incoloras) (Jung & Hoilat, 2020).

Composición

Los componentes del medio incluyen:

- Peptona de carne
- Peptona de gelatina
- Tripteína
- Cloruro de sodio
- Agar
- Cristal violeta
- Sales biliares
- Lactosa
- Rojo neutro

Contiene nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento, de estos, podemos destacar que el cristal violeta y las sales biliares que detienen el crecimiento de las bacterias Grampositivas, así, las bacterias gram negativas forman colonias en el medio; la lactosa en el agar es la fuente de fermentación y en función de la capacidad de fermentar el mismo, las especies cultivadas producirán colonias de aspecto variable (Lagier et al., 2015).

Interpretación de los resultados

En función de la capacidad de fermentar la lactosa en MacConkey se observará los siguientes resultados (Jung & Hoilat, 2020):

- Lactosa positiva

Los microorganismos fermentadores de lactosa presentan colonias rosadas-rojizas, por la fermentación de la lactosa se producen subproductos ácidos que disminuyen el pH, por esta razón el indicador pH se vuelve de dicho color; ejemplos de microorganismos positivos para lactosa son: *Escherichia coli*, *Enterobacteria*, *Klebsiella*.

- Lactosa negativa

Los microorganismos formarán colonias, pero presentan colonias del color del medio e incoloras, por la ausencia de la fermentación de la lactosa no hay cambios en el pH; como ejemplos están: *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Pseudomonas*.

- Sin colonias

Las bacterias Grampositivas no formarán ninguna colonia.

- Lento

Fermentadores de lactosa débiles formarán colonias lentamente a comparación de las demás, ejemplos son: *Serratia Citrobacter*.

- Mucoide

Colonias pegajosas y húmedas se producen por las bacterias encapsuladas, las cuales producen cápsulas utilizando lactosa; ejemplos de colonias mucoides están: *Klebsiella*, *Enterobacter*.

Agar EMB

El agar EMB también se utiliza para la identificación y el aislamiento de bacilos entéricos Gram-negativos, este medio diferencial inhibe el crecimiento de organismos Gram-positivos; de manera que, los colorantes indicadores eosina y azul de metileno distinguen el crecimiento de las bacterias que fermentan lactosa de las que no lo hacen; así los organismos que fermentan lactosa forman colonias con centros oscuros y brillo metálico, colonias de color negro azulado o amarronado; caso contrario, las que no fermentan la lactosa forman colonias del color del medio, completamente incoloras (Corry et al., 2003)

Composición

Los componentes del medio incluyen peptona, lactosa, fosfato dipotásico, eosina amarillenta, azul de metileno, sacarosa y agar- agar.

Kligler Iron Agar (KIA)

TSI agar o Kligler Iron Agar es utilizado para la identificación presuntiva de bacterias entéricas Gramnegativas, la composición del medio es similar en ambas pruebas, pero el agar TSI contiene sacarosa a diferencia del Kligler Iron Agar. Estos medios son útiles para determinar la capacidad del microorganismo para fermentar los carbohidratos, y producir gas durante la fermentación, lo que se determina por la formación de burbujas, fracturando o desplazando el medio y detectar la producción de H_2S la mayoría de *Enterobacteriaceae* y *Aeromonas* producirán una reacción ácida, a menudo con producción de gas, tras 24 horas de incubación a 35°C-37°C (Green & Goldman, 2021).

Reacciones en KIA

- **Sin Fermentación**

Se pueden encontrar resultados de superficie alcalina/profundidad alcalina (K/K) o superficie alcalina/profundidad sin cambio (K/NC), sin embargo, a pesar de no fermentar la lactosa, ni la glucosa pueden degradar las peptonas del medio, tanto de forma anaeróbica o aeróbica, dando lugar a subproductos alcalinos que cambia el color del medio a un color rojo intenso (Mahon et al., 2018).

- **Fermentación de solamente glucosa**

La lectura de los resultados es superficie alcalina/fondo amarillo (K/A), porque el medio KIA contiene un 0.1% de glucosa suficiente para que el ácido producido cambie por el indicador el color del medio a amarillo, sin embargo, después de las 12 horas de incubación, la glucosa se consume completamente y las bacterias en la superficie utilizan la peptona aeróbicamente, por lo tanto, producen la reacción alcalina que cambia el color del medio a rojo intenso, en cambio, en el fondo del medio, la fermentación de la glucosa es anaeróbicamente; por lo que, produce mayor cantidad de ácido que la degradación alcalina de la peptona, por ello, el fondo del medio se mantiene amarillo, por lo mencionado anteriormente, la lectura de resultados antes de 12 horas de incubación puede dar resultados erróneos, de ahí que el agar KIA debe incubarse entre 18 y 24 horas (Mahon et al., 2018).

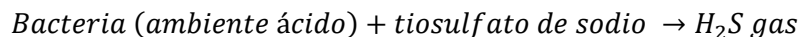
- **Fermentación de la lactosa**

En la lectura de los resultados se observa superficie ácida/profundidad ácida (A/A), debido a que las bacterias fermentadoras de glucosa primero atacan el azúcar simple y luego la lactosa, de manera que, el ácido producido por la fermentación adicional del azúcar es suficiente para lograr mantener tanto la superficie, como el fondo del medio amarillos (Mahon et al., 2018).

- **Producción de H_2S**

Superficie alcalina/fondo ácido, con H_2S al fondo (K/A, H_2S) o superficie ácida/fondo ácido, con H_2S en el fondo, (A/A, H_2S), la producción de H_2S es un proceso de dos pasos:

El H_2S se produce a partir de tiosulfato de sodio, porque H_2S al ser un gas incoloro, el indicador, el sulfato ferroso, son necesarios para observar la producción de H_2S , en algunos casos el fondo del tubo es completamente negro, cubriendo el color amarillo de la fermentación de los carbohidratos, así pues, al requerir un entorno ácido para la producción de H_2S el color amarillo se cubre completamente, por ello, también se reporta resultados como positivo para la fermentación de glucosa (Mahon et al., 2018).



- **Producción de gas (aerógeno) o sin producción de gas (no aerógena)**

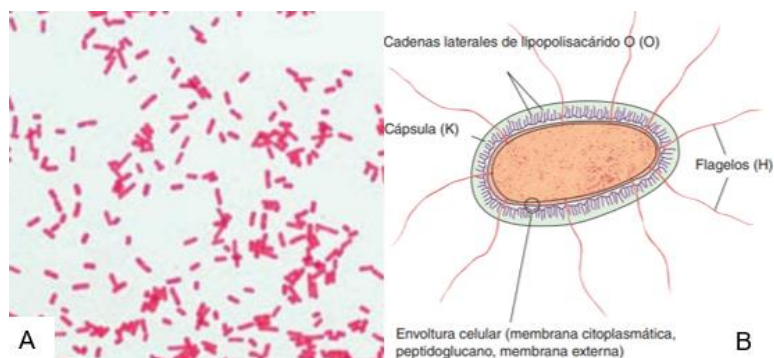
La producción de gas se observa por la producción de burbujas o ruptura del medio de cultivo en el fondo, o por el desplazamiento del medio desde el fondo del tubo.

Morfología

Las colonias de enterobacterias son cortas y de gran tamaño (Figura 1), miden de 2 a 4 μm de longitud, gran parte de las bacterias entéricas forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintivos, sin embargo, en muestras clínicas sus características morfológicas son muy variables (Brooks et al., 2010).

Figura 1

Morfología de Enterobacterias



Nota. A. Tinción Gram de *E. coli* con aumento original $\times 1\ 000$. B. Estructura antigénica.

Tomado de *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology* (p.214), por G.F. Brooks, 2010, McGraw Hill/Medical.

Taxonomía

Clasificación taxonómica de Enterobacterias (ITIS, 2022).

Kingdom: Bacteria

Subkingdom: Negibacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: *Enterobacteriaceae*

La taxonomía de *Enterobacteriaceae* es compleja, “en 2017 se realizó una nueva clasificación taxonómica, en la que los 54 géneros se encuentran en el orden *Enterobacterales* que contienen 7 familias: *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Budviciaceae*, *Morganellaceae*” (Pallares, 2019, p.33). sin embargo, “los géneros *Yersinia*, *Morganella* y *Erwinia* ya no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*” (Morales-López et al., 2019).

Antibióticos utilizados en Porcinos

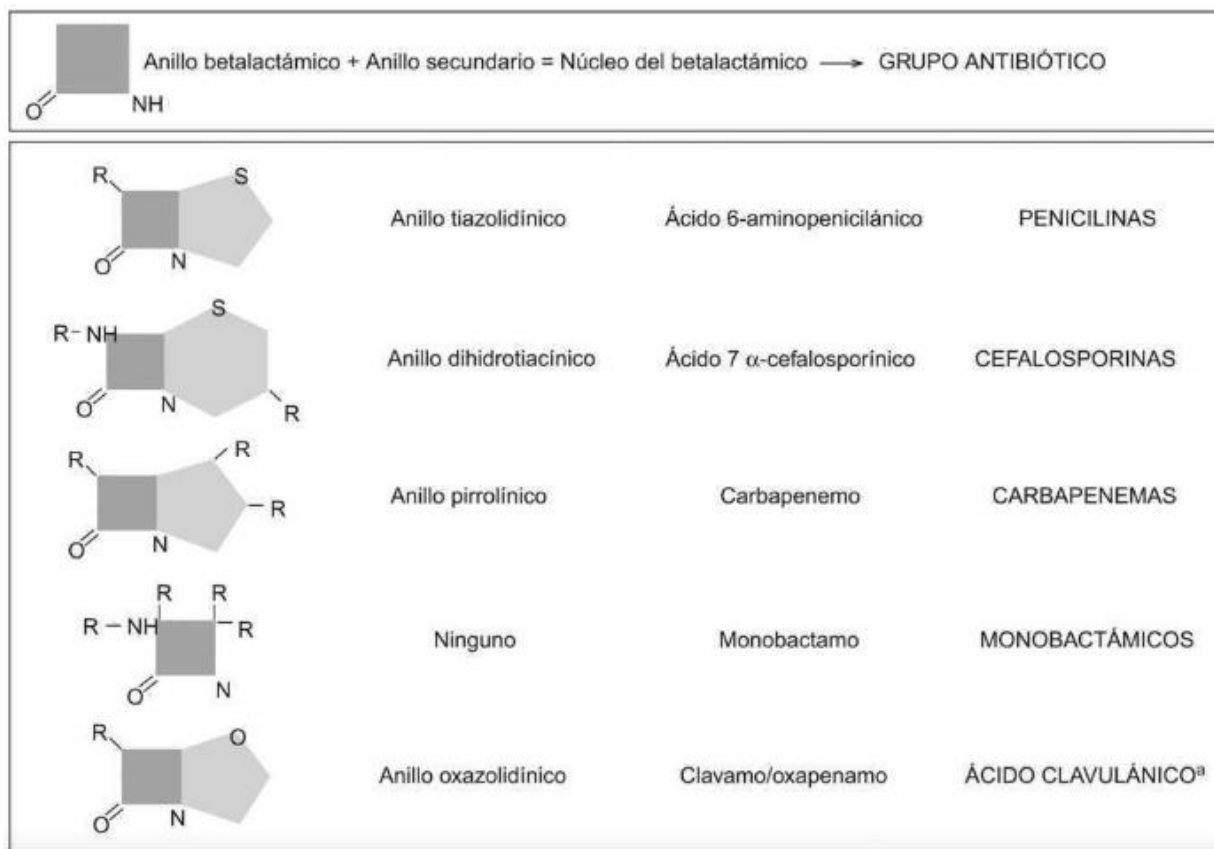
La utilización de antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades animales destinados a la producción de alimentos empezó en la década de 1940. A principios de la década de 1950 se agregaron antibióticos en los balanceados comerciales para porcinos y otros animales, desde entonces el uso mundial de antibióticos en medicina veterinaria ha ido incrementando y actualmente es muy elevado (Hernández-Barrera et al., 2017), esto se debe a que se utilizan ampliamente para estabilizar el microbiota intestinal, mejorar el rendimiento general y prevenir o tratar afecciones producidas por patógenos microbianos. Se estima que el consumo de antimicrobianos en granjas porcinas es mucho mayor que en el sector porcícola y avícola. Los antibióticos utilizados de forma generalizada en granjas porcinas son los β -lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas, macrólidos y quinolonas (Rathborey et al., 2021).

β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son un grupo de fármacos bactericidas que actúan inhibiendo la etapa final de la síntesis de la pared celular bacteriana, conforman la familia más numerosa de antimicrobianos y la más importantes a nivel mundial. Los betalactámicos son compuestos con acción bactericida lenta, son independientes de la concentración plasmática, presentan baja toxicidad y tienen un amplio rango terapéutico. El espectro de estos antibióticos ha ido incrementando debido a la integración de moléculas nuevas con elevada actividad antimicrobiana frente a bacilos gramnegativos, aunque a su vez se ha elevado la resistencia bacteriana adquirida, esto limita la eficacia de estos antibióticos y por ende su utilización (Marín y Gudiol, 2003). Se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, penémicos, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas (Lima et al., 2020). En el grupo existen pequeñas modificaciones en la estructura química (Figura 2) (Suárez y Gudiol, 2009).

