



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

Alvear Falcones, Jorge Sebastián

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

Dra. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

29 de agosto del 2022



Reporte de verificación del contenido

[ALVEAR_TESIS.pdf](#)

Scanned on: 12:37 August 24, 2022 UTC



Identical Words	236
Words with Minor Changes	93
Paraphrased Words	209
Omitted Words	1217

Naranjo Gaybor, Sandra Judith. PhD.

C. C: 1709384422

Directora del proyecto



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 del área de ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo”** fue realizado por el/los señor/señores **Alvear Falcones Jorge Sebastián**, 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, 29 de agosto de 2022

Firma:

Naranjo Gaybor, Sandra Judith

C. C.: 1709384422



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Alvear Falcones Jorge Sebastián**, con cédula de ciudadanía N° 2300322142 declaro 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 del área de ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo”** es de mi 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, 29 de agosto de 2022

Firma

Alvear Falcones, Jorge Sebastián

C.C: 2300322142



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de ingeniería en Biotecnología**

Autorización de Publicación

Yo, **Alvear Falcones Jorge Sebastián**, con cédulas de ciudadanía N° 23003232142, 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 del área de ganadería 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, 14 de agosto del 2022

Firma

Alvear Falcones, Jorge Sebastián

C.C: 2300322142

Dedicatoria***Alvear Falcones, Jorge Sebastián***

Este trabajo se lo dedico a mi familia por brindarme más que su apoyo moral, a mi madre la señora Falcones Moreira Rocío Maribel por su firme guía y centrarme siempre hacia lo mejor para mí, a mis amigos/compañeros de formación universitaria por brindarme su conocimiento constantemente y, por último, y muy importante, le dedico mi esfuerzo constante a la señora Alvear Calderón Martha Violeta, quien ha sido mi apoyo desde que tengo memoria y a quien le agradezco por siempre estar en todos los aspectos de mi vida.

Agradecimientos

Agradezco a Naranjo Sandra, por aceptar mi participación en un proyecto bajo su dirección y por el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica.

Agradezco a Armando Reyna, Natasha Baer y Pedro Puente por brindarme su conocimiento a lo largo de mi formación académica y por su apoyo y corrección en todo momento.

Agradezco a Mariela Valdiviezo, por su enseñanza y guía en la etapa práctica de mi formación, a Katty Medina y Vanessa Armijos por brindarme su ayuda en los laboratorios.

Agradezco a Mateo Botero, Jefferson Jumbo, Jorge Cueva, Brandon Cusme, Harrison Delgado, Hugo Andrade, Maldonado Johnny, Cando Kevin, Jordán Sarango por sus consejos, enseñanzas y ayuda desinteresada constante en mi camino académico y fuera de él.

Agradezco a Stalyn Cunalata, Carlos Estrella, Evelyn Cobos, por ofrecerme su amistad a lo largo de mi formación académica.

Finalmente agradezco a todas las personas que rodearon mi ambiente académico y me brindaron una mano para cumplir mi objetivo, gracias por brindarme una mano siempre que la necesitaba.

Lista de abreviaturas

g	Gramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
L	Litros
°C	Grados centígrados
KIA	Kligler Iron Agar
EMB	Eosina azul de metileno agar
PCR	Cadena de reacción polimerasa
OMS	Organización mundial de la salud
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
CL	Cefalosporina
CN	Gentamicina
SxT/Sulfa	Sufametox-Trimetropim
P	Penicilina G
O/F	Oxido fermentación

Índice de contenido

Carátula	1
Reporte de verificación del contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Lista de abreviaturas	8
Índice de figuras	11
Índice de tablas	13
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación e importancia	19
Hipótesis	20
Objetivos de la investigación	20
Capítulo II: Fundamentación teórica referencial	21

	10
Marco teórico	21
Capítulo III: Materiales y métodos utilizados	31
Metodología	31
Capítulo IV: Resultados y discusión del experimento	52
Capítulo V: Conclusiones.....	89
Conclusiones	89
Capítulo VI: Recomendaciones	90
Recomendaciones en base a las conclusiones	90
Bibliografía	91

Índice de figuras

Figura 1. <i>Ordenación jerárquica por taxonomía</i>	23
Figura 2. <i>Estilos de estriado</i>	28
Figura 3. <i>Ubicación geográfica del muestreo</i>	31
Figura 4. <i>Distribución de los discos de antibiótico en la caja</i>	43
Figura 5. <i>Procedimiento para generar el gel listo para la carga</i>	50
Figura 6. <i>Medidas del marcador de peso según las concentraciones del gel</i>	51
Figura 7. <i>Resultados del crecimiento en agar nutriente</i>	52
Figura 8. <i>Crecimiento en Petri film de las concentraciones 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4}</i>	54
Figura 9. <i>Conteo de colonias por programa</i>	55
Figura 10. <i>Crecimiento en medios diferenciales: EMB</i>	56
Figura 11. <i>Resultados MacConkey</i>	58
Figura 12. <i>Tinción Gram de las bacterias de interés</i>	61
Figura 13. <i>Prueba de catalasa de los aislados de interés</i>	63
Figura 14. <i>Resultados de la prueba de indol de las bacterias de interés</i>	64
Figura 15. <i>Resultados pruebas de O/F</i>	65
Figura 16. <i>Resultados de la prueba KIA para las bacterias de interés</i>	66
Figura 17. <i>Banco nuevo de las bacterias aisladas en EMB</i>	67
Figura 18. <i>Producto PCR</i>	68

Figura 19. <i>Árbol filogenético</i>	71
Figura 20. <i>Tinción Gram de las bacterias de interés</i>	73
Figura 21. <i>Prueba de catalasa de los aislados de interés</i>	74
Figura 22. <i>Resultados de la prueba de indol de las bacterias de interés</i>	74
Figura 23. <i>Resultados pruebas de O/F</i>	75
Figura 24. <i>Resultados de la prueba KIA para las bacterias de interés</i>	76
Figura 25. <i>Resultados de medios diferenciales EMB y MacConkey</i>	77
Figura 26. <i>Gráfico de barras comparativas de los resultados obtenidos</i>	79
Figura 27. <i>Resultados antibiograma de las bacterias 4 y 5</i>	80
Figura 28. <i>Gráfico de puntos medios en comparación con la inhibición obtenida con Enterobacter CZGRY7</i>	82
Figura 29. <i>Gráfico de puntos medios en comparación con la inhibición obtenida con Enterobacteriaceae strain 172</i>	84
Figura 30. <i>Barras de inhibición de antibióticos</i>	86
Figura 31. <i>Inhibición de bacterias según tratamientos empleados</i>	88

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Mecanismo de resistencia de acuerdo al tipo de antibiótico</i>	17
Tabla 2. <i>Materiales utilizados para la toma de muestras</i>	32
Tabla 3. <i>Concentración de diluciones para Petri film</i>	33
Tabla 4. <i>Interpretación de los resultados obtenidos en el agar EMB</i>	34
Tabla 5. <i>Interpretación de resultados del medio agar MacConkey</i>	35
Tabla 6. <i>Interpretación de los resultados para el medio de cultivo agar kligler hierro</i>	36
Tabla 7. <i>Equipos y materiales utilizados para realizar las pruebas bioquímicas</i>	37
Tabla 8. <i>Interpretación de resultados para la prueba de indol</i>	38
Tabla 9. <i>Interpretación de resultados para la prueba de óxido-fermentación</i>	39
Tabla 10. <i>Preparación del medio de cultivo para la prueba de óxido fermentación</i>	40
Tabla 11. <i>Materiales y reactivos utilizados para el análisis de sensibilidad</i>	42
Tabla 12. <i>Planteamiento del diseño</i>	44
Tabla 13. <i>Nomenclatura de los microorganismo y antibióticos para el análisis estadístico</i>	44
Tabla 14. <i>Antibióticos y su descripción</i>	45
Tabla 15. <i>Reactivos y procedimiento seguido para la obtención de ADN bacteriano</i>	46
Tabla 16. <i>Condiciones del termociclador para realizar PCR en bacterias</i>	48

Tabla 17. <i>Concentración del gel en dependencia de las pares de bases</i>	49
Tabla 18. <i>Resultados de crecimiento en EMB</i>	57
Tabla 19. <i>Resumen de resultados de pruebas bioquímicas</i>	59
Tabla 20. <i>Resultados de tinciones Gram</i>	62
Tabla 21. <i>Producto de la electroforesis</i>	69
Tabla 22. <i>Información de las secuencias enviadas por Macrogene ®</i>	70
Tabla 23. <i>Resumen de resultados de pruebas bioquímicas</i>	72
Tabla 24. <i>Interpretación de resultados de la prueba de antibiograma</i>	78
Tabla 25. <i>Análisis de varianza de las Enterobacterias identificadas</i>	81
Tabla 26. <i>Prueba de Tukey HSD para factor: Antibiótico</i>	85
Tabla 27. <i>Prueba de Tukey HSD para el factor: Enterobacterias</i>	86
Tabla 28. <i>Prueba de Tukey para el factor de la interacción: Enterobacterias + Antibióticos</i>	87
Tabla 29. <i>Cuadro de error medio entre repeticiones</i>	88

Resumen

Las enterobacterias son una familia omnipresente en el ambiente, dentro de las cuales se puede encontrar géneros que forman parte de la flora natural de algunos organismos que pueden incluir patógenos entéricos que infectan el tracto gastrointestinal. Este tipo de bacterias se pueden encontrar en aguares residuales provenientes de desechos fecales y uso cotidiano como son los lavados del ganado vacuno, que debido a su capacidad de adaptabilidad al ambiente han desarrollado resistencia a diferentes fármacos, esta propiedad les convierte en un objetivo importante de investigación para evaluar la resistencia frente a antibióticos de uso común. En este trabajo se tuvo como objetivo el aislamiento microbiológico, la caracterización bioquímica y molecular por PCR y comparación filogenética de muestras provenientes de aguas residuales de la zona ganadera de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE – Sede Santo Domingo y la evaluación de la resistencia a antibióticos de uso generalizado mediante la técnica de antibiograma con discos de antibióticos. Como resultados se obtuvo que uno de los aislados presentó inhibición significativa ante antibióticos como Cefalosporina, mientras que el aislamiento *Enterobacteriaceae Bacterium strain172* no presentó efecto significativo. Se concluyó que el antibiótico con mejor acción sobre las dos especies encontradas fue Gentamicina, con una generación de halos de 25,17 y 35 mm en los dos aislados de enterobacterias, se confirma además que el punto de toma de muestras es un lugar en el que se genera contaminación ocasionada por coliformes y que debe ser evaluada a fin de tomar correctivos en las descargas.

Palabras clave: Enterobacterias, aguas residuales de ganadería, inhibición, antibióticos.

Abstract

The enterobacterium are a ubiquitous family in the environment, within which you can find types that are part of the natural plants in some organisms that may include enteric pathogens which could infect the gastrointestinal tract. This type of bacteria can be found in wastewater from fecal waste and daily use such as cattle washings, which due to their ability to adapt to the environment have developed resistance to different drugs, this property makes them an important research target to evaluate resistance to commonly used antibiotics. The objective of this work was the microbiological isolation, biochemical and molecular characterization by PCR and phylogenetic comparison of samples from wastewater from the livestock area of the Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE - Sede Santo Domingo and the evaluation of resistance to commonly used antibiotics using the antibiogram technique with antibiotic discs. The results showed that one of the isolates presented significant inhibition to antibiotics such as Cephalosporin, while the isolate Enterobacterium strain 172 did not present significant effect. It was concluded that the antibiotic with the best action on the two-species found was Gentamicin, with a generation of halos of 25, 17 and 35 mm in the two isolates of enterobacterium. It was also confirmed that the sampling point is a place where contamination caused by coliforms is generated and that it should be evaluated in order to take corrective measures in the discharges.

Keywords: Enterobacteriaceae, livestock wastewater, inhibition, antibiotics.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Los fármacos son una herramienta de alta eficiencia en contra de agentes microbianos que generan enfermedades tanto a humanos como a animales. Estos han formado parte de la crianza de animales domesticados para la comercialización durante décadas lo cual ha normalizado su aplicación ante cualquier patología animal provocada en especial por bacterias. Ahora, tomando en consideración la capacidad adaptativa de los organismos vivos y en especial de las bacterias, se conoce que se han desarrollado mecanismos de resistencia a estas terapias de fármacos, lo que constituye una creciente preocupación por la resistencia adquirida que genera el uso indiscriminado de los fármacos en animales de crianza como ganado, porcinos, ovinos, etc. (Espinosa Castaño et al., 2019)

Esta farmacorresistencia inicia desde la época de Fleming, ha generado la necesidad de fabricar antibacterianos que se adapten y contrarresten los cambios evolutivos naturales de las bacterias, lo que es una tarea cada vez más compleja. Se conoce, además, que la resistencia a antibióticos se puede transmitir de una generación bacteriana a otra a través de genes lo que hace el panorama aún más grave para el tratamiento de enfermedades, a esto se suma la ubicación geográfica en la que se genera la resistencia y en su transmisión lo que influyen en las movilizaciones tanto de alimentos, personas o animales (OMS, 2016). Esta resistencia se da por la variabilidad de los mecanismos de adaptación con el que cuentan las bacterias como se detalla en la siguiente tabla 1.