Figura 2

Estructura química básica de las diferentes familias de β -lactámicos



Nota. Se observan las diferentes estructuras del grupo de antibióticos β -lactámicos. Tomado de Suárez & Gudiol. (2009). *Estructura química de los betalactámicos*.

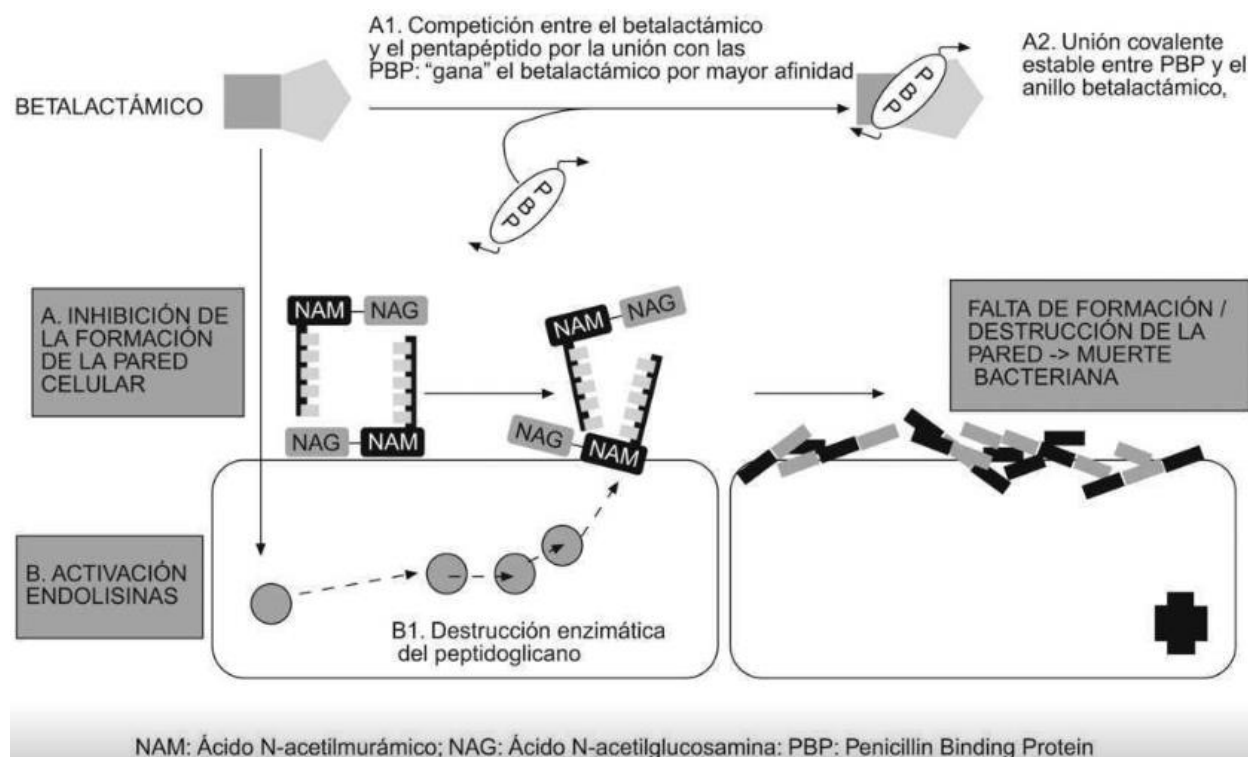
doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001.

Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que generan su efecto principalmente mediante dos mecanismos (Figura 3): inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana (Suárez y Gudiol, 2009).

Figura 3

Mecanismo de acción de los betalactámicos



Nota. Se observan los distintos mecanismos de acción del grupo de antibióticos β -lactámicos.

Tomado de Suárez & Gudiol. (2009). *Mecanismo de acción de los betalactámicos*.

doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001.

Espectro antibacteriano

El espectro de estos antibióticos incluye tanto bacterias grampositivas como gramnegativas además de espiroquetas. No actúan sobre micoplasmas porque estos no poseen pared celular y tampoco son activos en bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural existente en las micobacterias se debe a la producción de betalactamasas posiblemente ligado a una lenta penetración por las características de la pared (Marín y Gudiol, 2003).

Penicilinas

Las penicilinas son una subclase del grupo de antibióticos betalactámicos bactericidas debido a que también actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana ya que se unen a una o varias proteínas de unión a penicilina, como carboxipeptidasas, endopeptidasas y transpeptidasas en la membrana del citoplasma bacteriano. Desde su descubrimiento en 1928 por Alexander Fleming, las penicilinas se encuentran entre los antibióticos más utilizados. El aumento de la resistencia bacteriana hace imprescindible la expansión en la producción de penicilinas sintéticas (Ismalaj & Borggraeve, 2022).

La penicilina inhibe la etapa final de transpeptidación en la pared celular bacteriana donde evita la síntesis de peptidoglucano, esto genera la inhibición de la biosíntesis de la pared celular lo que da como resultado la muerte celular debido a la actuación de enzimas autolíticas. Las células que se encuentran en división están más expuestas a la acción de la penicilina que las células en fase de latencia (Castle, 2007).

Espectro antibacteriano

El espectro cambia con cada clase de la familia de las penicilinas. Las penicilinas naturales son eficaces contra microorganismos grampositivos. Las aminopenicilinas también son eficientes contra las bacterias grampositivas, además de ciertos microorganismos gramnegativos, como *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae*. Las carboxipenicilinas actúan tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo pseudomonas. Las penicilinas antiestafilocócicas son apropiadas contra estafilococos y estreptococos. La resistencia es un factor clave en la respuesta clínica a las penicilinas, estas tienen cobertura anaeróbica y pueden ser de utilidad contra *Clostridium*, *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* (Castle, 2007).

Capítulo III: Materiales y métodos

Localización

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología Aplicada y Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, Av. Quevedo Km. 24, Hacienda Zoila Luz.

Obtención de la muestra

Se tomó 1000 mL de muestra de agua proveniente de la zona de descarga de porcinos (Figura 4) y se colocó en un cono de sedimentación Imhoff por una hora para lograr la separación de los sólidos suspendidos. El agua recolectada presentaba turbidez y sólidos suspendidos

Figura 4

Zona de recolección de la muestra y posterior sedimentación



Nota. La figura representa el lugar de toma de muestra del agua y la sedimentación en tubo Imhoff.

Diluciones Seriadas

Para la primera dilución se extrajo 10 mL de agua residual sedimentada y se colocó en un matraz que contenía 90 mL de agua de peptona. Para hacer las diluciones siguientes pasar 1 mL al primero de una serie de tubos con 9 mL de agua peptonada cada uno, mezclar en agitador vórtex y tomar 1 mL para volcarlo en el segundo tubo, y así hasta tener en el tubo sexto una dilución 1/10000 respecto a la solución madre. Para el aislamiento bacteriano y conteo de coliformes totales se utilizaron diluciones seriadas de agua de peptona:

10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (Cappuccino & Welsh, 2017).

Conteo de coliformes totales

Para la determinación de UFC/ mL se tomó 1 mL de cada dilución preparada (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y se sembró en placas 3M Petrifilm y se incubaron a 37°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se utilizó la App APD Colony para el conteo de las colonias, a las colonias sembradas por duplicado se realizó el cálculo de la media aritmética. La calculó las UFC/ml para cada dilución mediante la siguiente fórmula (Arana et al., 2010).

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

Aislamiento microbiológico

Para el aislamiento bacteriano, se colocó 1 mL de todas las diluciones preparadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) en medio MacConkey por triplicado (6 cajas), se incubó por 24 horas a 37°C. Una vez que se obtuvo las cajas Petri previamente inoculadas con las colonias desarrolladas, se tomó por cada dilución (Figura 5) colonias con distintas características y a éstas se les sembró nuevamente en medio selectivo eosina y azul de metileno (EMB), se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurridas las 24 h de este cultivo en EMB se seleccionó colonias con diferentes tonalidades y a éstas se las sembró por separado en medio nutritivo (De Benedetti et al., 2021).

Identificación bioquímica

Prueba de Kliger Iron Agar (KIA)

Se prepararon 18 tubos con medio de cultivo KIA y se inocularon con los aislados seleccionados, para la siembra se introdujo el asa de siembra por el centro del medio y al retirar el asa se realizó una estría en la superficie inclinada, se dejó incubar a 37°C durante 18-24 horas (Brown & Smith, 2017).

Tinción de Gram

Se hizo tinción de Gram a las bacterias aisladas en EMB y que presentaban resultados diferentes en la prueba KIA. Para la tinción bacteriana se requirió cristal violeta, lugol, safranina, agua y alcohol cetona (Brooks et al., 2010).

Prueba catalasa

En un portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno con la ayuda de una pipeta Pasteur y con el asa de siembra se suspendió la bacteria y se observó la presencia o ausencia de burbujas (Cappuccino & Welsh, 2017).

Prueba de Indol

Se inoculó el agua peptonada con las bacterias aisladas, se incubó por 24 horas a 37°C, para realizar la lectura de los resultados transcurridas las 24 horas se agrega unas 10 gotas del reactivo Kovac, y se determina el cambio de color a rojo indica positivo para la prueba de indol (Cappuccino & Welsh, 2017).

Prueba óxido/ fermentación

Se prepararon 2 tubos de ensayo con medio O/F para cada bacteria aislada y se inoculó cada tubo, se incubaron a 37°C durante 24 horas, un tubo se incubó en condiciones anaerobias; para ello se taparon los tubos con Parafilm y tapa rosca, mientras que el otro tubo se tapó con algodón para tener condiciones aerobias (Brown & Smith, 2017).

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Se transfirió la suspensión bacteriana de las cuatro posibles enterobacterias seleccionadas en base a las pruebas bioquímicas a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contenía 100 µL de agua ultrapura y se homogenizó por un minuto, separadas las fases se desechó el sobrenadante, luego se secó el *pellet*; se resuspendió en 600 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA). Seguidamente se añadió 50 µL de SDS%, se homogenizó por 5 segundos en el vortex y en baño María se incubó por 30 minutos a 65°C.

Posteriormente, se adicionó un volumen de 700 µL de fenol saturado en Tris-HCl y se homogenizó en vortex durante 15 segundos, se procedió a centrifugar la muestra a 12 000 rpm durante 3 minutos y se colocó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf, en este se adicionó 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (concentración de la solución) se volvió a homogenizar en vortex durante 15 segundos, se centrifugó la muestra a 12 000 rpm durante 3 minutos y se colocó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf, la centrifugación con cloroformo: alcohol isoamílico se realizó en dos ocasiones (Howland, 1996).

Para precipitar el ADN se añadió un volumen de 800 µL de isopropanol frío y 80 µL de acetato de sodio 3M, se colocó en baño frío durante 1 hora, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se descartó el isopropanol. Luego, se realizó el lavado del *pellet*, centrifugando a 12000 rpm por 5 minutos, primero con 1000 µL de etanol absoluto y luego con 1000 µL etanol al 70%, se dejó secar por una hora en la incubadora a 37°C. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 µL (buffer TE + RNasa) y se conservaron todas las muestras a –20°C (Howland, 1996).

Amplificación de ADN

Para la amplificación del ADN extraído se utilizó cebadores universales (tabla 1) empleados por (Fedare et al., 2020). Para la PCR se utilizó el MasterMix descrito la Tabla 2, además se detallan las concentraciones de los reactivos empleados para la amplificación.

Tabla 1

Secuencia de cebadores utilizados en el estudio

Gen	Cebadores (5' – 3')	Tamaño amplímero	Referencia Bibliográfica
Subunidad 16S	F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) R (ACGGATACCTTGTTACGACTT)	1500 pb	(Hou et al., 2018)

Nota. Cebadores empleados para la amplificación del ADN bacteriano.

Como control positivo se empleó ADN genómico bacteriano de *E. coli* con una longitud de 1500 pb. El protocolo para la PCR se está basado en el estandarizado por (Howland, 1996) y las condiciones del termociclador fue propuesto por (Fedare et al., 2020).

Tabla 2

Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR para el ADN bacteriano

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

Nota. Componentes utilizados en la PCR para obtener múltiples copias del fragmento de ADN.

Secuenciación

Los fragmentos amplificados se secuenciaron mediante el método Sanger, en específico la unidad 16s. Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron los softwares informáticos: MEGA -X, Sequencher 5.4.6, BioEdith y BLAST.