Tabla 1.
Mecanismo de resistencia de acuerdo al tipo de antibiótico

Tipo de antibiótico	Modos de resistencia
β-lactámicos	Hidrólisis, eflujo, modificación de receptores
Aminoglucósidos	Fosforilación, acetilación, nucleotidilación, eflujo, modificación de receptores
Glucopéptidos	Reprogramación de la biosíntesis del peptidoglucano
Tetraciclinas	Mono oxigenación, eflujo, modificación de receptores
Macrólidos	Hidrólisis, glicosilación, fosforilación, eflujo, modificación de receptores
Lincosamidas	Nucleotidilación, eflujo, modificación de receptores
Streptograminas	Liasa C-O, Acetilación, eflujo, modificación de receptores
Oxazolidinonas	Eflujo, modificación de receptores
Fenicoles	Acetilación, eflujo, modificación de receptores
Quinolonas	Acetilación, eflujo, modificación de receptores
Pirimidinas	Eflujo, modificación de receptores
Sulfonamidas	Eflujo, modificación de receptores
Rifamicinas	Ribosilación de la ADP, eflujo, modificación de receptores
Lipopéptidos	Modificación de receptores

Peptidos catiónicosModificación de receptores, eflujo

Nota. Recuperado y adaptado del trabajo de Gonzáles Mendoza et al., 2019

En parte la resistencia de las bacterias a los fármacos se debe al uso sin control y mala dosificación del fármaco durante el crecimiento del ganado, con la finalidad de obtener el ganado en buen estado para cumplir su función productora como lo dice la OMS al menos el 80% de los medicamentos de relevancia médica son destinados al área animal, priorizando el crecimiento de los animales (OMS, 2016).

Justificación e importancia

La identificación de las bacterias que habitualmente se encuentran presentes en el ganado vacuno de la ESPE-Sede Santo Domingo es importante cuando se requiere conocer la forma correcta de aplicar antibióticos frente a las enfermedades del ganado bovino. Además de determinar la susceptibilidad que éstas presentan a los diferentes antibióticos y con este conocimiento aplicar de una manera más eficiente y dirigida el tratamiento correspondiente. Se requiere un análisis tanto microbiológico como molecular para la identificación específica de los microorganismos, para conocer a qué tipo género de bacteria encontramos en los desechos líquidos de la ganadería.

Hipótesis

- Hipótesis nula (H_{01}): No existen enterobacterias en los desechos de aguas residuales provenientes de la ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.
- Hipótesis nula (H_{02}): Ningún aislado enterobactérico presentó resistencia frente a los antibióticos estudiados.
- Hipótesis alternativa (H_{a1}): Existen enterobacterias en los desechos de aguas residuales provenientes de la ganadería de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.
- Hipótesis alternativa (H_{a2}): Al menos un aislado enterobactérico presentó resistencia frente a los antibióticos estudiados.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- Aislar, caracterizar e identificar enterobacterias provenientes de la zona de desechos líquidos residuales de ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar enterobacterias mediante técnicas de cultivo microbiológico.
- Caracterizar de manera molecular los aislados obtenidos mediante técnicas como la secuenciación para determinar su filogenia.

- Analizar la resistencia antibiótica de los aislados bacterianos mediante técnicas de antibiograma a través de discos de sensibilidad.

Capítulo II: Fundamentación teórica referencial

Marco teórico

Efluente

Existen definiciones para cada tipo de agua: así un *afluente* es agua, agua residual u otro tipo de líquido que ingrese a un reservorio, planta de tratamiento o proceso de tratamiento.

Agua costera agua influenciada por condiciones continentales y se encuentra adyacente a la tierra firme.

Agua dulce aquella que no contiene una cantidad de sal significativa.

Agua marina es aquella que se distingue por su elevada salinidad y esta corresponde a derecho internacional fijado por el espacio territorial.

Agua residual industrial que se define como el desecho generado por los establecimientos industriales.

Agua residual municipal definida en tres clases 1. Desechos líquidos evacuados de residencias, locales públicos, educacionales y comerciales. 2. Desechos evacuados de locales industriales. 3. Cualquier tipo de agua que ingrese por las alcantarillas.

Agua residual tratada agua que cumple con los requisitos de calidad, al ser distribuida en un reservorio.

Agua subterránea es toda el agua del subsuelo, ubicada en la zona de saturación.

Aguas estuarinas tramos de ríos con influencias de mareas.

Aguas superficiales acumulación de masas de agua en la superficie terrestre

(Ministerio del Ambiente del Ecuador[MAE], 2015).

Los desechos generados tras lavados se clasifican dentro de aguas residuales industriales o efluentes con carácter contaminante de baja escala pues la cantidad de espécimen bovino del cual proviene la carga contaminante no superan las 1000 unidades (Elizondo-Salazar & Marín-Hernández, 2019).

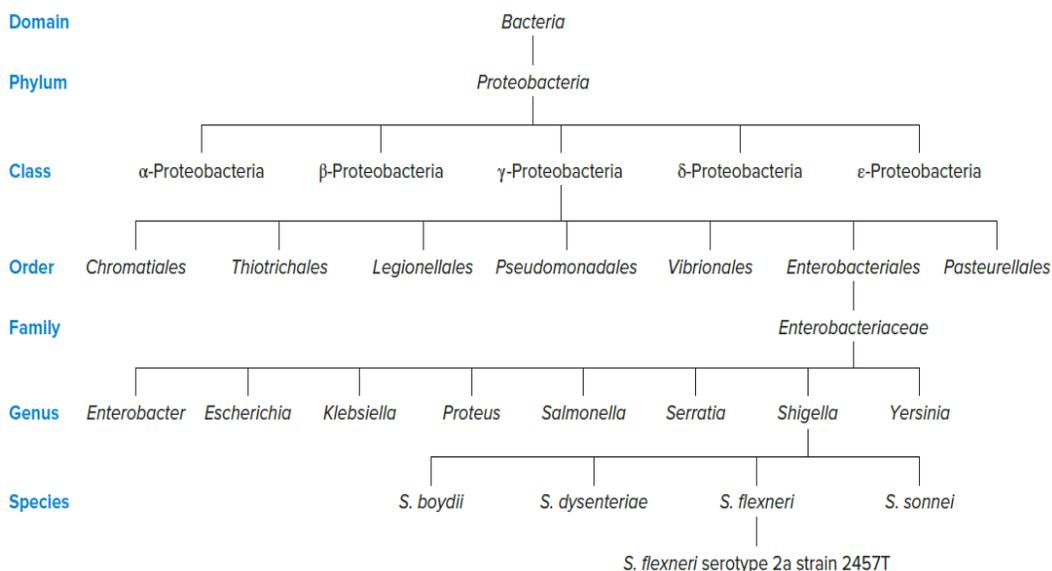
Uso del agua en producciones pecuarias

El ciclo natural que siguen las corrientes de agua es determinante para el análisis de un impacto ya que son un vehículo para trasladar contaminación vía desechos líquidos, contaminando cuerpos de agua como aguas superficiales que pueden generar estancamientos y una proliferación de microorganismos a gran escala. Está claro que el contaminante principal en la producción y crianza del ganado lechero es aquel líquido que se deshecha luego de los lavados tras la extracción diaria de leche, llamada también aguas grises, según (Elizondo-Salazar & Marín-Hernández, 2019) un promedio de uso de agua por kilo gramo de excremento del animal es de 12 litros/día, la cantidad en total genera por cada finca o establecimiento, varía según la cantidad de animales presentes y las máquinas de extracción. Esto genera una capacidad contaminante diaria generando efluentes con alta carga bacteriana en dependencia de las condiciones entéricas de cada animal.

Generalidades de las enterobacterias

Se conoce que las bacterias se han clasificado taxonómicamente basándose en las características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas, bioquímicas, genéticas, por biología molecular y fisiología (Willey et al., 2019, p. 250) pudiendo identificar y clasificar a las mismas como se observa en la figura 1 tomada del Prescott vol. 11.

Figura 1.
Ordenación jerárquica por taxonomía



Nota: Podemos encontrar a las Enterobacterias como una subfamilia del suborden Enterobateriales (entéricas) la clase γ -Proteobacterias. Tomado de (Willey et al., 2019, p. 250).

Las enterobacterias cumplen con un ciclo vital que incluye la reproducción y maduración dentro de un organismo vivo, a este grupo pertenecen dos tipos de organismos muy conocidos que son *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, las más estudiadas por sus efectos en organismos. Estas cuentan con una gran capacidad de adaptación al medio en donde se viabilice su

crecimiento; y se destacan cuando se habla de cuadros sépticos y shock séptico, esto gracias a su gran resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Iredell et al., 2016).

En ambientes agrícolas la basta cantidad de agua que se usa para la limpieza llega a un recolector común en donde pasan por un proceso de sedimentación rudimentario para luego ser dirigidos a una corriente de agua, esto genera un impulso para la creación de nuevos reservorios de bacterias resistentes, generando bacterias resistentes a través de la transferencia transversal de genes, de varias fuentes. *E. coli* es la bacteria más común encontrada en estos medios naturales agrícolas y, al igual, que *K. pneumoniae*, se conoce que presentan genes de resistencia y variados mecanismos en contra de los antibióticos de uso común y hasta antibióticos de tercera generación, debido a un plásmido mediado por la enzima ESBLs (Espectro extendido para betalactamasas) (Amos et al., 2014).

Morfología de las Enterobacteriaceae

Son bacterias en forma de bastón, bacilos Gram negativos, no forman esporas. Son bacterias grandes con rangos de 2 a 4 μ m con buen crecimiento en medio sólido (Enterobacterias, 2022).

Antimicrobianos

Aquellas sustancias capaces de combatir el avance de algún microorganismo sin atacar al hospedador de la enfermedad, estos acaban con el microorganismo de manera dirigida según la acción del antimicrobiano, la forma de enfrentarse al individuo o su alcance. Dando como resultado una clasificación de estos en grupos que son conocidos como los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, inhibidores de la fase citoplásmica, Inhibidores de la fase

de transporte de precursores, inhibidores de la organización estructural del peptidoglucano (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Farmacorresistencia

La farmacorresistencia en bacterias es debida a varios mecanismos de adaptabilidad que tienen las mismas bacterias y es la cualidad que más ha ocasionado preocupación a nivel global, por el impacto negativo que genera en la salud tanto de animales como humanos. Existen varios métodos que usan las bacterias para fomentar su resistencia, usan al menos 4 métodos de modificación del objetivo, que incluyen: exclusión o expulsión de la droga y modificación de la droga, esto al momento de ingresar en contacto con la bacteria y en dependencia del tipo, al menos las Gram negativas utilizan el sistema de eflujo para reducir la permeabilidad de la membrana externa y la hidrólisis periplásmica, produciendo fenotipos de fuerte resistencia contra los antibióticos (Iredell et al., 2016). Las características de resistencia de la bacterias se las confieren complejos que permiten realizar cambios tanto en la permeabilidad de la capa externa como transportadores de información, la mayor cantidad de información de resistencia que adquieren las bacterias provienen de la captura de genes de otras bacterias a través de al menos 3 tipos de elementos de movimiento génico que son la inserción genética, transposones y el sistema de integrones/casete de genes, estos mueven las codificaciones genéticas que otorgan resistencia entre las moléculas de ADN dentro de las células (Partridge, 2015). Esto da paso a la generación de bacterias resistentes hablando de una resistencia que no distingue entre especies convivientes. Los tipos de genes e información genética (DNA) que se pueden transmitir de bacteria a bacteria sin distinción de especie se les conoce como islas patogénicas clasificados dentro de las denominadas islas genómicas que

son una piscina de genes flexibles que les confieren a las bacterias rasgos favorables ante varias condiciones ambientales. Estos genes son adquiridos por las bacterias gracias a varios métodos, uno de estos es la inserción de secuencias (IS), el más simple de estos métodos, conocidos por tener solo 1 o 2 fragmentos abiertos de lectura que codifican genes facilitadores de la transposición de estos genes además de contar con una alta estabilidad con extremos invertidos que se repiten (Hallstrom & McCormick, 2014). Otro de los métodos por el cual las bacterias pueden obtener resistencia a antibióticos es por la vía de los casetes de genes guiados por los integrones, estos funcionan en conjunto con el sistema SOS, el cual ayuda a la reparación del ADN dentro de las bacterias luego de la exposición a antibióticos o algún ambiente que le genere un estrés suficiente provocando daño incluso al hospedador, bajo condiciones *in vivo* el integron de clase 1 es activado por la inserción de ciprofloxacina que dispara el sistema SOS y este genera Int1 (integron 1) lo que genera una sobreexpresión de este. La activación de este integron 1 por la introducción de un tipo de antibiótico a través del sistema SOS genera una mejora constante a la exposición de la bacteria frente al antibiótico lo que explica parcialmente el crecimiento constante de la farmacoresistencia frente a terapias interrumpidas de fármacos (Baltazar et al., 2022).

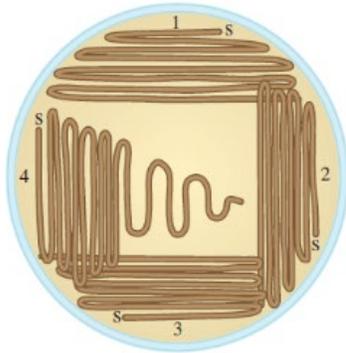
Microbiología

El inicio de esta investigación se basa en la identificación del espécimen a través del método microbiológico tradicional, cultivo del espécimen en medios nutritivos con la finalidad de obtener un cultivo puro de un solo organismo bajo métodos que permiten esparcir el microorganismo por toda la placa conocidos como el método de cuadrante, con su variable 1 y 2. (figura 2) y el método radiante, con sus cualidades únicas en cada tipo de estriado(Alfred E.

& Heidi R., 2017). Para una de las principales caracterizaciones una vez aisladas las bacterias se procede a identificar a nivel micro a través del uso de un microscopio y tinciones que diferencian a nuestra bacteria por coloración, una de las más conocidas es la tinción Gram que distingue a dos tipos de bacteria según sus capas exteriores y las clasifica según color y forma se puede distinguir a dos grupos Gram positivas, que no contienen lipopolisacáridos y proteínas que se tiñen con la tinción inicial, y Gram negativas que tiñen su pared celular una vez la primera tinción hace contacto. El procedimiento a seguir es una secuencia de añadir tinción tras tinción y va desde 30 segundos de cristal violeta, 1 minuto de Lugol, 20 segundos de alcohol al 95% o Alcohol violeta y por último se realiza un contraste al añadir safranina por 1 minuto, con enjuagues con agua intermedio de cada paso. Gram positivas son aquellas teñidas de azul y Gram negativas aquellas que se tiñen de rojo (Gram, 1884).

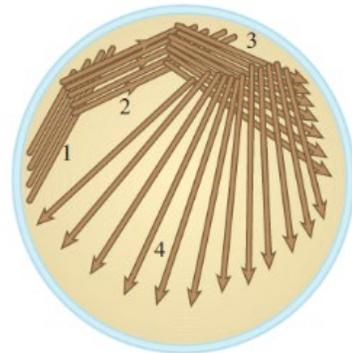
Existen medios de cultivo diferenciales que permiten clasificar a las bacterias según su crecimiento dentro de los cuales encontramos a dos que se usarán en esta investigación: Eosin-Methylene-Blue (EMB) y MacConkey Agar, los que se utilizan para identificar bacterias entéricas. El medio MacConkey permite identificar el crecimiento de bacterias del tipo Gram negativas ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas por contener sales biliares y cristal violeta. El agar (EMB) permite el cultivo de bacterias entéricas Gram negativas gracias a sus componentes y además, diferencia por coloración si la bacteria es fermentadora mostrando cepas coloridas y no coloridas si no son fermentadoras de azúcares (Lee, 2021).

Figura 2.
Estilos de estriado



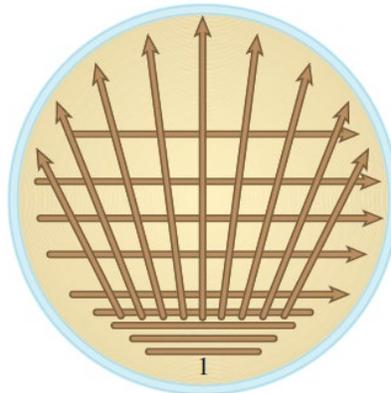
Nota: Estilo de estriado con 4 fases.

Al finalizar se realiza un zigzag curvo en la mitad de la placa.



Nota: Estilo de estriado de 4

fases, al finalizar utilizar lo encimado para realizar el cultivo restante sobrepuesto.



Nota: Se realiza un cultivo bacteriano desde un eje y luego desde este mismo se esparce hacia los extremos.

Nota: tomado de (Alfred E. & Heidi R., 2017)

También, se utilizaron varios tipos de pruebas bioquímicas para la identificación de enzimas preformadas lo que permite caracterizar según la reacción de la bacteria frente al reactivo principal de la prueba bioquímica. Las pruebas más comunes para la identificación de enterobacterias son catalasa, que se basa en disolver una cepa bacteriana en 1 gota de agua y agregar de 2~3 gotas de H_2O_2 para observar una efervescencia o burbujeo de la dilución, la prueba de indol, que determina si la bacteria genera la enzima triptofanasa y se realiza agregando de 2~3 gotas del reactivo de Kovács a 2 mL de medio previamente cultivado en agua de peptona durante 24 horas (Rodríguez Camacho, 2012) y la prueba de óxido/fermentación de las bacterias que permite identificar la capacidad de las bacterias para degradar carbohidratos produciendo ácido pirúvico, esto se refleja en el cambio de color del medio de un verde azulado a un amarillo (Zalduegui, 1975).

Para una identificación más específica de las bacterias se recomienda una evaluación de genes a través de un marcador general para bacterias que es la molécula de ARNr llamada 16S que permite evaluar si los resultados obtenidos corresponden a los obtenidos de forma molecular, para lo cual se procedió a realizar una PCR bajo condiciones estándar para la desnaturalización, templado y extensión de bacterias para luego realizar un gel bajo electroforesis y determinar si el tamaño de ADN corresponde según las indicaciones del marcador de peso molecular previamente colocado para obtener la secuencia cortada y amplificada. Para la evaluación de los datos es necesario un secuenciador de muestras para obtener la secuencia de nuestro ADN previamente extraído lo que permite evaluar el material genético identificado y así reconocer las bacterias tanto por microbiología como por biología

molecular (Sales Osatalé, 22). Lo que permite reconocer al menos el género de las bacterias a las que se les realizó el PCR creando un árbol filogenético, que funciona como una representación en esquema de las relaciones entre unidades biológicas que se conectan con una descendencia común, esta distancia se representa en porcentajes y ramificaciones juntas con las especies que comparten una similitud alta. Esto permite clasificar a las secuencias obtenidas, al menos, por su descendiente común, denotando su distancia evolutiva al contar, igual, con un agente externo (Mendoza, 2012).

Por esto es necesario el identificar los tipos de bacterias que se encuentran en los efluentes para realizar un buen tratamiento a las zonas de descarga con antibióticos, esto a través de biología molecular o identificación molecular y ensayos bioquímicos, dirigidos específicamente a la identificación de características bacterianas, que permiten reconocer el tipo de especie que prevalece en los efluentes producidos por el área de la ganadería, sobre todo al momento de conocer infecciones o estancamientos de estas mismas aguas.

Capítulo III: Materiales y métodos utilizados

Metodología

Obtención de la muestra

Se obtuvieron muestras líquidas de zonas de efluentes provenientes de la ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE-Sede Santo Domingo.

Figura 3.

Ubicación geográfica del muestreo



Nota: Zona de descargas de los desechos del área de ganadería y porcinos de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Ext Santo Domingo, Fotografía tomada por vía aérea y presentada en el trabajo de (Valdivieso Menéndez & Naranjo Gaybor, 2022).

Para la toma de muestra se tomó 1L de agua de descarga de la zona de ganadería proveniente de los lavados diarios luego de la extracción de leche, con una jarra milimetrada. La toma de muestra se realizó en frascos de plástico de 1L, a continuación, se vació conos

Imhoff para sedimentación por un lapso de 1h. Transcurrido este periodo se tomó una alícuota del sobrenadante para proceder con el análisis.

Tabla 2.

Materiales utilizados para la toma de muestras

Materiales	Muestra
Jarra milimetrada	
Recipiente de plástico de 1 L	Efluente turbio
Cono Imhoff para sedimentación	

Nota: Materiales necesarios para una toma óptima de la muestra

Aislamiento bacteriano y recuento

Para el aislamiento bacteriano de los microorganismos presentes en un cultivo mixto se siembran en agua peptona, sobre agar nutritivo. Se siembran dos placas de agar nutritivo, una mediante la técnica del agotamiento de asa y otra mediante la de estrías escocesas y en cuadrante.

Petri film

Este tipo de medio de cultivo permite la identificación de las cepas a través de ciertas características de producción como una coloración que se activa en la presencia de enterobacterias tiñendo de rojo las bacterias y la capa dentro del gas que producen las mismas bacterias (3M Microbiology, 2008).

Se clasifican a estas bacterias como enterobacterias al presentar al menos una de estas 3 características:

1. Asociación de colonias con gas y sin zonas ácida.
2. Colonias con zonas amarillas de ácidos y sin producción de gas.
3. Colonias productoras de gas y ácido (Alonso & Poveda, 2008).

Técnicas de aislamiento y recuento: el banco de diluciones. Se realizan una serie de diluciones seriadas a partir del cultivo mixto. Con esta técnica se consigue además de aislar colonias, obtener un recuento del número de bacterias que tenemos en el cultivo. Para el conteo bacterial se inoculó en placa Petrifilm™ 3M.

Tabla 3.
Concentración de diluciones para Petri film

Cultivo madre	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Agua peptona 90 mL peptona+10 mL de muestra	9 mL de peptona + 1mL de cultivo madre	9 mL de peptona + 1 mL de la dilución 10 ⁻²	9 mL de petona + 1 mL de la dilución 10 ⁻³	9 mL de peptona + 1 mL de la dilución 10 ⁻⁴

Nota: Solo la última solución se mantiene con 10 mL de volumen final.

Caracterización bacteriana

Para caracterizar las bacterias se usan medios de cultivo nutritivo que son básicos y permiten la identificación bioquímica. Para identificar bacterias directamente se usan medios de cultivo sólidos o también llamados medios selectivos que permiten, como su nombre lo indica, segregación de crecimiento bacteriano.

Para todos los tipos de cultivos se utilizaron asas de cultivo bacteriológico, medios basales como agar nutriente, agua de peptona, etc., para la preservación de las bacterias aisladas previamente de un banco (Rustrián et al., 2013).

Agar EMB

Además de ser un medio diferencial por contener colorantes que fomentan la formación de un precipitado en pH ácido, sirviendo como indicadores de bacterias fermentadoras tanto de sacarosa como lactosa, producen colonias púrpuras y en el caso de ser super fermentadores de lactosa se pintan de color verde metálico. Este medio es selectivo pues inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas y bacilos Gram negativos exigentes (Gil, 2019).

Tabla 4.
Interpretación de los resultados obtenidos en el agar EMB

Coloración	Crecimiento
Morado	Satisfactorio/parcial
Transparente	Satisfactorio/parcial

Verde	Satisfactorio
metálico	

Nota: La coloración y presencia en el medio es clave para la determinación de la especie

Agar MacConkey

Medio selectivo en donde la mezcla de sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, en su mayoría; la coloración de las cepas se produce por un viraje del indicador que cambia a un rojo neutro en un medio ácido (BritaniaLab, 2021b).

Tabla 5.
Interpretación de resultados del medio agar MacConkey

	Coloración de las colonias	Observaciones
M.O. Fermentador de lactosa	Colonias rosadas rojizas	Presencia de
M.O. no Fermentador de lactosa	Colonias del color del medio	precipitación biliar

Nota: M.O.: Microorganismo; Recuperado y adaptado de (BritaniaLab, 2021b).

Agar Kligler Hierro

Medio facultativo para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos en base a su capacidad fermentadora de dextrosa, lactosa y producir sulfuro. La interpretación de los resultados se da en base a la coloración obtenida luego de la incubación en un medio solidificado lateralmente luego de las 18h. Se debe tomar en cuenta que al momento de la toma

de datos las características que sobresalen son el color del pico como del fondo, ruptura del medio y ennegrecimiento (Becton Dickinson and Company, 2014).

Tabla 6.

Interpretación de los resultados para el medio de cultivo agar kligler hierro

	Fermentación	Presencia de gas	Ennegrecimiento
Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo fondo amarillo)	Solamente fermenta glucosa		
Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo fondo amarillo)	Fermentación tanto de glucosa como lactosa	El organismo es capaz de crear gas/ruptura del medio	Productor de ácido sulfhídrico
Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo fondo rojo)	No fermenta azúcares		

Nota: El medio no necesariamente debe ser completamente negro para considerar al organismo productor de ácido sulfhídrico; recuperado de (BritaniaLab, 2021a)

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta algunas horas (Bou et al., 2011). Todo este tipo de pruebas utilizan materiales específicos para realizar cultivos asépticos, mejor detallados en la siguiente tabla 7.

Tabla 7.
Equipos y materiales utilizados para realizar las pruebas bioquímicas

Equipos	Material de laboratorio
Microscopio	Peras de aire, pipetas milimétricas, pipetas automáticas
Autoclave y plancha de calentamiento/agitación	Mecheros de alcohol, asas de cultivo, tubos tapa rosca, placas Petri
Cámara de flujo laminar e Incubadora	Reactivos específicos para cada ensayo.

Nota: Cada ensayo contiene su propio reactante principal, ya sea para realizar un medio sólido de cultivo o para calentar agua destilada.

Catalasa

El fundamento de su prueba es la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la actividad de la enzima degradadora catalasa. Esta prueba permite discriminar entre bacterias aerobias y anaerobias por la capacidad facultativa que contienen. Para la realización de la prueba se utilizó el reactivo de peróxido de hidrógeno comercial a una concentración del 3%. Se procede a colocar una gota de agua destilada sobre un porta objeto y se hace una solución de la muestra tomando una asada del cultivo sólido de la bacteria, posteriormente se agrega al menos 3 gotas de peróxido de hidrógeno y se observa la generación de burbujas,

clasificadas por tiempo como reacción tardía, reacción inmediata y sin reacción (Marielsa, 2019).

Indol

El indol es uno de los productos de degradación de aminoácido triptófano. La presencia de la enzima triptofanasa en la bacteria provoca la hidrólisis del aminoácido y su desaminación produciendo Indol, ácido pirúvico y amoniaco (Rodríguez Camacho, 2012).

Inocular el caldo con el microorganismo e incubar a 37 °C durante 24 a 48 horas.

Transcurrido ese tiempo añadir de 4 a 5 gotas de reactivo de Kovacs, resbalando por la pared del tubo sin agitar. Lo que genera 2 fases, una con un anillo de color café carmesí y el medio enrojecido lo que indica prueba positiva a indol.

Tabla 8.
Interpretación de resultados para la prueba de indol.

Color	Resultado
Formación de anillo rojo carmesí/café en la superficie del medio	+
No existe cambio en la coloración del medio	-

Nota. Recuperado y adaptado del trabajo de (UNPSJB, 2017)

Óxido fermentación

La óxido-fermentación es una técnica utilizada para la caracterización del metabolismo oxidativo o fermentativo de un carbohidrato, ya sea por condiciones aeróbicas, en el caso de

algunas bacterias y en el caso de otras de forma aerobia como anaerobia. En los organismos aerobios el ácido pirúvico es oxidado por la ruta del ciclo de Krebs en donde el aceptor final es el oxígeno, para el caso de la fermentación se produce una acidez más elevada y es un compuesto orgánico el que hace de aceptor final. Para la realización de esta prueba se requieren 2 tubos con 6 mL de agar, preparados en base a la tabla 9, por bacteria en cada tubo, los cuales van a ser inoculados por punción, al momento de inocular se deja uno de los tubos, del par por bacteria, abierto y el otro cubierto con Parafilm.