Análisis filogenético

Para determinar la relación filogenética de las muestras se usó el análisis de secuencias en MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Resistencia a antibióticos

Para realizar el antibiograma se preparó todo el material e insumos y se esterilizaron. Se preparó solución salina para diluir el cultivo bacteriano, para ello se disolvió 0,85 gramos de NaCl en 100 mL de agua destilada estéril, de esta solución (esterilizada) se colocaron 10 mL por tubo de ensayo y se suspendió y homogenizó una colonia bacteriana en cada tubo, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

En la cámara de flujo laminar se realizó la siembra de la muestra líquida para ello se sumergió un extremo del hisopo estéril en la suspensión bacteriana preparada y se sembró el inóculo en cajas petri con 25 mL con medio de cultivo Mueller-Hinton solidificado. La siembra del inóculo se hizo en la superficie en 3 direcciones de manera uniforme, luego se tapó la caja Petri y se dejó secar la superficie del medio durante 5 minutos.

Posterior a la siembra se procedió a colocar los discos sobre la superficie del medio de cultivo con una pinza estéril, los discos se colocaron a 2 cm de distancia entre ellos para evitar que las zonas de inhibición se superpongan, después se presionó ligeramente el disco para asegurar un contacto uniforme. Cada unidad experimental se incubó por 24 horas a 37°C y se midieron los halos de inhibición producidos por cada disco.

Diseño experimental

En el diseño bifactorial (Tabla 3) se analizó el efecto entre niveles con tres repeticiones y para los tratamientos (Tabla 4) se empleó la prueba de significancia de Tukey $< 0,05\%$.

Factores y niveles**Tabla 3**

Factores y niveles aplicados para el análisis la resistencia a antibióticos mediante la técnica de antibiograma por difusión con discos

Factores	Niveles
Microorganismo (A)	a0: <i>Salmonella typhi</i>
Microorganismo (A)	a1: <i>Escherichia coli</i>
Microorganismo (A)	a2: <i>Pseudomona spp</i>
Microorganismo (A)	a3: <i>Citrobacter spp</i>
Microorganismo (A)	a4: <i>E. coli</i> ATCC 27325 (Control positivo)
Antibiótico (B)	b0: Cefalexina [30MCG]
Antibiótico (B)	b1: Gentamicina [10MCG]
Antibiótico (B)	b2: Penicilina [10iu]
Antibiótico (B)	b3: Trimetoprima/Sulfametoxazol [25MCG]

Nota. Factores de estudio para el diseño bifactorial, donde A son las bacterias aisladas y los antibióticos empleados.

Tratamientos a comparar**Tabla 4**

Tratamientos a comparar para el análisis la resistencia a antibióticos mediante la técnica de antibiograma por difusión con discos

Tratamiento	Interacción	Descripción
T1	a0b0	<i>Salmonella typhi</i> + Cefalexina
T2	a0b1	<i>Salmonella typhi</i> + Gentamicina
T3	a0b2	<i>Salmonella typhi</i> + Penicilina
T4	a0b3	<i>Salmonella typhi</i> + Trimetoprima/Sulfametoxazol
T5	a1b0	<i>Escherichia coli</i> + Cefalexina
T6	a1b1	<i>Escherichia coli</i> + Gentamicina
T7	a1b2	<i>Escherichia coli</i> + Penicilina
T8	a1b3	<i>Escherichia coli</i> + Trimetoprima/Sulfametoxazol
T9	a2b0	<i>Pseudomona spp</i> + Cefalexina
T10	a2b1	<i>Pseudomona spp</i> + Gentamicina
T11	a2b2	<i>Pseudomona spp</i> + Penicilina
T12	a2b3	<i>Pseudomona spp</i> + Trimetoprima/Sulfametoxazol
T13	a3b0	<i>Citrobacter spp</i> + Cefalexina
T14	a3b1	<i>Citrobacter spp</i> + Gentamicina
T15	a3b2	<i>Citrobacter spp</i> + Penicilina
T16	a3b3	<i>Citrobacter spp</i> + Trimetoprima/Sulfametoxazol
T17	a4b0	<i>E. coli</i> ATCC 27325 + Cefalexina

Tratamiento	Interacción	Descripción
T18	a4b1	<i>E. coli</i> ATCC 27325 + Gentamicina
T19	a4b2	<i>E. coli</i> ATCC 27325 + Penicilina
T20	a4b3	<i>E. coli</i> ATCC 27325 + Trimetoprima/Sulfametoxazol

Nota. Cuadro de tratamientos con las interacciones respectivas, con un total de 60 unidades experimentales y variables dependientes medida en milímetros.

Tipo de diseño experimental

En el diseño experimental la variable utilizada fue el halo de inhibición medido en milímetros. Se aplicó un ANOVA con arreglo factorial AxB, conformando un total de 24 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, el modelo matemático de este diseño es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = Efecto global

α_i = efecto i-esimo del microorganismo aislado

γ_j = efecto j-esimo de los diferentes antibióticos

$(\alpha\gamma)_{ij}$ = efecto de la interacción de primer orden del i-esimo de los microorganismos aislados y j-esimo de los diferentes antibióticos

β_k = efecto de la repetición

ε_{ijk} = error experimental

Capítulo IV: Resultados y discusión

Conteo de coliformes totales

En el conteo de coliformes totales se obtuvo una cuantificación promedio de $3,01 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL (Tabla 5).

Tabla 5

Diluciones seriadas sembradas en petrifilm

Dilución sembrada	UFC/mL
10^{-2}	$1,0 \times 10^4$
10^{-3}	$2,7 \times 10^4$
10^{-4}	$5,3 \times 10^4$

Nota. Valores de UFC/ mL obtenidos en las diferentes sembradas en petrifilm.

Alcántara et al. (2008) con el objetivo de cuantificar enterobacterias evaluaron el efecto del suministro de agua residual tratada en la salud de cerdos destetados, donde mencionan que en 10 granjas se reportaron valores de $3,9 \times 10^5$ UFC/mL en agua tratada con método de separación de sólidos y sedimentación de la fracción líquida, pero en otro estudio obtuvieron un conteo de $9,0 \times 10^6$ UFC/mL en agua de la fosa de sedimentación con similar tratamiento. Estos resultados se enmarcan en los datos obtenidos en este estudio sin embargo hay que considerar el número de individuos que producen los desechos y las edades que es diversa en el punto de muestreo, y las aguas en las que se hizo el análisis no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento.

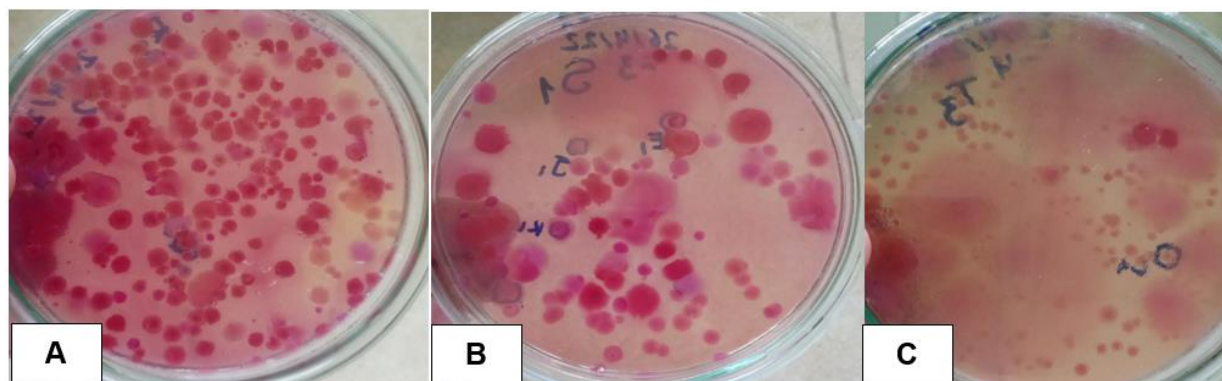
Aislamiento microbiológico

En los cultivos en medio MacConkey se observaron colonias rosadas, magentas y rojizas las cuales son bacterias fermentadoras de lactosa, en estos cultivos también se visualizaron colonias incoloras las cuales son incapaces de fermentar lactosa.

Se obtuvo 18 aislados de MacConkey, de los cuales 6 de ellos fueron aislados de las tres repeticiones de la dilución 10^{-2} , 8 aislados de las tres repeticiones de la dilución 10^{-3} y 4 aislados de las tres repeticiones de la dilución 10^{-4} (Tabla 6). En las cajas con dilución 10^{-2} se tuvo un crecimiento excesivo al contrario que en las cajas con dilución 10^{-4} (Figura 5) donde se observan pocas colonias por ello para el aislamiento en EMB se tomaron más colonias de la dilución 10^{-3} ya que la diferenciación y crecimiento eran óptimos en comparación con las otras diluciones. Gálvez-Chan (2013) en su estudio para demostrar la presencia de *Salmonella* en aguas residuales porcinas aislaron *Salmonella typhi* empleando el medio de cultivo Agar MacConkey, además realizaron tinción Gram, la prueba de KIA y la producción de indol para su determinación.

Figura 5

Cultivo de microorganismos Gram negativos en medio de cultivo MacConkey



Nota. A = Dilución 10^{-2} ; B = Dilución 10^{-3} ; C = Dilución 10^{-4} .

Tabla 6*Características morfológicas de las colonias cultivadas en medio MacConkey*

N° Aislado	Dilución	Color	Forma	Borde	Consistencia	Luz transmitida
Colonia 1	10 ⁻²	Rosado	Circular	Entero	mucoide	Opaco
Colonia 2	10 ⁻²	Magenta	irregular	Ondulado	Creмоса	Opaco
Colonia 3	10 ⁻²	Incolora	Circular	Entero	Seca	Translúcida
Colonia 4	10 ⁻²	Rojizo	irregular	Ondulado	Creмоса	Opaco
Colonia 5	10 ⁻²	Incolora	Circular	Entero	Creмоса	Opaco
Colonia 6	10 ⁻²	Incolora	Circular	Entero	Creмоса	Translúcida
Colonia 7	10 ⁻³	Magenta	Circular	Entero	Creмоса	Translúcida
Colonia 8	10 ⁻³	Incolora	Circular	Entero	Viscosa	Opaco
Colonia 9	10 ⁻³	Rosado	Circular	Ondulado	Creмоса	Opaco
Colonia 10	10 ⁻³	Incolora	Circular	Ondulado	Creмоса	Opaco
Colonia 11	10 ⁻³	Rojizo	Circular	Entero	Creмоса	Opaco
Colonia 12	10 ⁻³	Rosado	Circular	Entero	Seca	Translúcida
Colonia 13	10 ⁻³	Incolora	Circular	Ondulado	Creмоса	Translúcida
Colonia 14	10 ⁻³	Magenta	Filament osa	Filamento so	Creмоса	Opaco
Colonia 15	10 ⁻⁴	Rosado	Circular	Ondulado	Creмоса	Translúcida
Colonia 16	10 ⁻⁴	Incolora	Irregular	Entero	Creмоса	Opaco
Colonia 17	10 ⁻⁴	Incolora	Irregular	Entero	Creмоса	Translúcida
Colonia 18	10 ⁻⁴	Rosado	Irregular	Ondulado	Creмоса	Opaco

Nota. Esta tabla muestra las diferentes características morfológicas de los 18 aislados cultivados en medio MacConkey.

En la siembra en medio de cultivo EMB se observó la formación de colonias con brillo metálico, con coloración violeta, rosa e incoloras (Figura 6). Todas las muestras sembradas tuvieron un buen crecimiento, por lo que, los microorganismos cultivados no fueron inhibidos por la eosina y el azul de metileno, con ello, se confirmó que los aislados son bacterias Gram negativas. Se diferenciaron las bacterias por la morfología de la colonia, así, se obtuvieron 5 bacterias con brillo metálico, 7 con color rosa, 3 incoloras y 3 violeta pálido (Tabla 7).

Tabla 7

Características morfológicas de las colonias cultivadas en medio EMB

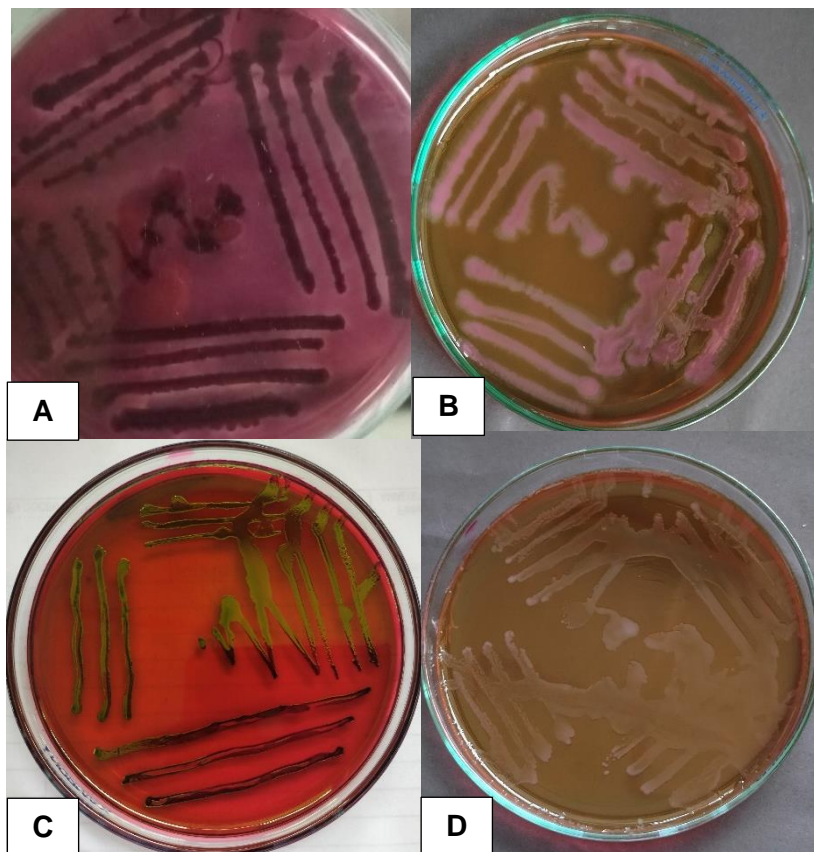
N° Colonia	Dilución	Color	Forma	Borde	Consistencia	Luz transmitida
Colonia 1	10 ⁻²	Incolora	Circular	Entero	mucoide	Opaco
Colonia 2	10 ⁻²	Verde	irregular	Ondulado	Seca	Brillo metálico
Colonia 3	10 ⁻²	Violeta pálido	Circular	Entero	Creмосa	Brillo
Colonia 4	10 ⁻²	Verde	irregular	Ondulado	Seca	Brillo metálico
Colonia 5	10 ⁻²	Violeta pálido	Circular	Entero	Creмосa	Brillo
Colonia 6	10 ⁻²	Rosado	Circular	Entero	Creмосa	Opaco
Colonia 7	10 ⁻³	Verde	Circular	Entero	Creмосa	Brillo metálico
Colonia 8	10 ⁻³	Rosado	Circular	Entero	Viscosa	Opaco
Colonia 9	10 ⁻³	Rosado	Circular	Ondulado	Creмосa	Opaco
Colonia 10	10 ⁻³	Violeta pálido	Circular	Ondulado	Creмосa	Brillo
Colonia 11	10 ⁻³	Verde	Circular	Entero	Seca	Brillo metálico
Colonia 12	10 ⁻³	Rosado	Circular	Entero	Creмосa	Opaco
Colonia 13	10 ⁻³	Rosado	Circular	Ondulado	Creмосa	Opaco
Colonia 14	10 ⁻³	Verde	Filamentosa	Filamentoso	Seca	Brillo metálico
Colonia 15	10 ⁻⁴	Rosado	Circular	Ondulado	Creмосa	Opaco

N° Colonia	Dilución	Color	Forma	Borde	Consistencia	Luz transmitida
Colonia 16	10 ⁻⁴	Incolora	Irregular	Entero	Seca	Opaco
Colonia 17	10 ⁻⁴	Incolora	Irregular	Entero	Cremosa	Opaco
Colonia 18	10 ⁻⁴	Rosado	Irregular	Ondulado	Cremosa	Opaco

Nota. Esta tabla muestra las diferentes características morfológicas de los 18 Colonias cultivados en medio EMB.

Figura 6

Crecimiento de bacterias en agar EMB



Nota. Crecimiento en EMB de los aislados en MacConkey, el crecimiento de la bacteria se evidencia por la coloración distinta, A. Violeta pálido; B. Rosa; C. Brillo metálico verde; y D. Incolora.

Identificación bioquímica

Para los 18 aislados se realizó la prueba de KIA (Figura 7) donde se obtuvo resultados similares, basados en estas características se decidió, se descartaron algunos aislados y se escogieron aquellos con resultados diferentes tanto en KIA como en agar MacConkey y EMB. Al final se identificaron un total de 8 bacterias diferentes (Tabla 8), a las cuales se les realizó una serie de pruebas bioquímicas (Tabla 9).

Tabla 8

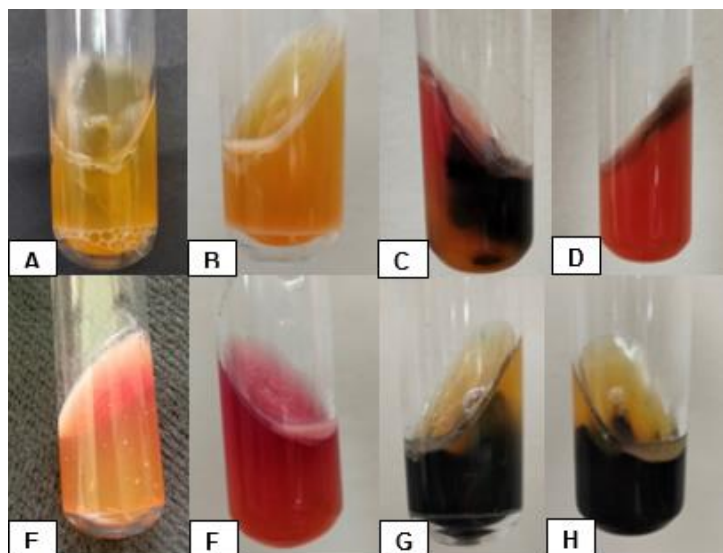
Resultados obtenidos en la prueba de Kligler Iron Agar

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	-	+

Nota: Resultados obtenidos en los aislados seleccionados; A: Reacción alcalina (color rojo); reacción ácida (color amarillo); (+) positivo; (-) negativo.

Figura 7

Resultados de la prueba de KIA



Nota: Resultados de KIA; A: A/A, gas; B: A/A, gas; C: K/A, H_2S ; D: K/K, H_2S ; E: K/A, gas; F: K/K; G: A/A, H_2S , gas; y H: A/A, H_2S .

Tabla 9

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

Nota. Resultados en las pruebas bioquímicas;(+): positivo;(-) negativo; (F) fermenta); (O) oxida.

Todos los aislados seleccionados despues de la diferenciación en medio KIA dieron resultados positivos para catalasa (Figura 8).

Figura 8

Prueba de catalasa

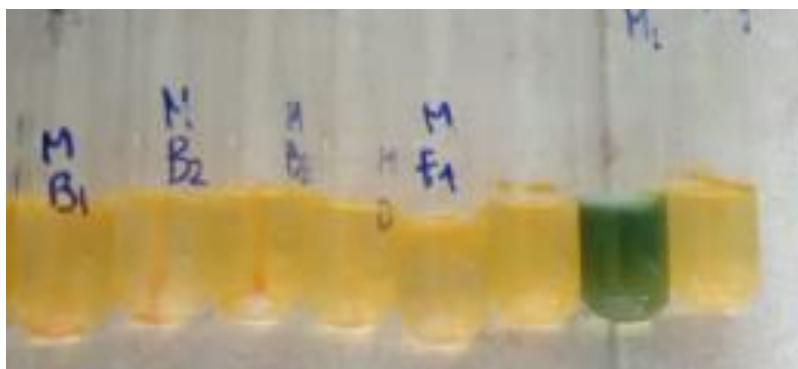


Nota: Desprendimiento de burbujas (resultado positivo) para la prueba de catalasa.

Se observan los resultados de las pruebas bioquímicas para O/F (Figura 9) y tinción gram (Figura 10).

Figura 9

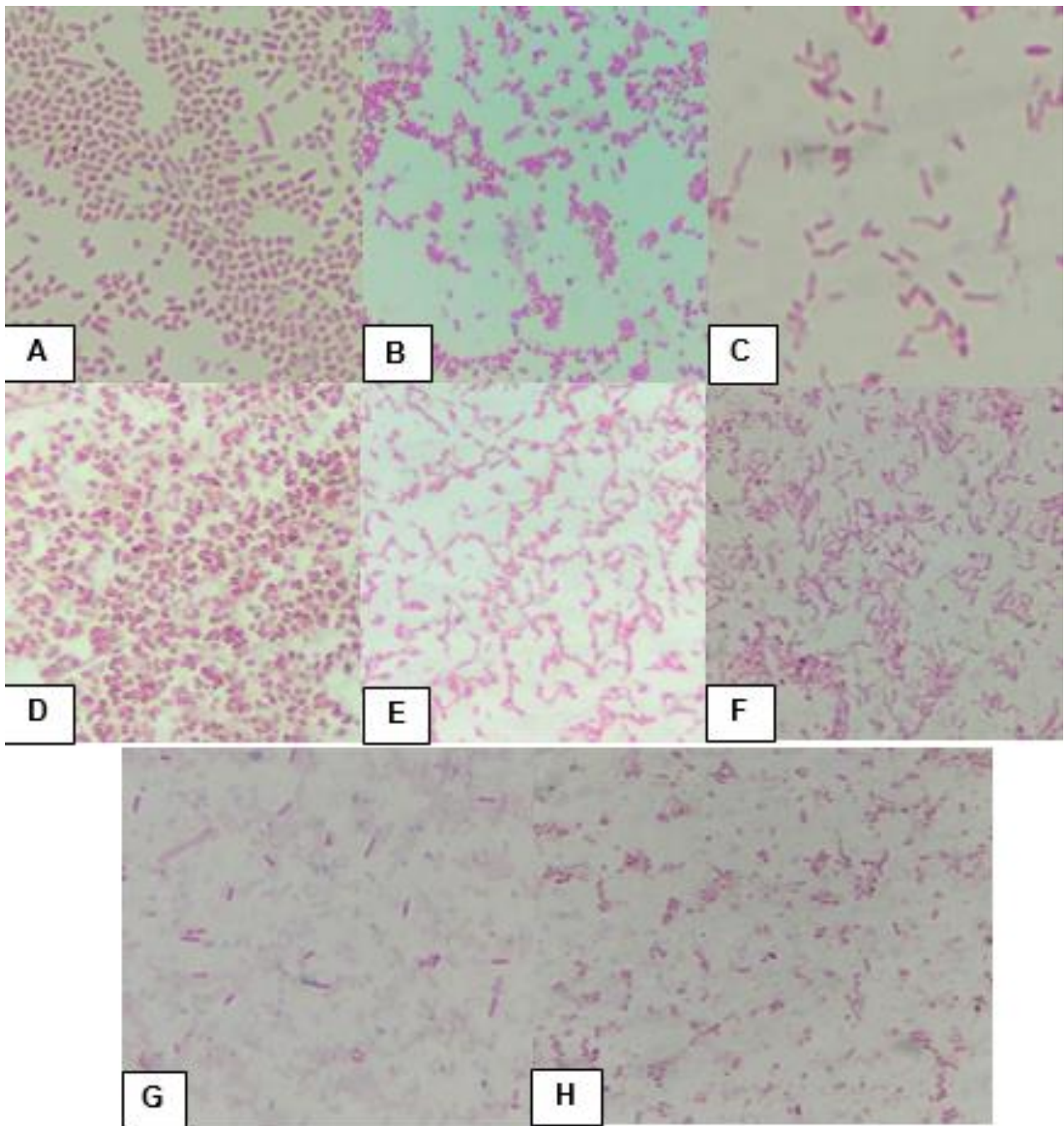
Reacciones obtenidas en la prueba de O/F



Nota: Solamente para un aislado se obtuvo resultados positivos para vía oxidativa..