Tabla 9.
Interpretación de resultados para la prueba de óxido-fermentación

Si es:	Tubo abierto	Tubo cubierto
Oxidación	Amarillo	Verde
Fermentación (anaerogénica)	Amarillo	Amarillo
Fermentación (aerogénica)	Amarillo	Amarillo
Ni fermentación, ni oxidación	Azul o verde	Verde

Nota: Si existe formación de gases, al menos en la fermentación aerógena; *Amarillo: ácido; Azul: alcalino ;Verde: sin cambio;* Recuperado y adaptado del trabajo de (UNPSJB, 2017).

Tabla 10.*Preparación del medio de cultivo para la prueba de óxido fermentación*

Peptona	2g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato de potasio	0,3g
Agar	2-3g
Indicador de azul de bromotimol	0,03-0,08g
Agua destilada	1000 mL
pH	6,8

Nota: Puede existir ruptura del medio por generación de gas.

Tinción Gram

El procedimiento de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología, permite dividir a las bacterias en 2 grandes grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según sea su comportamiento frente a la tinción. La diferencia de coloración que adquieren los 2 grupos bacterianos se debe a la distinta composición química de la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de mureína o peptidoglicano (de 20 a 80nm de espesor) en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano (2nm) más fina y una capa externa de lipopolisacárido, lipoproteínas y lípidos (Gram, 1884).

1. Con un asa de siembra tome una colonia y extiéndala en un porta objeto y se lo disuelve en una gota de agua con el fin de generar un frotis bacteriano, fije la preparación, la fijación se realiza acercando de manera intermitente el porta objeto encima del mechero, evaporando el agua excedente.
2. Tiña con cristal violeta por 30 segundos.
3. Retirar el exceso de colorante
4. Añadir Lugol, por 1 minuto.
5. Decolorar con Etanol al 98% o acetona por 20 segundos
6. Enjuagar con agua
7. Se añade el colorante de contraste, safranina, por 1 minuto.
8. Enjuagar con agua
9. Observar bajo microscopio (x40, 100x). *Leer el apartado de prácticas de uso de microscopio.*

Antibiograma

La realización de un antibiograma se basa en el enfrentamiento del microorganismo con antibióticos de una concentración conocida usando discos de difusión; La finalidad de la técnica es evaluar la resistencia generada durante la etapa de crecimiento bacteriano y que se hace visible mediante un halo de inhibición. Para este ensayo se utilizó medio Mueller Hilton recomendado para hacer el enfrentamiento con el antibiótico (Tankeshwar, 2022).

Tabla 11.*Materiales y reactivos utilizados para el análisis de sensibilidad*

Reactivos	Materiales
Cloruro de sodio	Pipeta de 10 mL
Agua doblemente destilada	Micropipeta de 10uL
Medio Mueller Hilton	Hisopos estériles
Discos de sensibilidad	Tubo de ensayo tapa rosca
	Pinza estéril
	Asa bacteriológica

Nota: Todo se realizó dentro de una cámara de flujo laminar para mantener condiciones asépticas. Protocolo obtenido de (Bernal R. & Guzmán, 1984).

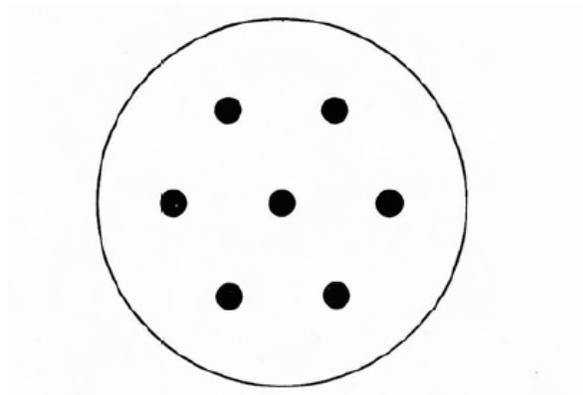
Se utilizó un protocolo en base a lo descrito por (Bernal R. & Guzmán, 1984).

Se prepararon cajas con medio Mueller Hilton con una dilución de 38g por cada litro de agua destilada. Se prepararon disoluciones con cloruro de sodio (85g) para 100mL, (es decir una solución de 85%) de agua salina. De esta solución se tomó una alícuota de 10mL para analizar. Todo material fue debidamente esterilizado a 121°C en una autoclave por 35 min. El

material no autoclavable se dejó en cámara con luz UV, por 15 min para evitar cualquier fuente de contaminación.

Se prepararon suspensiones bacterianas en la solución salina previamente preparada y esterilizada, se homogenizó por 3min usando un vórtex. A continuación, se tomó de la solución salina con un isopo estéril y se procedió a sembrar de forma masiva en el medio. Con una pinza se colocaron los discos de la marca OXOID, estos discos contienen concentraciones específicas de los antibióticos que corresponden a la concentración comercial. Los anitbióticos usados en esta investigación fueron Sulfametox-trimetoprim 25, cefalexin 30, gentamicina 10 y penicilina G. Ubicados según Bernal R.

Figura 4.
Distribución de los discos de antibiótico en la caja



Diseño experimental

El análisis de datos forma parte importante de un experimento en donde se está partiendo de la premisa de una inhibición y una toma de medidas con variables dependientes e independientes. Estos factores tienen impacto en el diseño de manera individual.

Tabla 12.
Planteamiento del diseño

	Antibiótico	Microorganismo	Tratamiento	Halo de inhibición
Nomenclatura	a	b	ab	Medición en mm

Nota: Los tratamientos son las interacciones entre el antibiótico y el tipo de microorganismo, según el caso se obtiene una medida en mm del halo que se inhibe.

Tabla 13.
Nomenclatura de los microorganismo y antibióticos para el análisis estadístico

	Antibiótico (a)	Penicilina (a0)	Gentamicina (a1)	Cefalosporina (a2)	Trimetoprima Sulfametoxazol (a3)
Microorganismo (b)	a#b#				
<i>Enterobacter sp.</i> (b0)		a0b0	a1b0	a2b0	a3b0
<i>Enterobacter sp.</i> (b1)		a0b1	a1b1	a2b1	a3b1

Nota: Las combinaciones conformadas son denominadas tratamientos, que varían según el tipo de antibiótico enfrentado a un microorganismo.

Tabla 14.
Antibióticos y su descripción

	Nombre abreviado	Descripción	Bibliografía
Penicilina	P (G, V)	β -lactámicos; uno de los antimicrobianos más utilizados gracias a su amplio espectro de acción. Inhibe la síntesis de la pared celular activando enzimas autolíticas.	
Gentamicina	CN 10	Aminoglucósido; Adición a la fracción 30s de las bacterias produciendo proteínas bacterianas defectuosas.	(Bernal R. & Guzmán, 1984) y (Pacheco et al., 2020)
Cefalosporina	CL 30	β -lactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular activando, tras esto, enzimas autolíticas.	
Trimetoprima Sulfametoxazol	SxT 25	Diaminopirimidina con actividad similar a las sulfonamidas.	

Nota: Se utilizaron las abreviaciones para identificar los antibióticos al realizar el análisis en el laboratorio.

Ensayos moleculares

En la parte molecular es necesario realizar la extracción de ADN a partir de un cultivo puro o único de una bacteria, para lo que se puede realizar varias técnicas de purificación del ADN.

Los pasos básicos para la extracción y tratamiento de la molécula de ADN son:

1. Disrupción celular.
2. Lisis celular con detergentes.
3. Remoción de las proteínas por digestión o tratamiento con proteasa, también se puede usar el fenol cloroformo. Se puede usar, para eliminar las proteínas, sales en alta concentración.
4. Precipitación del ADN por alcoholes y sales.
5. Rehidratación y almacenamiento

En esta investigación se siguieron los pasos detallados en la tabla 15:

Tabla 15.

Reactivos y procedimiento seguido para la obtención de ADN bacteriano

1. Microcentrifugar una previa suspensión de bacterias de 1,5 mL por 3 min a 12,000 rpm y resuspender el pellet en 600uL de Buffer TE, luego de secar el pellet.
2. Adicionar 15uL de SDS al 20%, mezclar con vortex de manera firme por 5 segundos, e incubar por 1h a 60°C, con una homogenización cada 10 min.

3. Adicionar fenol saturado en Tris-HCl y mezclar con vortex por 15 seg.
4. Centrifugar 3 min a 12,000 rpm. Posteriormente transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. Llevar el nivel del tubo a 1,5mL con la solución de Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Vortex por 15seg.
5. Centrifugar 3 min a 12,000 rpm. El sobrenadante resultante se transfiere a un tubo nuevo.
6. Precipitar el ADN con isopropanol frío y acetato de sodio 3M. La precipitación dura toda la noche a -20°C
7. Centrifugar durante 5 min a 12,000 rpm
8. Eliminar el isopropanol y lavar el pellet de DNA con 1mL de etanol al 70%
9. Volver a centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min y extraer todo el alcohol
10. Dejar secar a temperatura ambiente
11. Resuspender en buffer TE o bien en agua ultra estéril
12. Conservar a -20°C

Nota: Protocolo adaptado de (Howland, 1996)

Para la amplificación se utilizan al menos tres pasos básicos en donde se debe facilitar la desnaturalización de la molécula, permitir el alineamiento de los primers, referentes del

trabajo en Enterobacterias realizado por Fadare *et. al*, estos cebadores o primers, son universales para ADN bacteriano 16s. La secuencia reverse (rRNAR) 5' – ACGGATACCTTGTTACGACTT – 3' y la secuencia forward (rRNAF) 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3', y facilitar que la ADN polimerasas lleve a cabo su síntesis, utilizando el protocolo propuesto por (Fadare et al., 2020). Las condiciones del termociclador se las especifica en la siguiente tabla:

Tabla 16.
Condiciones del termociclador para realizar PCR en bacterias

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Desnaturalización secundaria	95 °C	30 segundos
Hibridación	55 °C	25 segundos
Extensión	72 °C	1,30 segundos
Extensión final	72 °C	7 minutos

Nota: Este proceso se realizó 35 veces (ciclos); Protocolo adaptado para la extracción de ADN bacteriano, subunidad 16s de procariontas.

Lo consiguiente es analizar el resultado a través de una electroforesis en un gel de poliacrilamida o agarosa, el cual contiene pocillos en donde se “carga” el ADN previamente

homogenizado con una sustancia, normalmente bromuro de etidio, que permite el avance del ADN bajo luz ultravioleta.

Gel de agarosa

Se preparó un gel diluyendo, por 30 segundos en un microondas, 1g de agarosa en 100mL de buffer TAE hasta obtener un medio transparente, evitando la ebullición del medio.

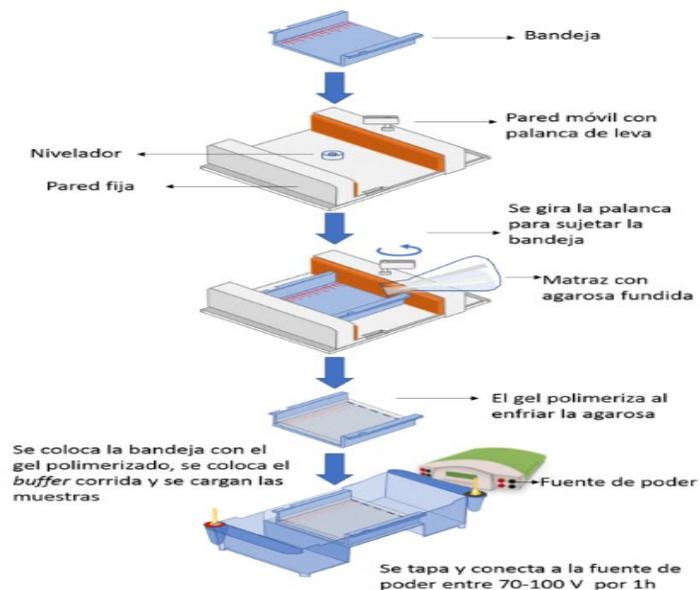
Posteriormente se colocada la bandeja receptora en el “gel caster” y esta debe estar nivelada, se dispensó el medio líquido en la bandeja y se ubicó un peine plástico para generar pocillos, se dejó solidificar. La agarosa es un compuesto poroso que permite la migración de las moléculas de ADN de un polo a otro, este se encuentra en concentración según la cantidad de las pares de bases a analizar Tabla 17. Este ADN es mezclado con una tinción que le otorga peso y color lo que le permite ser colocado en el medio y que se ubique en los pocillos anteriormente generados (Checa, 2020).

Tabla 17.
Concentración del gel en dependencia de las pares de bases

% recomendado	Pares de base (pb)
0.5	1,000-30,000
1.0	500-10,000
1.5	200-3,000
2.0	50-2,000

Nota: Adaptado y tomado de (Checa, 2020)

Figura 5.
Procedimiento para generar el gel listo para la carga



Nota: Tomado de (Checa, 2020)

Una vez colocado el buffer de corrida y las muestras están cargadas se tapa y se empatan las fuentes de poder y se establece un rango de 70-100 voltios por 40min u 1h.