Figura 10

Tinción Gram de los aislados seleccionados para identificación molecular



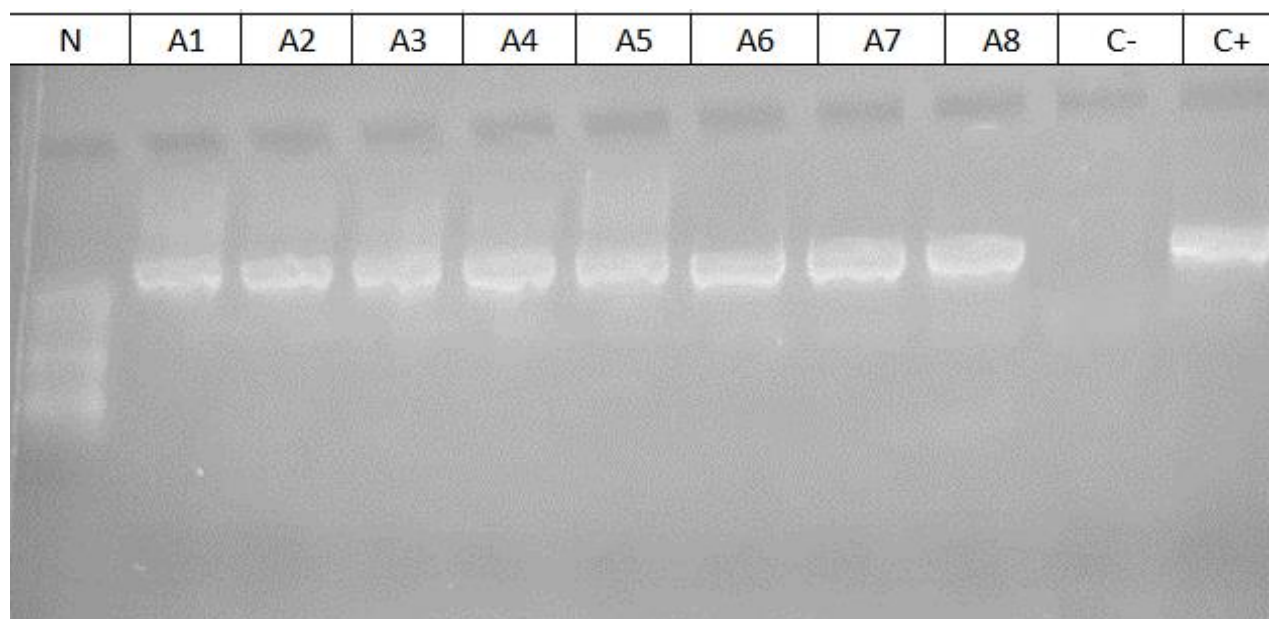
Nota. Mediante tinción Gram se observó la morfología de las bacterias estudiadas obteniendo bacilos y cocobacilos Gram negativos.

Caracterización molecular

De los ocho aislados se adquirieron fragmentos de alrededor de 1500 pb, cotejando el fragmento resultante con el marcador de peso molecular que se detalló en la sección metodológica (Figura 11).

Figura 11

Fragmentos de ADN genómico-amplificados visualizados por electroforesis



Nota. Los resultados se visualizaron a través de la técnica electroforesis. En la lectura de resultados se observa el Marcador molecular (N), bacterias aisladas (A), control positivo (C+), control negativo (-).

Mediante el análisis bioinformático se determinó la presencia de contaminación en el ADN extraído. Por este motivo se suprimieron los siguientes aislados A2, A4, A5 y A8 y se continuó el estudio con los aislados: A1, A3, A6 y A7. Mediante bioinformática se estableció el porcentaje de identidad de las secuencias genómicas de cada aislado (Tabla 10).

Tabla 10

Porcentaje de identidad de las bacterias

N° Aislado	Género o especie	Tanto por ciento de identidad
Aislado 1	<i>Escherichia coli</i>	99,93%
Aislado 3	<i>Salmonella typhi</i>	99,70%
Aislado 6	<i>Pseudomona spp</i>	94, 26%
Aislado 7	<i>Citrobacter spp.</i>	100 %

Nota. Las longitudes de los fragmentos de ADN se detallan para cada aislado: A1 (1387pb), A3 (336 pb) y A7 (119 pb).

Como resultado de los análisis de ADN se identificaron cuatro bacterias diferentes: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Citrobacter spp.* que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y *Pseudomona spp* a la familia *Pseudomonadaceae*, estas familias pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*.

Se amplificó la subunidad 16s mediante PCR de lo cual se observó fragmentos de 1500 pb, esto se corrobora con estudios donde se utilizó la secuenciación de este gen incluso para distinguir cepas que por otras técnicas serían fenotípicamente idénticas, esta característica ha hecho de este fragmento genético un gen requerido en la identificación y clasificación de bacterias (Beaudry et al., 2021; Woo et al., 2008). Sin embargo, según Cadavid Sánchez (2018) aunque un producto de PCR se muestre de buena calidad en el gel, la calidad de la secuenciación puede no ser la óptima, a pesar de haber purificado la muestra, puede deberse por: presencia de contaminantes, regiones ricas en microsatélite o GCs (Guanina-citocina), incluso se llega a perder en ADN en el paso de purificación.

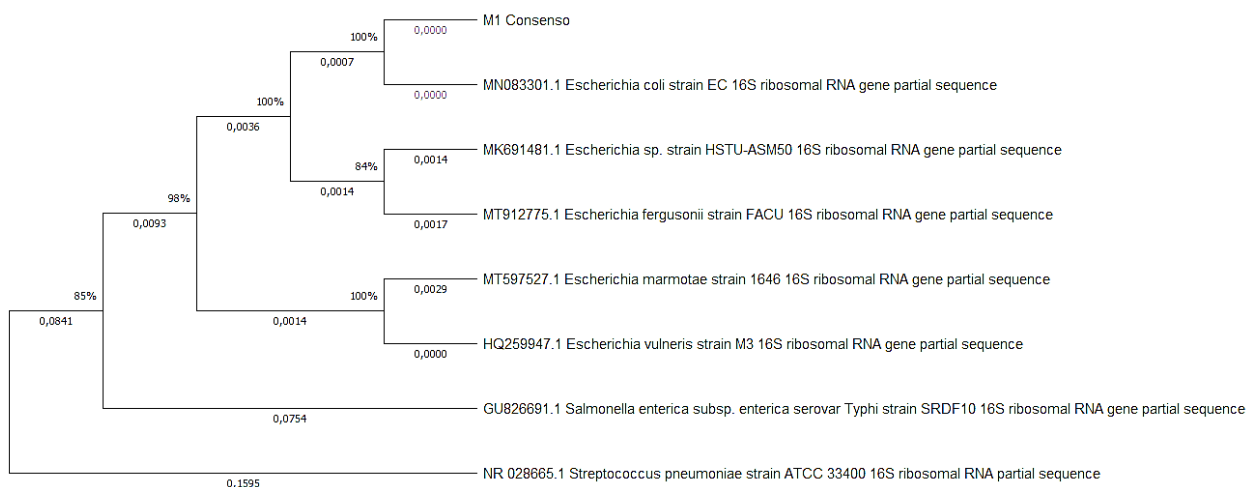
Análisis filogenético

Se obtuvo un árbol filogenético por cada bacteria debido al porcentaje tamaño de los fragmentos obtenidos en la secuenciación, con lo cual, se determinó el parentesco entre las especies más cercanas.

Cada árbol filogenético se construyó utilizando las secuencias del ADNr de la subunidad 16S, para el aislado (Figura 12) se observó que el nuestro aislado formó un clado con *Escherichia coli*. Adams *et al.* (2005) realizaron un árbol filogenético de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* basado en las secuencias ADNr subunidad 16S, donde obtuvieron que *Salmonella entérica* forma otro clado diferente con *Escherichia coli* (Adams *et al.*, 2006).

Figura 12

Árbol filogenético de *Escherichia coli*

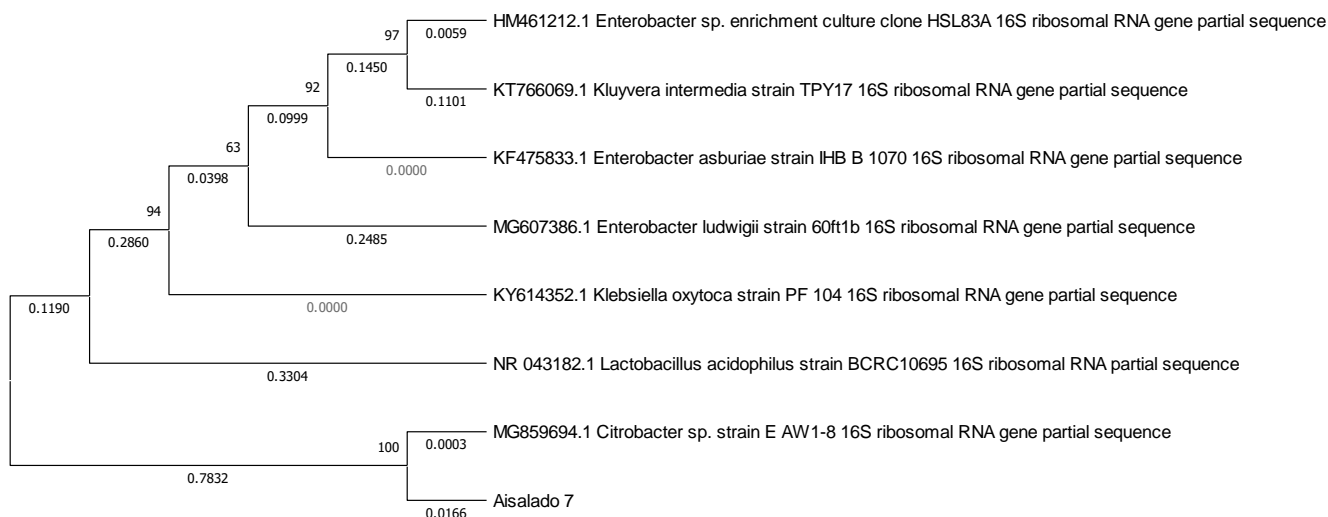


Nota. La Figura muestra el árbol filogenético donde se puede observar dos clados donde: *E. vulneris* y *E. marmotae* se agruparon en un grupo, *Escherichia sp.*, *E. fergusonii*, *E. coli* y el aislado 1 se agrupan en otro, además se puede observar que *Salmonella* y *Streptococcus* son grupos externos.

El aislado 7 se observa que está emparentado con *Citrobacter* spp, (Figura 13) con lo cual, la bacteria aislada es *Citrobacter* spp. Según Boye & Hansen (2013) en su estudio realizó la secuenciación ADNr 16S de *Klebsiella* spp., el género *Klebsiella* se observa emparentados con los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*, de manera que, se corrobora los taxones formados.

Figura 13

Árbol filogenético de *Citrobacter* sp.



Nota. En la Figura se muestra el árbol filogenético donde se observa dos cladogramas: el primero formado por *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter* spp, *E. asburiae*, *E. ludwigii*, *Klebsiella oxytoca* y *Lactobacillus acidophilus* (grupo externo) y el segundo formado por *Citrobacter* spp y el aislado 7.

Dentro del análisis microbiológico de agua en la salud animal, por buenas prácticas de producción, se debe realizar un monitoreo del agua, donde debe descartarse la presencia de (Figueroa, 2016) :

- *Staphylococcus* spp.
- *Escherichia coli*
- *Salmonella* spp.
- Coliformes totales (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*)

Para realizar un control fiable de la calidad del agua se utiliza indicadores de contaminación fecal, la presencia de coliformes indica la presencia de patógenos en el agua, dentro del grupo de coliformes totales se encuentran: *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* que están asociadas a material fecal y también se encuentran en el ambiente (Sobsey et al., 2006). Los coliformes más comunes encontrados son: *Escherichia* y en menor grado *Enterobacter*, *Streptococcus* y *Citrobacter*.

El aislado 3 (Figura 14), se obtuvo que forma un clado con *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*. Paradis (2005) en su estudio realizó un árbol filogenético ADNr 16S donde se evidencia que pertenecen a un clado *Shigella flexneri* con *S. enterica* serovar *typhimurium* (Fukushima, 2002).

Figura 14

Árbol filogenético del *S. enterica* subsp. *typhi*



Nota. La Figura muestra el árbol filogenético donde las cepas de la subespecie *Salmonella* se agruparon en tres clados, en un grupo se encuentran: *K. aerogenes*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium*, *S. enterica* subsp. *Arizonae* y *S. flexneri*, en otro clado se agrupan: *S. enterica* subsp. *indica* y *S. enterica* subsp. *houtenae*, y en el último grupo formando un clado se encuentra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*.

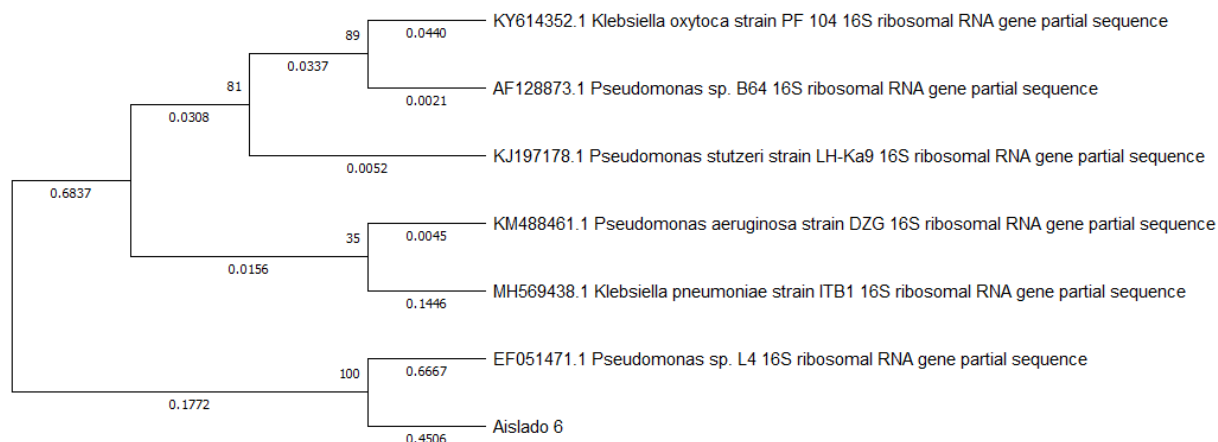
Salmonella enterica serotipo *typhi* se contrae por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con heces de personas portadoras de la bacteria, cuyo reservorio único es el cuerpo humano, sin embargo, Gálvez-Chan (2013) aisló *Salmonella typhi* de aguas residuales porcinas, pero el serotipo más encontrado en cerdos es *Salmonella typhimurium* la cual está asociada con diarrea en cerdos y es fuente de contaminación para el hombre (Volf et al., 2012).

Se ha informado la resistencia de *Salmonella typhi* en muestras clínicas, dentro de este estudio informaron que las muestras presentaron sensibilidad a los antimicrobianos, entre ellos se encontraban gentamicina y sulfametoxazol/trimetoprima, existen pocos relatos sobre resistencia en esta bacteria, existe un aumento porcentual entre los años 2003 a 2005, lo que refuerza que la principal razón de esta resistencia, es el consumo indiscriminado de antimicrobianos (Souza et al., 2010). En el caso sulfametoxazol/trimetoprima es un antibiótico utilizado para tratar infecciones bacterianas en porcinos de engorde, normalmente por diarrea provocada por *E. coli*, de manera que, se supone existe resistencia adquirida de *S. typhi* por el uso de este antibiótico.

El árbol filogenético del aislado 6 corresponde a *Pseudomonas* (perteneciente a la clase Gammaproteobacterias), este aislado forma un grupo monofilético con *Pseudomonas* spp. En el estudio realizado por Ye et al. (2014) en el árbol filogenético se puede observar que *Pseudomonas aeruginosa* conforma un taxón parafilético con *Pseudomonas stutzari*, como se puede observar en la Figura 15.

Figura 15

Árbol filogenético del *Pseudomona* spp.



Nota. La Figura muestra un árbol filogenético del aislado 6, donde se observan tres clados diferentes. El primero conformado con *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomona* spp., *P. stutzeri*, *P.aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y el segundo clado que emparenta al aislado 6 con *Pseudomona* spp.

La diseminación de *Pseudomonas* se debe a los componentes capsulares que posee, estas le confieren resistencia al ataque de los macrófagos, por su complejo mecanismo de acción, produce enfermedades en diferentes órganos (Rodríguez & Cohrs, 2005) . En el análisis de la calidad microbiológica en agua de establecimientos porcinos, se menciona que esta bacteria puede colonizar la superficie de tanques y cisternas de agua y cañería, hasta llegar a los bebederos de agua de los cerdos, debido a que es capaz de protegerse de los agentes desinfectantes utilizados en el tratamiento de las aguas y por la resistencia a antibióticos que posee es utilizada como indicador de las consecuencias que provoca el uso irracional de antibióticos en prácticas veterinarias y de la contaminación de fuentes de agua (Kopp et al., 2015).

Resistencia a antibióticos

La resistencia está en la naturaleza misma de las bacterias y se manifestara cada vez que su supervivencia se vea amenazada. Uno de los grandes retos que enfrenta la infectología es el problema de la resistencia a antibióticos que debe ser tomada en consideración con la finalidad de evitar llegar al momento en que los antibióticos no sean por más tiempo útiles para combatir enfermedades (Calderón & Aguilar , 2016).

Para el diseño bifactorial en el estudio sobre la resistencia antimicrobiana la variable dependiente a estudiar se midió por el halo de inhibición, en la Tabla 11 se muestra el Análisis de varianza correspondiente, donde se encontró diferencia significativa en el factor A (Bacterias), factor B (Antibiótico) y en las interacciones AxB, por el contrario, en las repeticiones no existe diferencia significativa.

Tabla 11

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			

Nota. Análisis de varianza que presenta las diferencias significativas.

En la Tabla 12 con respecto a la prueba de Tukey para el factor A se observó diferencia en las cinco bacterias, de manera que, se encontraron cuatro grupos homogéneos, donde *Salmonella typhi* presenta menor halo de inhibición; seguido de *Pseudomona spp*, *Escherichia coli* y *Citrobacter spp*. En la Tabla 13 se observan cuatro grupos independientes en antibióticos y en la tabla 14 ocho grupos homogéneos de las interacciones.

Tabla 12

Resultados de la prueba de significancia de Tukey < 0,05 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

Nota. Se muestra los cuatro grupos homogéneos, donde *Salmonella typhi* presentó menor halo de inhibición

Tabla 13

Resultados de la prueba de significancia Tukey < 0,05 para el 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

Antibiótico	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Trimetoprima/Sulfametoxazol	15	23,07	0,241946	D

Nota. Se muestra los cuatro grupos independientes, donde penicilina es el antibiótico que menor halo de inhibición presento, en contraste, Trimetoprima/Sulfametoxazol presentó mayor halo de inhibición.

Tabla 14

Prueba de significancia de Tukey < 0,05 de la interacción AxB (Bacteria x Antibiótico)

Enterobacterias	Antibiótico	Medias	Casos	Sigma LS	Grupos homogéneos
<i>Salmonella typhi</i>	Trimetoprima/ Sulfametoxazol	8	3	0,54	A
<i>Pseudomona</i> spp.	Cefalexina	8	3	0,54	A
<i>Citrobacter</i> spp.	Penicilina	8	3	0,54	A
Control	Penicilina	8	3	0,54	A
<i>Salmonella typhi</i>	Penicilina	8	3	0,54	A
<i>Pseudomona</i> spp.	Penicilina	8	3	0,54	A
<i>Escherichia coli</i>	Penicilina	8,33	3	0,54	A
<i>Pseudomona</i> spp.	Gentamicina	11,33	3	0,54	B
<i>Escherichia coli</i>	Cefalexina	17,67	3	0,54	C

Enterobacterias	Antibiótico	Medias	Casos	Sigma LS	Grupos homogéneos
<i>Escherichia coli</i>	Gentamicina	18	3	0,54	CD
Control	Cefalexina	20	3	0,54	CDE
<i>Citrobacter</i> spp	Trimetoprima/Sulfametoxazol	20	3	0,54	CDE
<i>Salmonella typhi</i>	Cefalexina	20	3	0,54	CDE
<i>Salmonella typhi</i>	Gentamicina	20,33	3	0,54	CDE
<i>Citrobacter</i> spp	Gentamicina	20,67	3	0,54	DE
<i>Citrobacter</i> spp	Cefalexina	21,67	3	0,54	E
<i>Escherichia coli</i>	Trimetoprima/Sulfametoxazol	21,67	3	0,54	E
Control	Gentamicina	27	3	0,54	F
Control	Trimetoprima/Sulfametoxazol	30,33	3	0,54	G
<i>Pseudomona</i> spp	Trimetoprima/Sulfametoxazol	35,33	3	0,54	H

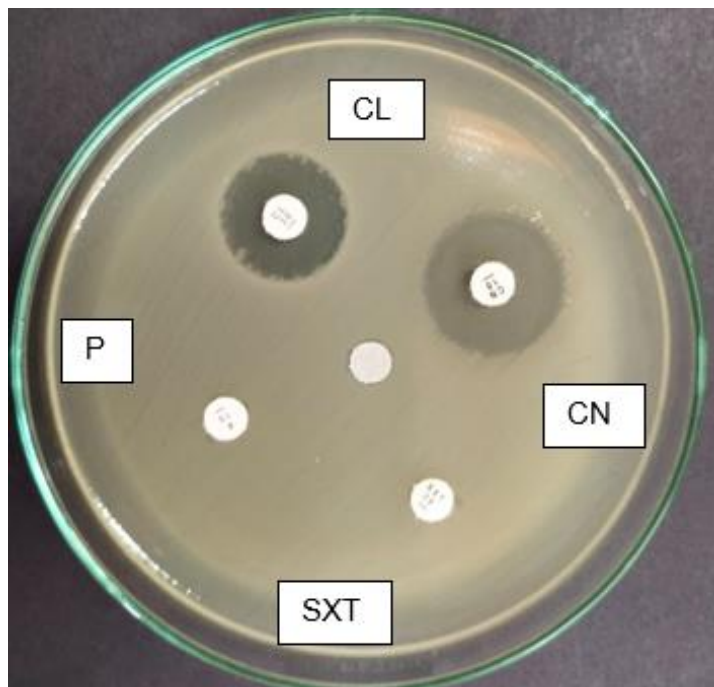
Nota. Se visualizó 10 grupos homogéneos donde se indica que los grupos G y H tuvieron un mayor halo de inhibición, mientras el grupo A mostró el menor halo de inhibición.

Utilizando como antibiótico Trimetoprima/Sulfametoxazol en la prueba de sensibilidad antimicrobiana se obtuvo 3 bacterias sensibles al antibiótico ya que poseen zonas de inhibición o halos de inhibición mayores o iguales a los rangos propuestos (Figura 17), por otro lado, se obtuvo resistencia antimicrobiana en *Salmonella typhi* ya que su halo de inhibición se encontraba dentro del rango de resistencia encontrado (Figura 16) (Brown & Heidi , 2017).

Los resultados obtenidos difieren con otros estudios donde se recomienda el uso de Trimetoprima con sulfametoxazol para tratar infecciones producidas por microorganismos susceptibles a este antimicrobiano, debido a que no encontraron resistencia, incluso indicaron el Trimetoprima con sulfametoxazol como tratamiento para la fiebre tifoidea producida por *Salmonella typhi* (Rodríguez R. , 2015) . Por la bibliografía consultada, se sabe que no se ha encontrado resistencia de Trimetoprima/Sulfametoxazol en *Salmonella typhi*, por esta razón, se cree que *Salmonella typhi* aislada en este trabajo presento resistencia adquirida a Trimetoprima/Sulfametoxazol.

Figura 16

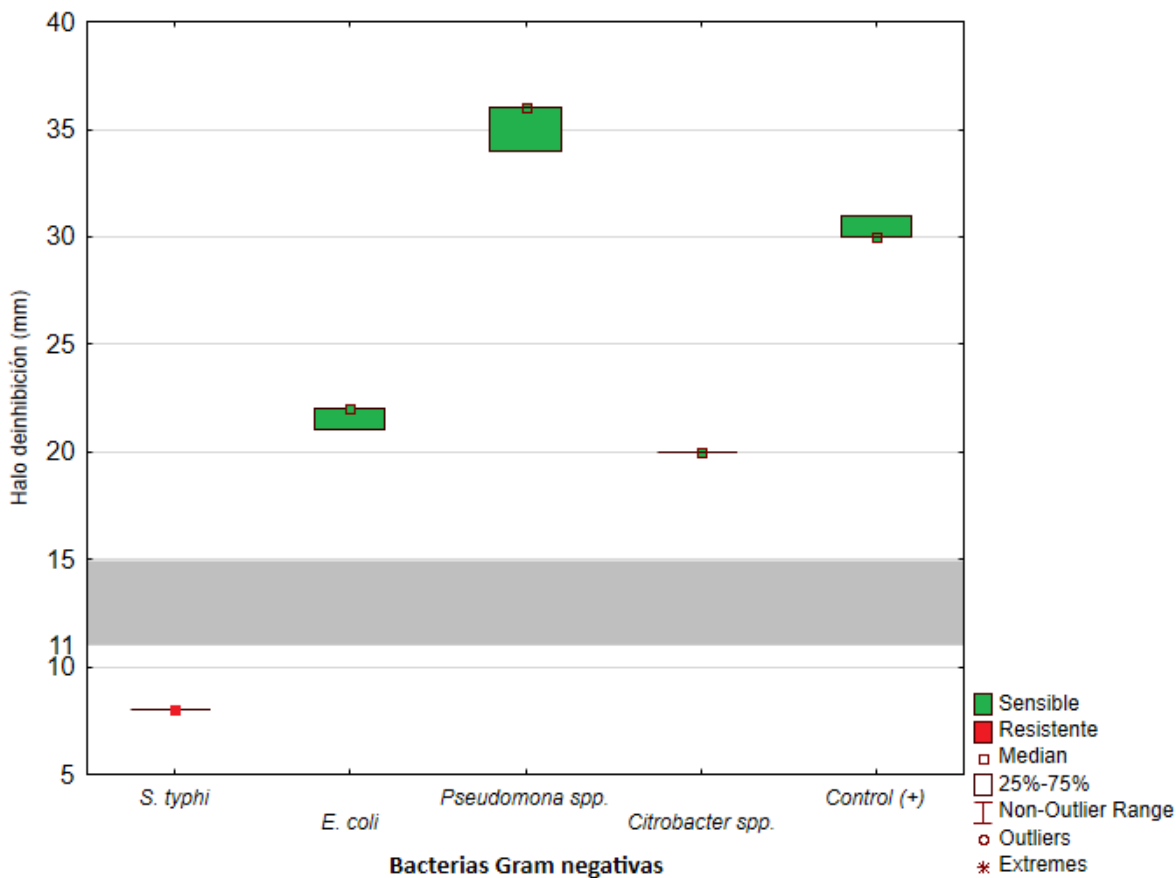
Halo de inhibición de Salmonella typhi



Nota. Placa con discos CL: cefalexina; CN: Gentamicina; P: penicilina y SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol

Figura 17

Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por Trimetoprima/Sulfametoxazol



Nota. La banda gris muestra los rangos de sensibilidad intermedia para cefalexina (11-15 mm).