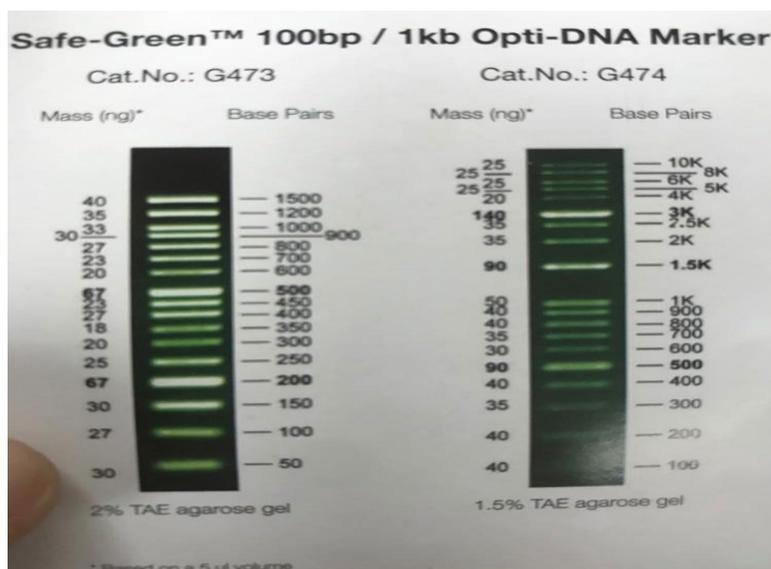
Secuencias

Las secuencias se toman desde un cultivo sólido en agar, el microorganismo que se encontraba aislado y puro de ese cultivo fue llevado a un cultivo líquido por al menos 24h a 37°C y en constante agitación. Para la obtención de un producto de análisis por electroforesis se es necesario extraer el ADN bacteriano de las muestras y procesarlo, esto se realizó según (Howland, 1996) y descrito en el apartado anterior. Los primers utilizados para realizar los

cortes en el ADN cuentan con sus parámetros de medida al avanzar según la concentración de agarosa en el medio ya sea 1,5% o 2% (Checa, 2020).

Figura 6.

Medidas del marcador de peso según las concentraciones del gel



Nota: Medidas del promedio del marcador de pb de los primers utilizados en la extracción;
Información del marcador molecular.

Árbol filogenético

Se utilizó esta herramienta como indicador de las distancias evolutivas de las secuencias obtenidas luego de empatar nuestros cebadores (forward y reverse) por bacteria. Para la realización del árbol de distancia filogénica se utilizó el programa MEGA X, para alinear las secuencias y analizar la pureza de las mismas se utilizó el programa Sequencher vrs. 5.4.6.

Capítulo IV: Resultados y discusión del experimento

Aislamiento bacteriano

Luego de realizado el cultivo bacteriano se obtuvieron 7 aislamientos con crecimiento diferenciados morfológicamente, variando por coloración, anaranjado (bacteria #7), algunas incoloras (bacterias #2 y #3), de color blanco lechoso (bacterias #1 y #4), blanco opaco (bacterias #5, #6). Lo único diferente entre cepas fue que cada una presentaba una viscosidad diferente.

Figura 7.
Resultados del crecimiento en agar nutriente

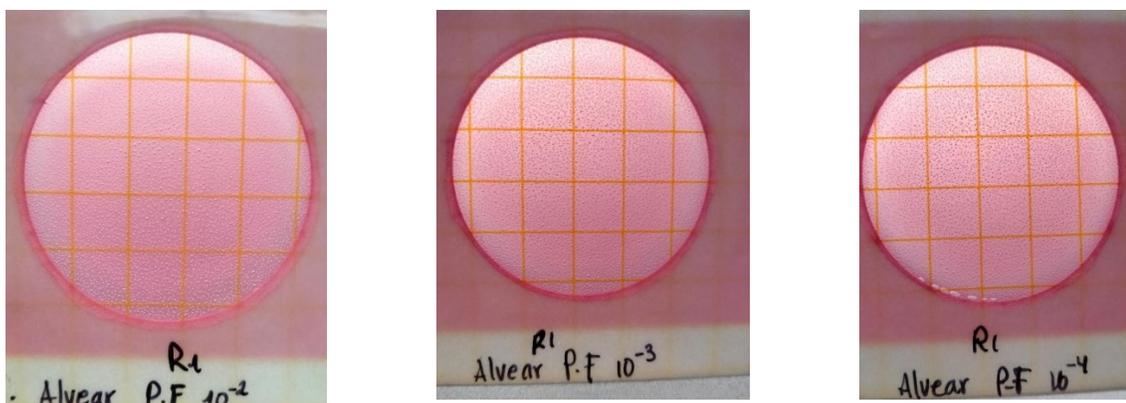


Petri film

De los aislados sembrados en *Petri film* se obtuvo un crecimiento masivo de bacterias, lo que dificultó el conteo de cepas debido a que no se cuenta con un puntero en el equipo contador de colonias, lo que derivó en el uso de un programa para el conteo manual de colonias. Las diluciones fueron de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , para lo que se usó el banco que se conservó congelado de las bacterias aisladas.

Figura 8.

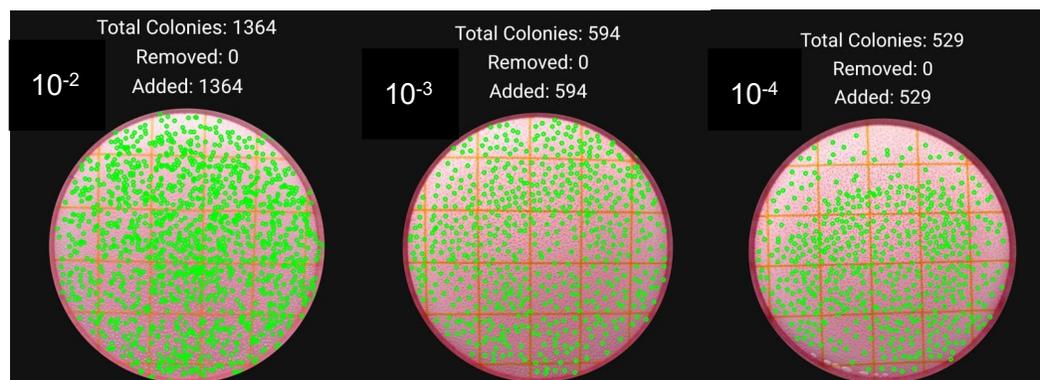
Crecimiento en Petri film de las concentraciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}



Nota: Se observa la formación de puntos transparentes del color del medio/generación de gas en las placas.

El conteo de las diluciones en concentraciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} fue realizado por el programa *ColonyApp*, lo que representó valores de 500~530 colonias en la dilución 10^{-4} .

Figura 9.
Conteo de colonias por programa

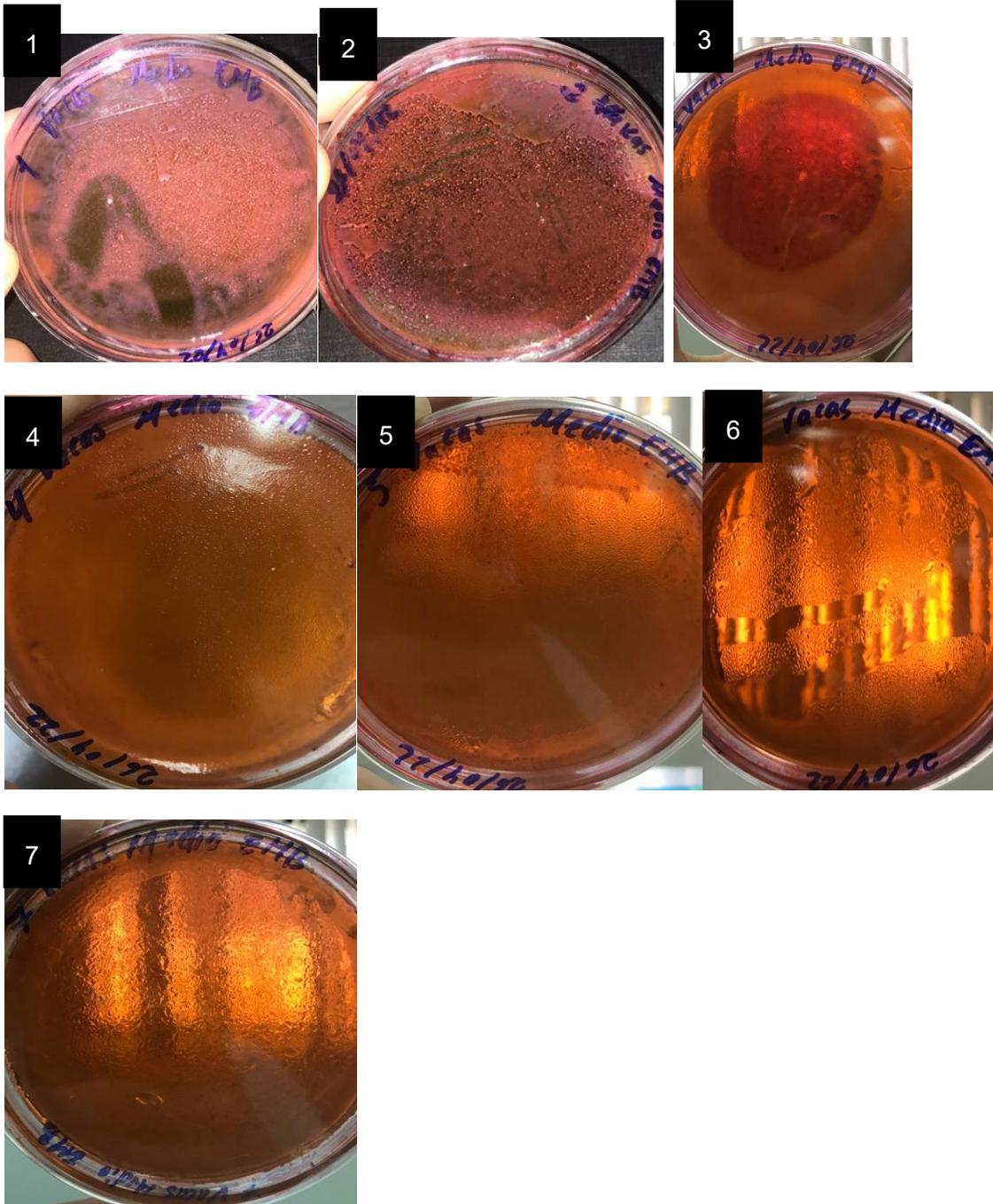


Nota: Aplicación APD Colony App Lite; el programa permite un conteo de colonias, no reemplaza al equipo contador con lápiz láser

Medios diferenciales

Se realizaron cultivo de las bacterias puras desde el medio en agar nutriente hacia los medios diferenciales EMB y Agar MacConkey con la finalidad de realizar una selección de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriácea y algunos bacilos Gram negativos anaerobios facultativos y aerobios.

Figura 10.
Crecimiento en medios diferenciales: EMB



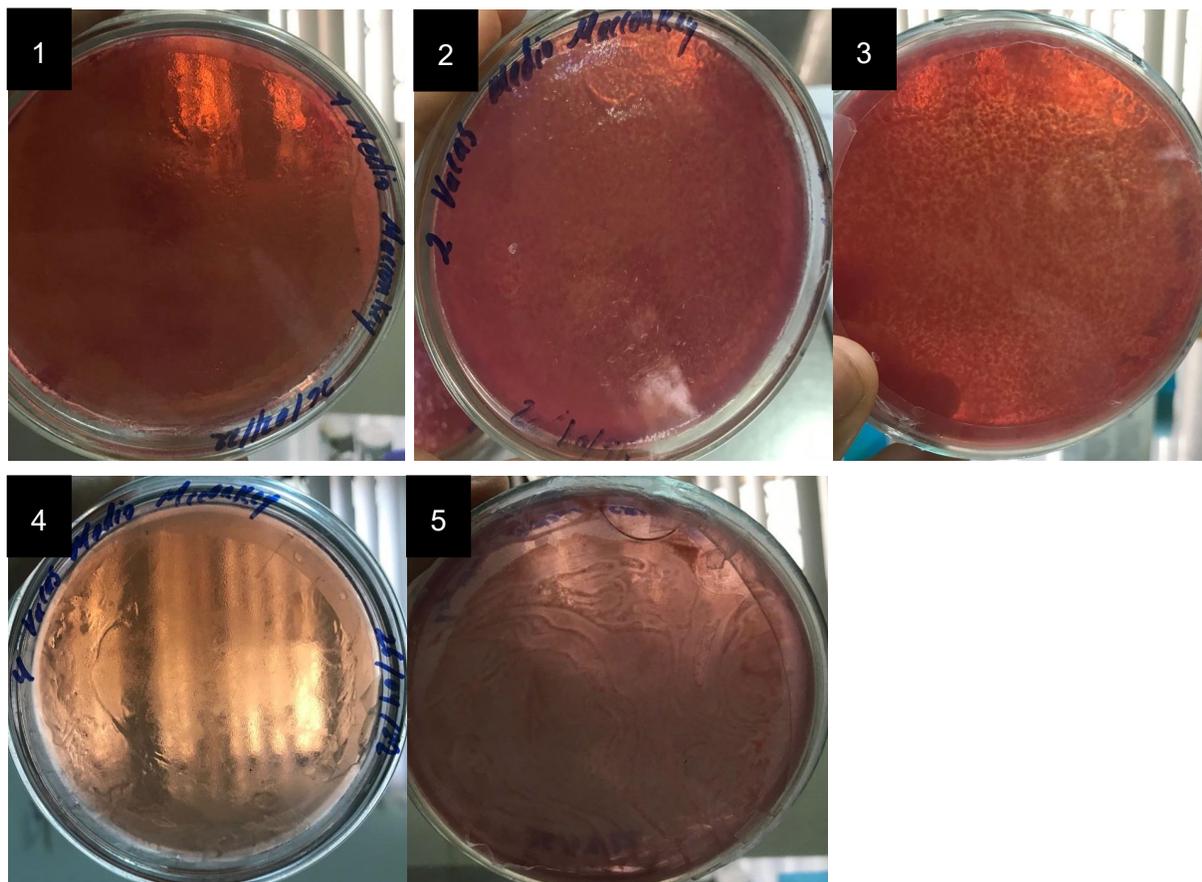
Nota: Crecimiento bacteriano en medio diferencial EMB.