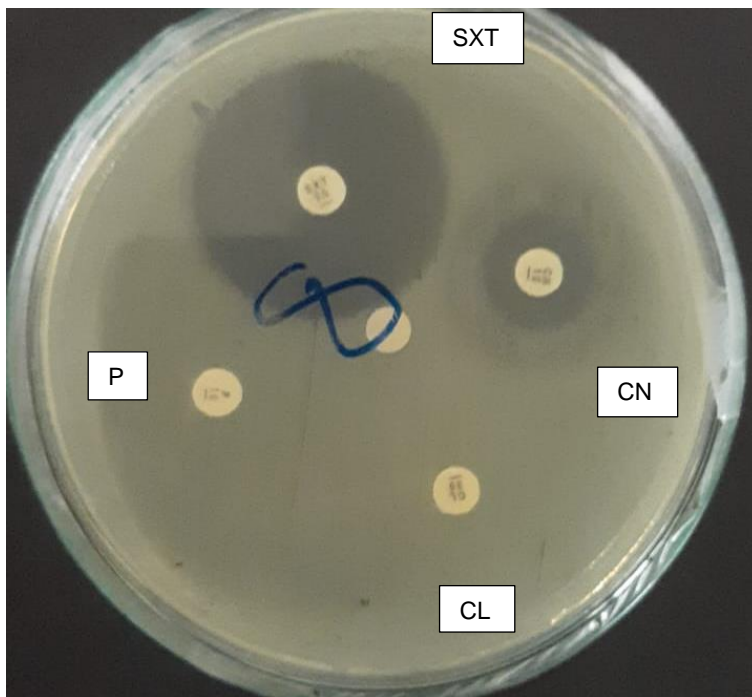
En la prueba de sensibilidad antimicrobiana para cefalexina (Figura 20) y gentamicina se obtuvieron patrones de resistencia en la bacteria Gram negativa *Pseudomona spp.* (Figura 19). En esta prueba se pudo constatar la carencia total de halo de inhibición en cefalexina y un halo mínimo en gentamicina (Figura 18), en ambos casos se observa alta resistencia ya que las zonas de inhibición se encontraban dentro de los rangos de resistencia, en cambio en las 3 enterobacterias se obtuvo sensibilidad ante estos dos antibióticos ya que el halo de inhibición fue mayor o igual a los rangos de sensibilidad establecidos para cefalexina y gentamicina.

Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios en los que se ha reportado que el género de *Pseudomonas* posee resistencia adquirida además de la intrínseca propia de su género en cefalosporinas de primera y segunda generación.

En esos estudios también se reportó que las cepas tienen la capacidad de transmitirse entre ellas genes que median la resistencia, utilizando incluso a las enterobacterias para este fin (Gómez et al., 2005).

Figura 18

Halo de inhibición de Pseudomona

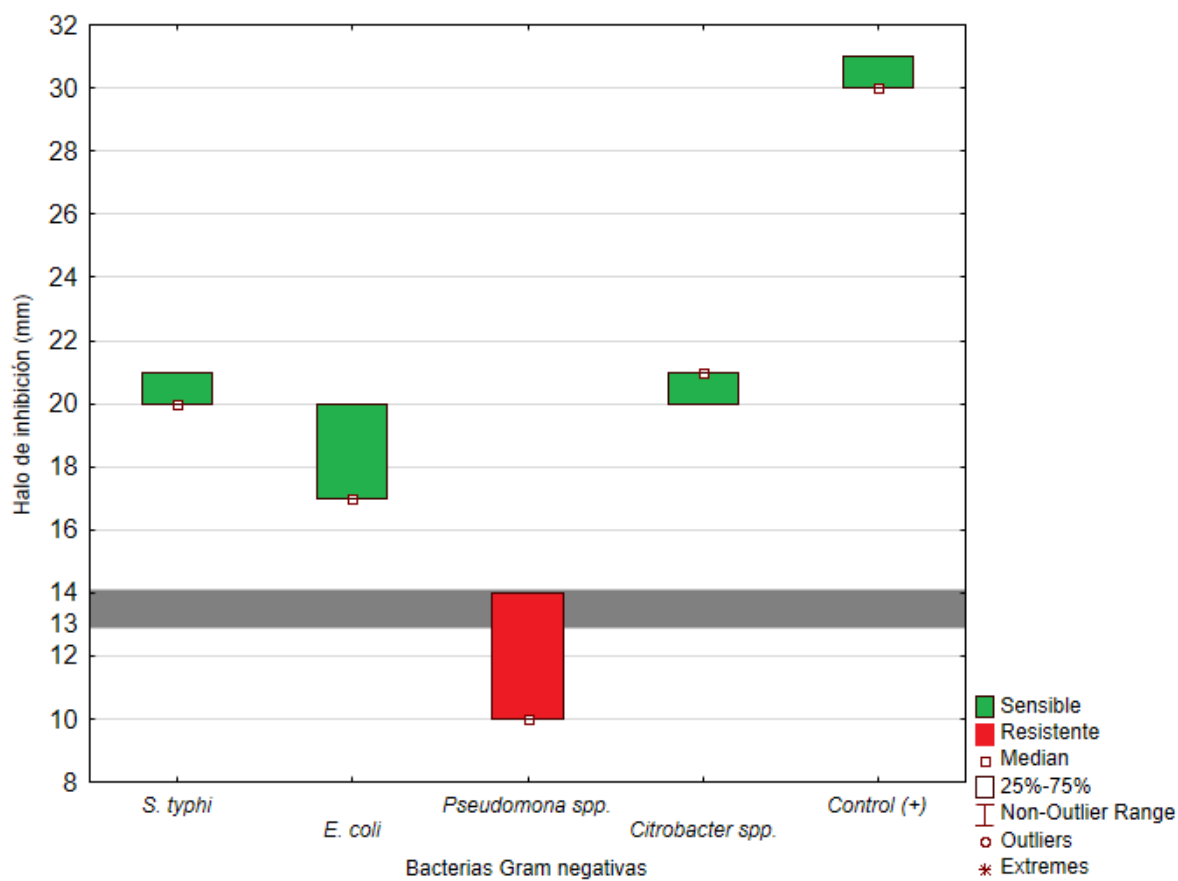


Nota. Placa con discos CL: cefalexina; CN: Gentamicina; P: penicilina y SXT:

Trimetoprima/Sulfametoxazol

Figura 19

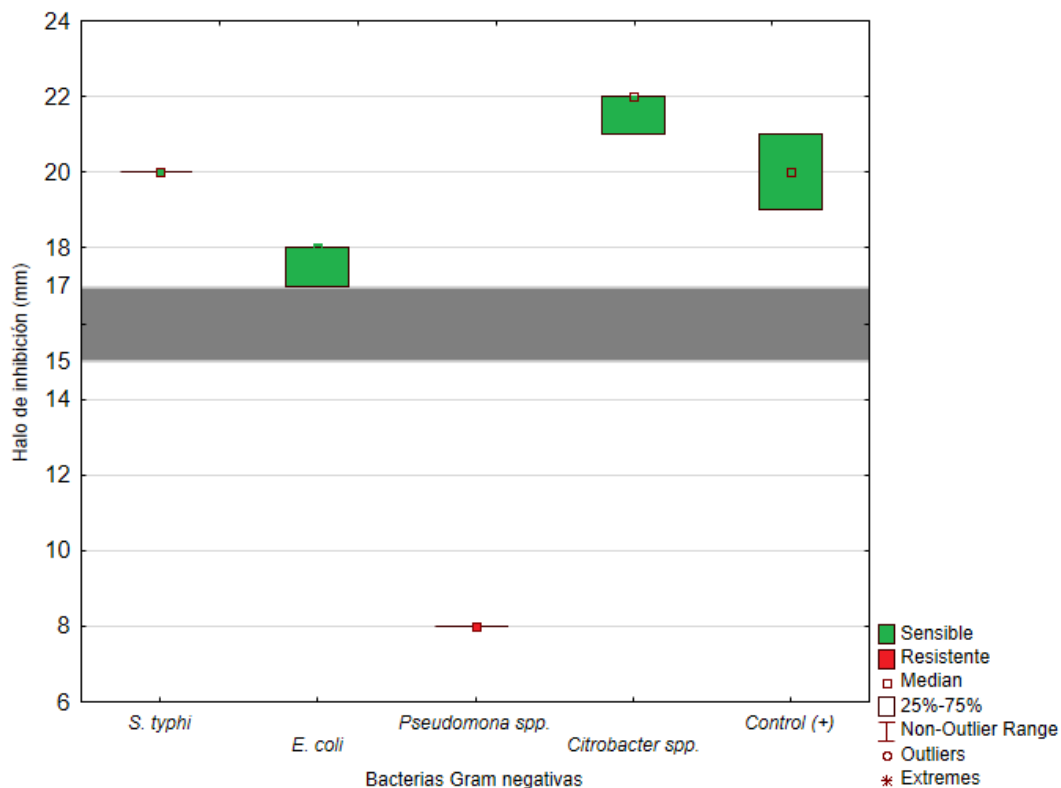
Diagrama de cajas del halo inhibición producido por gentamicina



Nota. La banda gris muestra los rangos de sensibilidad intermedia para cefalexina (13-14 mm), las bacterias con halos de inhibición menores o iguales a 13 mm son resistentes y las que poseen un halo de inhibición mayores o iguales a 14 mm son sensibles

Figura 20

Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por Cefalexina



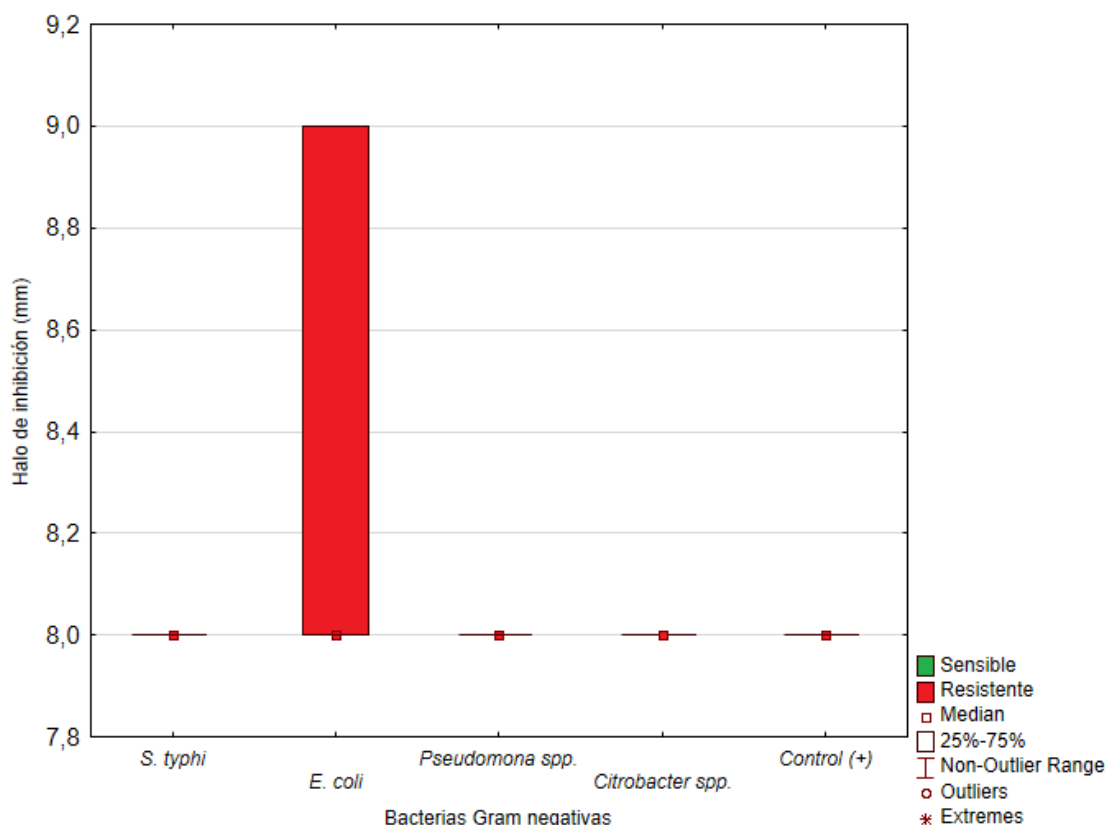
Nota. La banda gris muestra los rangos de sensibilidad intermedia para cefalexina (15-17 mm), las bacterias con halos de inhibición menores o iguales a 15 mm son resistentes y las que poseen un halo de inhibición mayores o iguales a 17 mm son sensibles.