Tabla 18.
Resultados de crecimiento en EMB

Numeración de la bacteria	Coloración
Bacteria #1	Crecimiento rosado oscuro
Bacteria #2	Crecimiento morado oscuro
Bacteria #3	Color morado/rojizo
Bacteria #4	Crecimiento transparente
Bacteria #5	Crecimiento punteado de cepas moradas
Bacteria #6	Crecimiento transparente
Bacteria #7	Crecimiento transparente

Nota: Cada cepa tuvo una viscosidad diferente, de ahí su diferenciación.

Figura 11.
Resultados MacConkey



Nota: Las bacterias van desde la 1 hasta la 5, leyendo de izquierda a derecha; se descartó las bacterias #6 y #7 por no crecer en el medio.

El crecimiento obtenido en agar nutriente es un medio básico que permite que las bacterias crezcan sin hacer sin ningún tipo de diferenciación morfológica entre ellas (Materiales et al., 2015). A diferencia de los medios selectivos, en los que se puede diferenciar entre bacterias que presentan características metabólicas específicas para cada familia (Cuevas, 2009), de esta forma, el medio de MacConkey permite el crecimiento de enterobacterias

degradadoras y no degradadoras de lactosa, lo que se discrimina por el color, como las obtenidas en este trabajo que son de coloración rosa e incoloras figura 11.

Pruebas bioquímicas I (antes de la secuenciación)

Tabla 19.
Resumen de resultados de pruebas bioquímicas

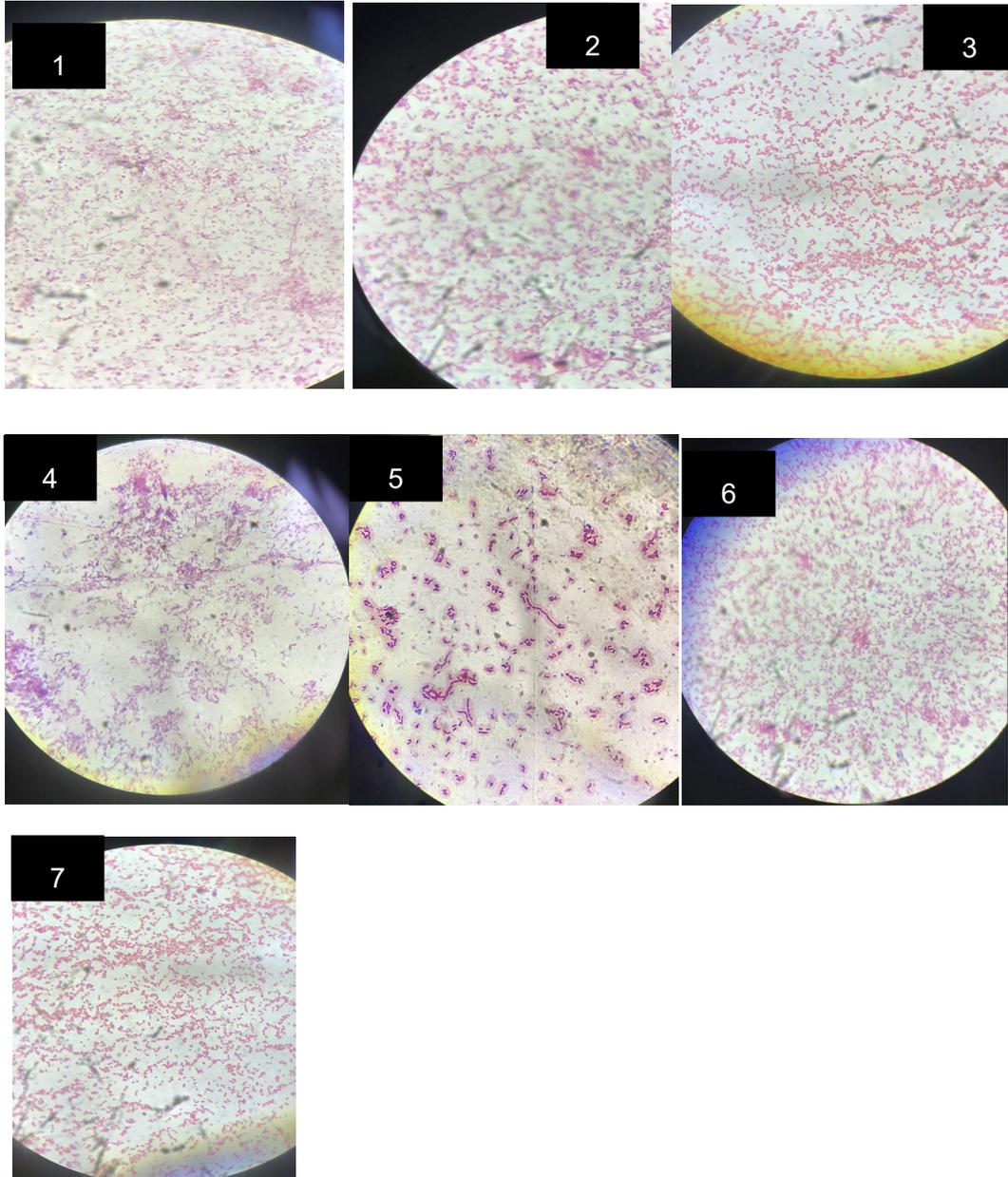
Bacteria	Catalasa	KIA	óxido Fermentación	Indol	Gram
Bacteria 1	Positivo	Pico rojo/fondo rojo; No fermenta azúcar; glucosa (-) Lactosa (-)	Oxidativa	Positivo	Negativo
Bacteria 2	Negativo	Pico rojo/fondo negro; Medio alcalino; Produce gas; Produce ácido sulfhídrico	Fermentativa	Positivo	Negativo
Bacteria 3	Positivo	Pico amarillo/fondo negro; Superficie ácida; Produce ácido sulfhídrico; Presencia de líquido	Fermentativa	Positivo	Negativo

Bacteria 4	Positivo	Pico Amarillo fondo rojo; sin producci ón de gas (-)	Fermentativa	Negativo	Negativo
Bacteria 5	Positivo	Pico amarillo/ Fondo rojo; Ferment a Lactosa (+)	Fermentativa	Negativo	Negativo
Bacteria 6	Positivo	Medio completa mente negro; el medio produce ácido sulfhídric o	Oxidativa	Positivo	Negativo
Bacteria 7	Positivo	Pico rojo/fond o rojo; Presenta líquido blanques ino en la superfici e; no fermenta azúcares	Fermentativa	Positivo	Negativo

Nota: Bacterias del 1 al 7, con sus respectivos resultados bioquímicos para catalasa, Gram, indol, KIA y O/F.

Tinción Gram

Figura 12.
Tinción Gram de las bacterias de interés



Nota: Bacilos Gram negativos; Vista a 100X.

Los resultados muestran tinción Gram negativa para todas las bacterias (Coico, 2005).

Tabla 20.
Resultados de tinciones Gram

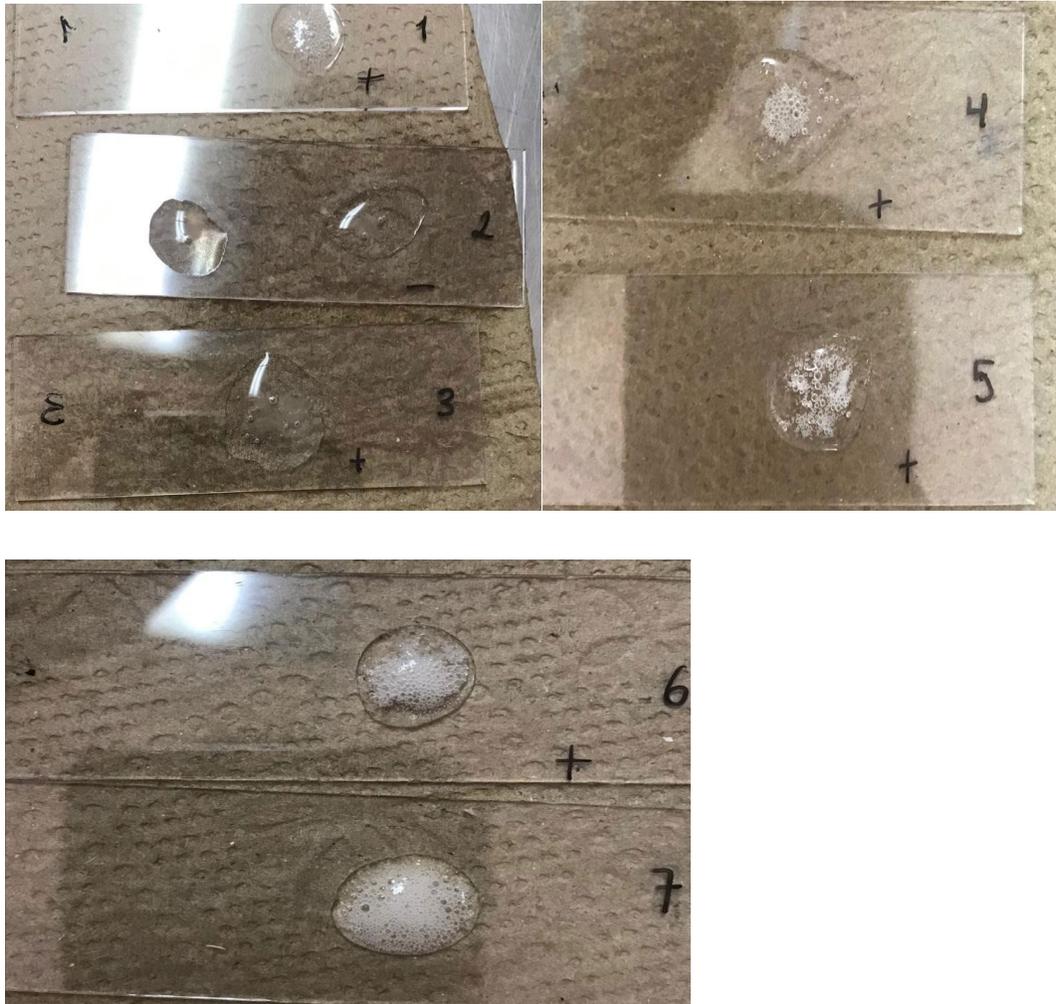
Bacteria	Tipo de tinción Gram	Forma
Bacteria 1	Negativa	Cocos, con presencia de bastones alargados
Bacteria 2	Negativa	Cocos, con presencia de bastones alargados
Bacteria 3	Negativa	Cocos
Bacteria 4	Positiva	Bacilos, presencia de bastones alargados
Bacteria 5	Negativa	Bacilos o bastones
Bacteria 6	Negativa	Bacilococos
Bacteria 7	Negativa	Cocos

Nota: Las muestras presentan bacterias Gram negativa; los bastones algunas placas esto puede ser indicador de contaminación (Coico, 2005).

Prueba de catalasa

Figura 13.

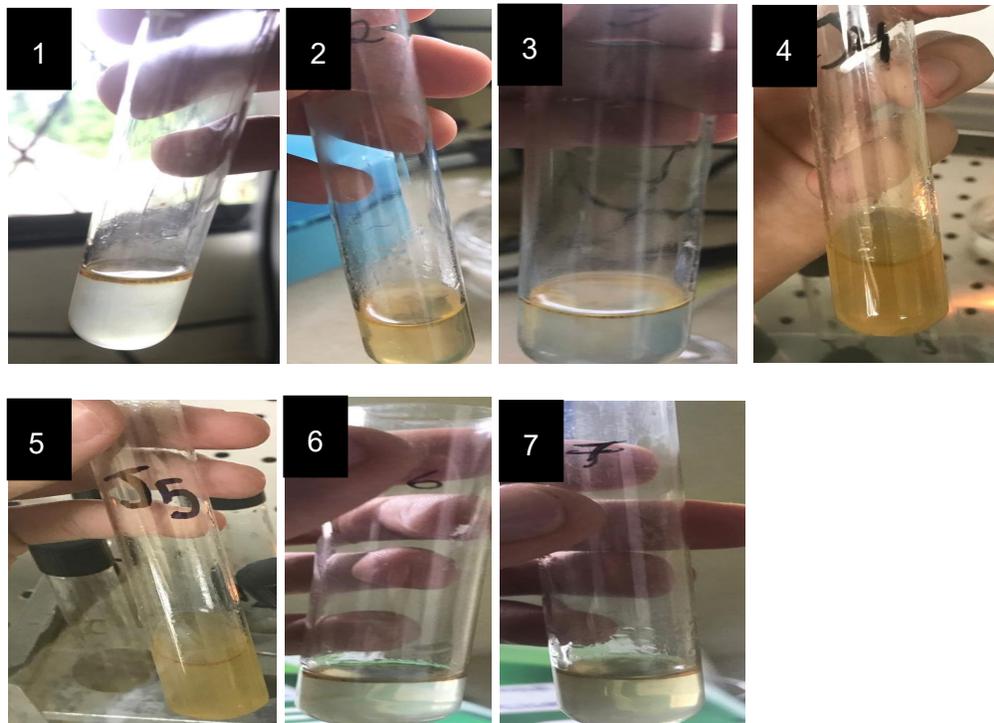
Prueba de catalasa de los aislados de interés



Prueba de indol

Figura 14.