Para penicilina se obtuvieron patrones de resistencia muy elevados (Figura 21), ya que todas las bacterias presentaron un halo de inhibición dentro del rango de resistencia, siendo todas las zonas de inhibición menores a 14 mm. Esto coincide con estudios que avalan la resistencia para penicilina en el género *Salmonella spp* y en *Escherichia coli* donde se justifica que la resistencia antibiótica presentada por estas dos enterobacterias puede deberse a que la penicilina sufrió cambios en el mecanismo de acción como la inhabilitación enzimática, impermeabilidad de la pared celular, expulsión del antimicrobiano por mecanismos activos (Carhuapoma et al., 2020).

Según Navarro (2010) las especies *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus* presentan patrones de resistencia natural a ampicilina y ticarcilina, para *Citrobacter freundii* los patrones de resistencia se presentan en ampicilina, amoxicilina, cefalosporina de primera generación, cefoxitina y para cefuroxima halos reducidos.

Figura 21

Diagrama de cajas del halo de inhibición producido por penicilina.



Nota. Se analizó la gráfica con los rangos de penicilina para *Enterococcus spp* donde el rango se referencia es: Resistente ≤ 14 y sensible ≥ 15 .

Todas las bacterias identificadas mostraron resistencia a penicilina, siendo *Pseudomonas* spp., la bacteria que presentó multiresistencia a cefalexina, gentamicina y penicilina, en este estudio, es la bacteria con mayor resistencia a antibióticos luego se encuentra *Salmonella typhi*, resistente a penicilina y a Trimetoprima/Sulfametoxazol, *Citrobacter* spp. y *Pseudomonas* spp en este estudio presentan resistencia a penicilina, esta resistencia es intrínseca debido a que producen la enzima penicilinasa naturalmente (Cercenado & Saavedra, 2009).

En *Escherichia coli* la resistencia a penicilina es adquirida, ya que naturalmente es sensible a la mayoría de antibióticos betalactámicos donde se encuentra la penicilina, se han descrito la presencia de múltiples genes que confieren resistencia a este antibiótico y que están muy extendidos en *Escherichia coli* de animales, por lo que esta resistencia adquirida es muy común en esta bacteria ya que puede acumular múltiples genes de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes (Poirel et al., 2018). *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en otros estudios reportaron resistencia adquirida a penicilinas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Cercenado & Saavedra, 2009).

Capítulo V: Conclusiones

Se acepta la hipótesis alternativa (H_{a1}), por ende, existe presencia de enterobacterias en las aguas residuales provenientes de la zona de descarga de desechos líquidos de porcinos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, puesto que, se encontró un valor promedio de $3,01 \times 10^4$ UFC/ ml para coliformes totales.

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 *Pseudomona* spp respectivamente.

De acuerdo con el análisis de ANOVA se concluye que hubo diferencia significativa en el factor A, factor B y en la interacción AxB, mientras que en las repeticiones no hubo diferencia significativa, con lo cual hay normalidad en los datos. En la prueba de significancia de Tukey de la interacción AxB, se concluye que *Salmonella typhi* + Trimetoprima/Sulfametoxazol presentó el menor halo de inhibición.

Se acepta la hipótesis alternativa (H_{a2}), por ende, al menos una enterobacteria presentó resistencia a los antibióticos utilizados. Mediante la técnica de antibiograma por difusión con disco se determinó la susceptibilidad antimicrobiana, donde *Salmonella typhi* presentó resistencia adquirida a Trimetoprima/Sulfametoxazol y en *Pseudomonas* spp presentó resistencia a cefalexina y gentamicina.

Capítulo VI: Recomendaciones

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.

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 y tener mejores posibilidades de una detección acertada.

VII. Bibliografía

- Brown , A., & Heidi , S. (2017). *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual-- Complete Version*.
- Wandee, S., Chan, R., & Chiemchai, W. (2021). Alteration of antibiotic-resistant phenotypes and minimal inhibitory. *Science of The Total Environment*, 781.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146743>
- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P., & Klein, M. G. (2006). Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens. *Biological control*, 38(1), 32-49.
- Alcántara, A. B., Ramos, A. M., Hernández, G. R., Lozano, M. A., Hach, J. L., & Gamba, R. M. (2008). Evaluación del suministro de agua residual tratada por separación-sedimentación-filtración en la salud de cerdos destetados. *Técnica Pecuaria en México*, 46(3), 287-302.
- Arana , I., Orruño, M., & Barcina , I. (2010). *Como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología*. (M. y. Enumeración de microorganismos. Departamento Inmunología, Ed.)
- Beaudry, M., Wang, J., Kieran, T., Thomas, J., Bayona, N., Gao, B., . . . Glenn, T. (2021). Improved Microbial Community Characterization of 16S rRNA via Metagenome Hybridization Capture Enrichment. *Front Microbiol*. <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2021.644662>.
- Boye, K., y Hansen , D. S. (2013). Sequencing of 16S rDNA of Klebsiella: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *nternational Journal of Medical Microbiology*, 292(7-8), 495-503 . <https://doi.org/doi:10.1078/1438-4221-00228>
- Brener, D., y Farmer, J. (2015). Enterobacteriaceae. *Manual de sistemática de arqueas y bacterias de Bergey*, 1-24. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118960608.fbm00222>

- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2010). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology* (25th ed.). McGraw Hill/Medical.
- Brown, A., y Smith, H. (2017). *Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Cadavid Sánchez, I. (2018). Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación (Caso Macrogen). Sello Editorial Tecnológico de Antioquía.
<https://dspace.tdea.edu.co/handle/tdea/1478>
- Calderón , R. G., y Aguilar , U. L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Med Cos*, 76(621), 757-763.
- Cangliang , S., y Yifan , Z. (2022). CHAPTER 8 - Lab practice test 1 – identify unknown bacteria using Gram-stain. *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science, Academic Press*, 39-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821678-1.00020-4>
- Cappuccino, J. G., y Welsh, C. T. (2017). *Microbiology: a laboratory manual*. Pearson Education.
- Carhuapoma, V., Valencia, N., Huaman, T., Paucar, R., Hilario, E., & Huere, J. (2020). Antibiotic resistance of Salmonella spp., Escherichia coli isolated from alpacas (Vicugna pacus) with and without diarrhea. *Journal of Life Sciences*, 31(1), 98-109.
<https://doi.org/https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.08>
- Castle, S. S. (2007). Penicillins. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. , 1-3.
<https://doi.org/doi:10.1016/b978-008055232-3.61011-6>
- Cercenado, E., & Saavedra, J. (2009). El antibiograma (II): fenotipos de resistencia y lectura interpretada. *Anales de Pediatría Continuada* , 7(5), 282–287.
[https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)72580-6](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)72580-6)
- Corry, J. E., Curtis, G. D., & Baird, R. M. (2003). *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* (Vol. 37). Elsevier Science B. V.

- De Agelis, G., Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., y Tumbarello, M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21, Issue 14. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- De Benedetti, S., Fisher, J. F., & Mobasher, S. (2021). *Practical handbook of microbiology*. In Practical Handbook of Microbiology: CRC Press.
- De la Fuente, N. M., Villarreal-Prieto, J., Díaz, M., & García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2), 7-17.
- Fedare, F. T., Adefisoye, M. A., & Okoh, A. I. (2020). Occurrence, identification, and antibiogram signatures of select Enterobacteriaceae from Tsomo and Tyhume rivers in the Eastern Cape Province, Republic of South Africa. *PLOS ONE*, 15, 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone0238084>
- Figuroa, M. M. (2016). MANUAL DE ENFERMEDADES DE LOS CERDOS.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2779–2785. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.40.8.2779-2785.2002>
- Fukushima, M., Kakinuma, K., & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence. *Fukushima, M., Kakinuma, K., & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence*, 40(8), 2779-2785. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.40.8.2779-2785.2002>
- Gálvez-Chan, R. A. (2013). Tratamiento con extracto de Azadirachta indica en aguas residuales porcinas contaminadas con Salmonella typhi. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 9(1), 62-69.

- Gómez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, M. d., & Navarrete Jiménez, M. L. (2005). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: understanding a dangerous enemy. *Journal of the Faculty of Medicine*, 5(1), 27-34.
- Green, L. H., & Goldman, E. (2021). *Practical Handbook of Microbiology*. In Practical Handbook of Microbiology. CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781003099277>
- Hernández-Barrera, J. C., Angarita-Merchán, M., & Prada-Quiroga, C. F. (2017). Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria. *Ciencia y agricultura*, 14(2), 27-38.
- Homeier-Bachmann, T., Heiden, S. E., Lübcke, P. K., Bachmann, L., Bohnert, J. A., Zimmermann, D., & Schaufler, K. (2021). Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050568>
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9 (AUG), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02045>
- Howland, J. L. (1996). Preparación de ADN genómico bacteriano. In F. Ausubel (Ed.). *Short protocols in molecular biology*(3rd ed., Vol. 24, Issue 1, p. 68). <https://doi.org/10.1002/bmb.1996.5690240143>
- Ismalaj, E., y Borggraeve, W. D. (2022). *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV (Fourth Edition)*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818655-8.00141-4>
- ITIS. (2022). *Integrated Taxonomic Information System*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=245#null
- Jung, B., y Hoilat, G. J. (2020). MacConkey Medium. *In StatPearls*.
- Kopp, S. B., Pérez, M. A., García, S. D., & Patiño, S. M. (2015). Calidad microbiológica estacional del agua de bebida para cerdos: Análisis comparativo en establecimientos porcinos de la zona núcleo de la provincia de Córdoba. *Revista SNS*, 9, 15-20.

- Lagier, J., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. 28(1). *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208-236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
- Lima, L. M., Monteiro da Silva, B. N., Barbosa, G., y Barreiro, E. J. (2020). β -Lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112829., 208, 72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2018). *Textbook of diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Marín, M., y Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 42-55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
- Morales-López, S., Yepes, J. A., Prada-Herrera, J. C., & Torres-Jiménez, A. (2019). Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. 13(4), 265-273. <https://doi.org/10.3855/jjdc.11216>
- Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638-645. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>
- Pallares, C. (2019). Medidas de prevención y control para enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Bogotá· Ciudad de México· Caracas· Lima· Madrid· Panamá· Pittsburgh.
- Partridge, S. R. (2015). Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology*, 47(3), 276-284. <https://doi.org/doi:10.1097/pat.0000000000000237>
- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. . *Microbiol Spectr.*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>. PMID: 30003866.

- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease, 2nd Edition*. United Kingdom: WileyBlackwell.
- Rathborey, C., Chart, C., Wilai, C., Alongkot, B., & Phitsanu, T. (2021). Occurrence of antibiotics in typical pig farming and its wastewater treatment in Thailand. *Emerging Contaminants*, 8, 21-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.emcon.2021.12.003>
- Rodríguez, J. T., y Cohrs, D. P. (2005). *Microbiología: lo esencial y lo práctico*.
- Rodríguez, R. (2015). *Trimethoprim with sulfamethoxazole: Antimicrobials*. Academic Vademecum of Medications.
- Rojas-Badía, M. M., Larrea-Murrell, J. A., Romeu-Álvarez, B., Heydrich-Pérez, M., & Rojas-Hernández, N. M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(3), 024-034.
- Shen, C., & Zhang, Y. (2022). *CHAPTER 8 - Lab practice test 1 – identify unknown bacteria using Gram-stain*. Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821678-1.00020-4>
- Sobsey, M. D., Khatib, L. A., Hill, V. R., Alocilja, E., & Pillai, S. (2006). Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate.
- Souza, C. D., Ramos, F. L., Mota, C. D., Santos, L. V., & Lopes, M. L. (2010). Resistência antimicrobiana de *Salmonella typhi* identificadas no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2), 61-65.
- Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Van Boeckel, T., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B., Levin, S., Robinson, T. T., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals.

Proceedings of the National Academy of Sciences. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1503141112>.

Volf, J., Stepanova, H., Matiasovic, J., Kyrova, K., Sisak, F., Havlickova, H., . . . Rychlik, I. (2012). Salmonella enterica serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signalling in palatine tonsils. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2).
<https://doi.org/ttps://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.004>

Woo, P., Lau, S., Teng, J., Tse, H., & Yuen, K. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908–934.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>

Ye , L., Hildebrand, F., Dingemans, J., Ballet, S., Laus, G., Matthijs, S., & Cornelis, P. (2014). Draft Genome Sequence Analysis of a Pseudomonas putida W15Oct28 Strain with Antagonistic Activity to Gram-Positive and Pseudomonas sp. Pathogens. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110038>