Resultados de la prueba de indol de las bacterias de interés

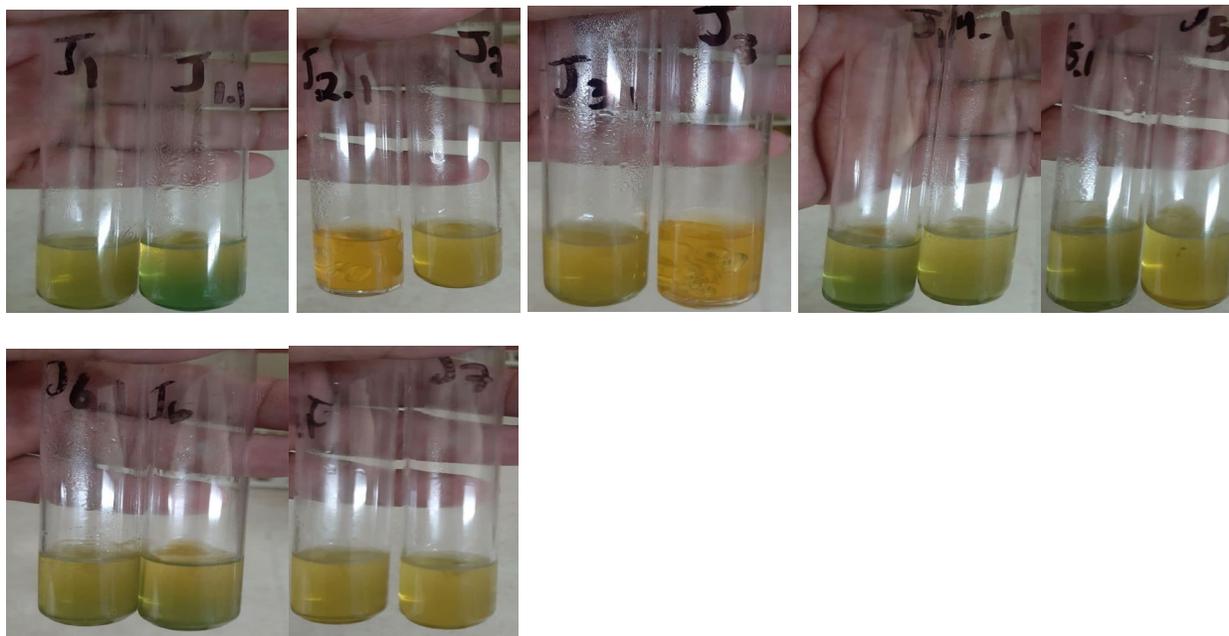


Nota: Se muestra formación de anillo para las bacterias 1, 6 y 7; No existió formación de anillo, para las bacterias 2, 3, 4 y 5, resultado negativo para esta prueba.

Para esta prueba se observó una respuesta negativa debido a que no se formó el anillo de color caramelo indica que la bacteria en solución no degrada el triptófano y por lo tanto no produce indol (Musso & Acosta, 2017).

Prueba de oxido fermentación

Figura 15.
Resultados pruebas de O/F



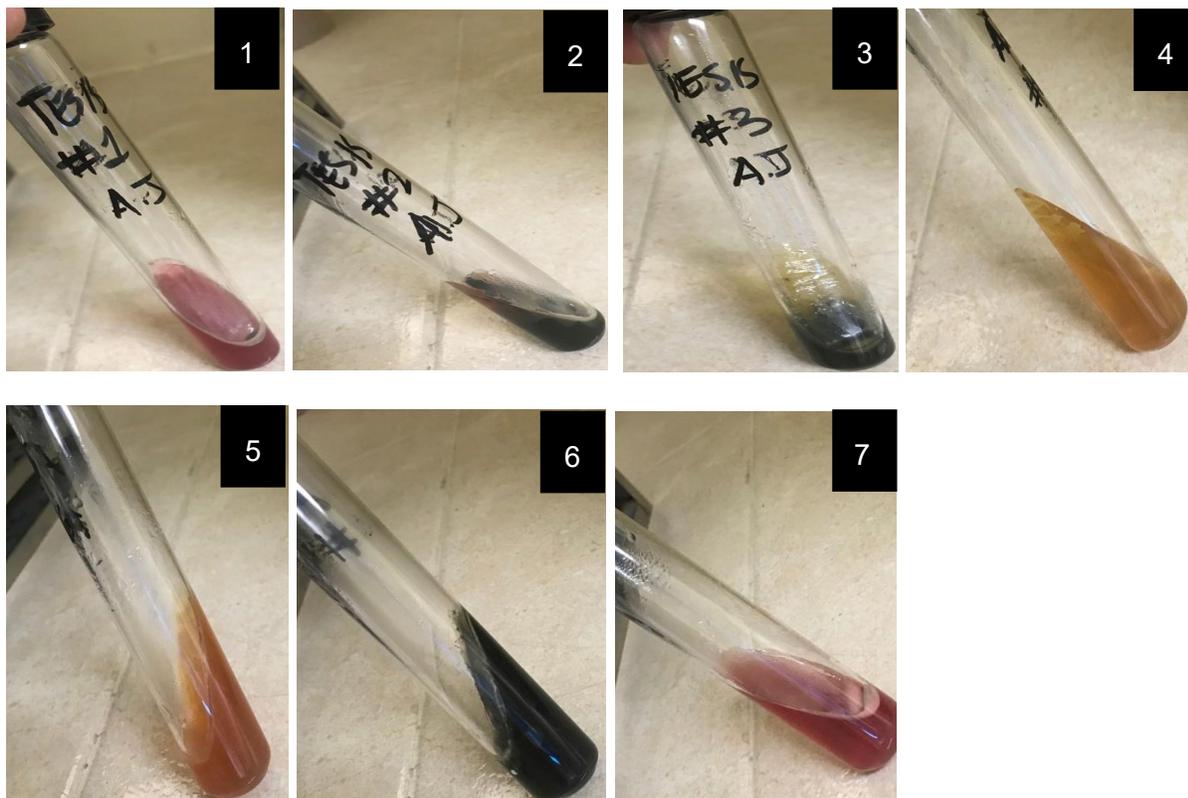
Nota: En cuestión al viraje de color ambos resultados mantuvieron un color amarillento.

En cuanto a la prueba de producción de O/F, que produce fermentación de los carbohidratos presentes en el medio y cambia de color, de azul verdoso a amarillo, por la acumulación del ácido pirúvico (Zalduegui, 1975).

Prueba de KIA (kligler iron Agar)

Figura 16.

Resultados de la prueba KIA para las bacterias de interés



Nota: Las bacterias fueron positivas a la prueba de fermentación KIA

Al aplicar la prueba de KIA, 2 de los aislamientos resultaron positivos (bacteria 4 y bacteria 5) esto significa que son fermentadoras de glucosa, lactosa y/o sacarosa, según (MDM, 2020). Lo que se logra evidenciar por el color rojo caramelo de los tubos. Se observó generación de ácido sulfhídrico para los tubos 2, 3 y 6, esto se da por el ennegrecimiento del

medio. Para los tubos 1 y 7, los medios fueron de color rojo por lo que estas bacterias son fermentadoras de lactosa, sacarosa y/o glucosa (MDM, 2020).

Ensayos moleculares

Amplificación y electroforesis

Figura 17.

Banco nuevo de las bacterias aisladas en EMB

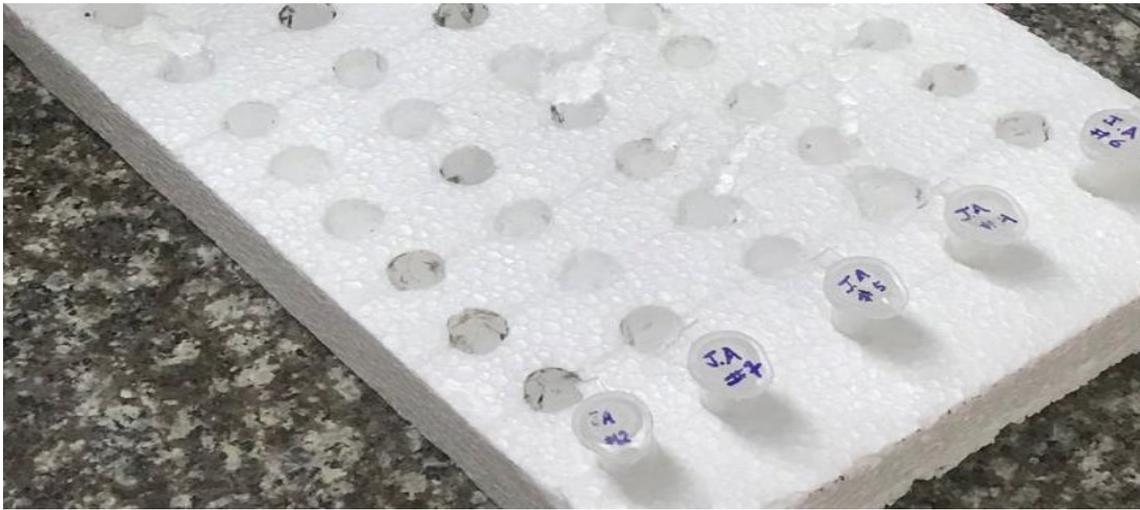
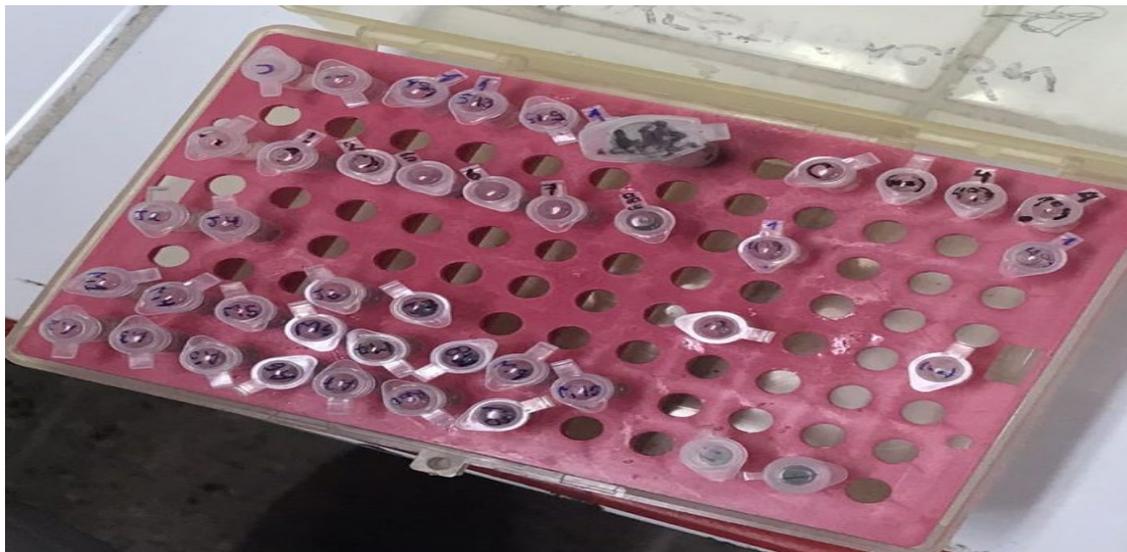


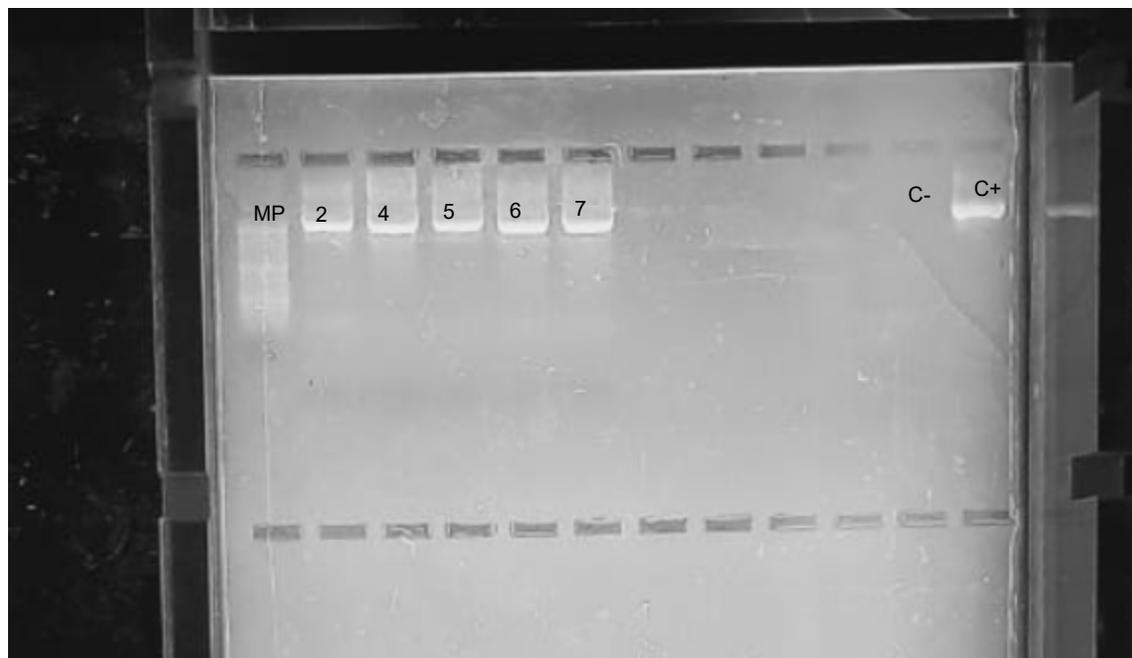
Figura 18.
Producto PCR



Nota: Producto PCR, pre-carga.

El paso previo a cargar el ADN extraído es cargar cada extracto con una tinción que le confiere color y peso, llamado bromuro de etidio. Este bromuro de etidio es el que permite que se pueda observar el avance del ADN a través del gel de agarosa, por lo que cada una de las muestras debe contener esta tinción. El producto de la electroforesis se encuentra en la siguiente tabla y da de resultado un gel de agarosa teñido con el avance del ADN entre 1200 y 1500 pb.

Tabla 21.
Producto de la electroforesis



Nota: Resultado en el gel de agarosa luego de la electroforesis, (MP) Marcador de peso molecular; (Número) ADN bacteriano; (C) control, negativo (-) o (+).

Una vez realizada la extracción y purificación de ADN y la lectura del gel, se enviaron las muestras a secuenciar en Macrogen®, empresa coreana que realiza secuenciación del modelo 3730XL y garantiza resultados de calidad (Macrogen & Bi, n.d.). Las secuencias obtenidas fueron detalladas en la tabla 21. Con la finalidad de conocer el tipo de bacterias que se habían aislado y comprobar si eran *Enterobacterias*.

Tabla 22.
 Información de las secuencias enviadas por MacroGene ®

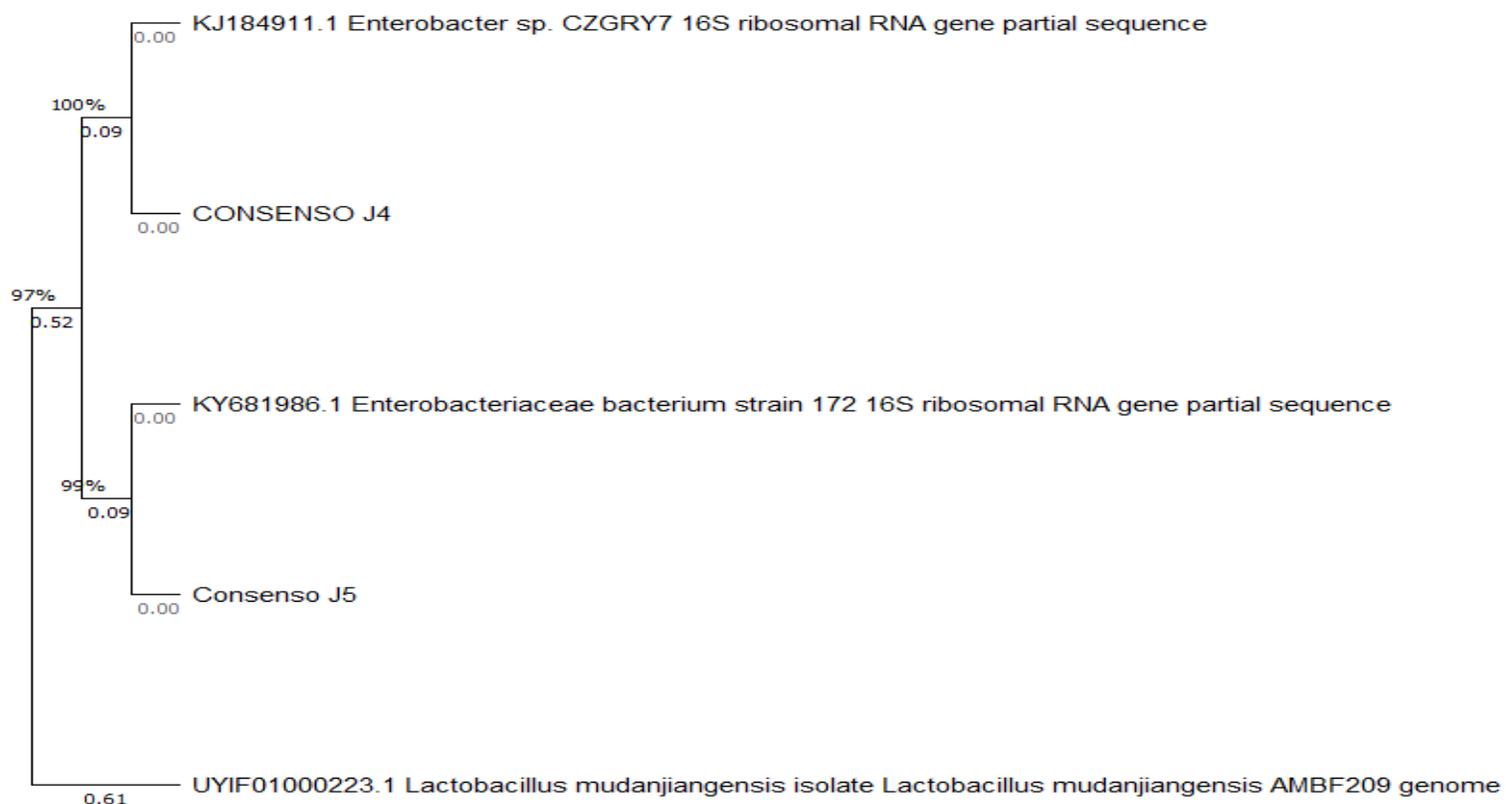
Codificación de la bacteria	Secuencias		Blast
	Forward	Reverse	
Bacteria 2	> J2_16S_RrnaF	>J2_16S_rRNAR	SR
Bacteria 4	>J4_16S_RrnaF	>J4_16S_rRNAR	>KJ184911.1 Enterobacter sp. CZGRY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Bacteria 5	>J5_16S_RrnaF	>J5_16S_rRNAR	>KY681986.1 Enterobacteriaceae bacterium strain 172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Bacteria 6	>J6_16S_RrnaF	>J6_16S_rRNAR	SR
Bacteria 7	>J7_16S_RrnaF	>J7_16S_rRNAR	SR

Nota: En la sección de anexos se detalla información más amplia de las codificaciones de los primers; SR: Sin respuesta.

De los resultados enviados por MacroGene ®, tabla 21, reconocieron, tanto el forward como el reverse, en la base de datos NCBI, al menos a un tipo de *Enterobacteria*. De los 7 extractos de ADN bacteriano, las secuencias reversen y forward, del extracto de la bacteria 4 y

5 fueron las únicas con lectura a través del blast. Con estos resultados se realizó una nueva siembra de solo las bacterias significantes en Agar diferencial MacConkey y EMB.

Figura 19.
Árbol filogenético



Nota: Árbol filogenético obtenido con las secuencias identificadas molecularmente; el agente externo para este análisis fue *Lactobacillus mudanjiangensis*.

De los cebadores para las bacterias 4 y 5, que fueron las únicas que codificaron en *Blast*, por su secuencia consenso (CONSENSO J4 Y J5), se obtuvieron 2 bacterias (tabla 22) presentes en la zona de descarga de aguas residuales de la ganadería. Se respaldan estos

resultados con las pruebas bioquímicas realizadas y la aparición de un ancestro de origen común en la filogenia realizada comparando las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI (Enrique P, 2015).

Aunque ambas bacterias comparten un ancestro común cercano la *Enterobacter CZGRY7* fue aislada, por primera vez, de una cepa obtenida por (Al-Turki & Abdullah, 2021) denominada RH y se considera una de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal por su capacidad de fijar nitrógeno. Por su parte *Enterobacteriaceae Bacterium strain 172*, es un cultivo sin clasificar dentro de las *Enterobacterias* según (Schoch CL, 2020).

Pruebas bioquímicas II (luego de la secuenciación)

Se realizaron nuevos análisis bioquímicos, específicamente para las bacterias 4 y 5. Que son *Enterobacter CZGRY7* (bacteria 4) y *Enterobacteriaceae Bacterium strain 172* (bacteria 5) esto con la finalidad de corroborar los resultados anteriores a la secuenciación con los nuevos y dar interés a las bacterias identificadas molecularmente. El resumen de estos resultados bioquímicos se detalla en la tabla 23.

Tabla 23.
Resumen de resultados de pruebas bioquímicas

Número de bacteria	Catalasa	KIA	óxido Fermentación	Indol	Gram
Bacteria 4	Positivo	Pico Amarillo fondo rojo; sin producción de gas (-)	Fermentativa	Negativo	Negativo

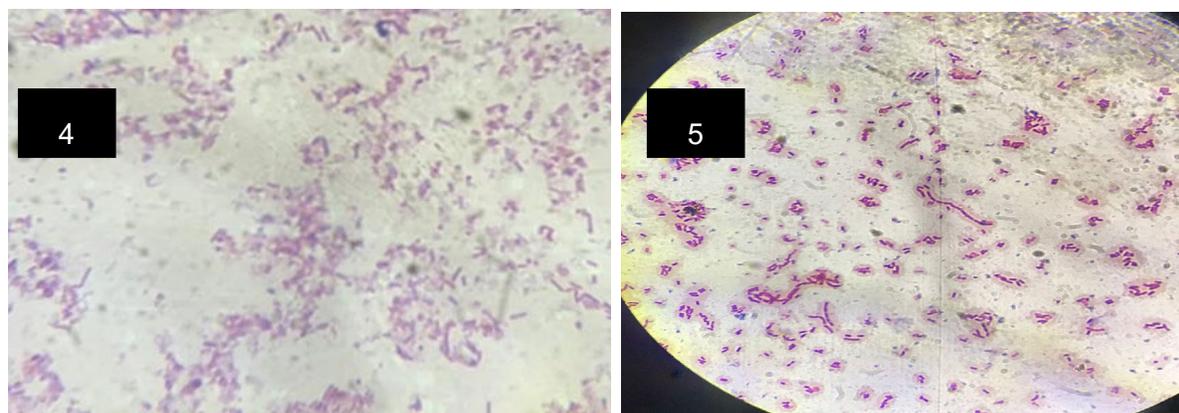
Bacteria 5	Positivo	Pico amarillo/Fondo rojo; No fermenta azúcar; Fermenta Lactosa (+)	Fermentativa	Negativo	Negativo
-------------------	----------	--	--------------	----------	----------

Nota: Bacterias 4 y 5, con sus respectivos resultados bioquímicos para catalasa, Gram, indol, KIA y O/F.

Tinción Gram

Figura 20.

Tinción Gram de las bacterias de interés



Nota: Bacilos Gram negativos; bacterias 4 y 5 respectivamente; Vista a 100X.

Los resultados muestran el resultado obtenido en el ensayo de tinción Gram, tanto la bacteria 4 como la bacteria 5 tienen forma de bastones y las dos son Gram negativas (Coico, 2005).

Prueba de catalasa

Figura 21.

Prueba de catalasa de los aislados de interés



Nota: Se observó una reacción lenta, frente a la producción de burbujas que es una reacción positiva para la descomposición de peróxido de hidrógeno mediada por la enzima catalasa (Espinosa, 2018).

Prueba de indol

Figura 22.

Resultados de la prueba de indol de las bacterias de interés



Para esta prueba se observó una respuesta negativa debido a que no se formó el anillo de color caramelo indica que la bacteria en solución no degrada el triptófano y por lo tanto no produce indol (Musó & Acosta, 2017).

Prueba de oxido fermentación

Figura 23.

Resultados pruebas de O/F



En cuanto a la prueba de producción de O/F, que produce fermentación de los carbohidratos presentes en el medio y cambia de color, de azul verdoso a amarillo, por la acumulación del ácido pirúvico (Zalduegui, 1975).

Prueba de KIA (kligler iron Agar)

Figura 24.

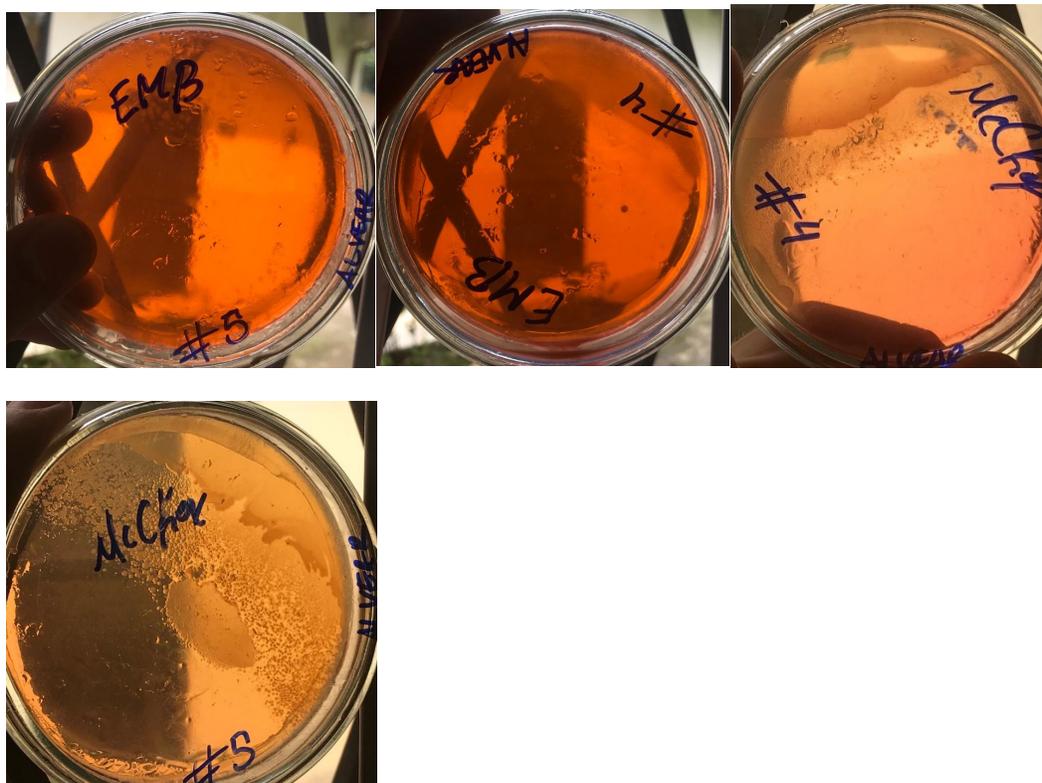
Resultados de la prueba KIA para las bacterias de interés



Nota: Bacterias 4 y 5, fueron positivas a la prueba de fermentación KIA

Al aplicar la prueba de KIA dos aislamientos resultaron positivos (bacterias 4 y 5) esto significa que son fermentadoras de glucosa, lactosa y/o sacarosa según (MDM, 2020). Lo que se logra evidenciar por el color rojo caramelo de los tubos.

Figura 25.
Resultados de medios diferenciales EMB y MacConkey



Nota: Denota crecimiento incoloro en EMB lo que significa que las bacterias no fermentan sacarosa (Gil Martínez, 2019); Denota crecimiento rosado leve para la bacteria 4 y la bacteria 5 en MacConkey, lo que significa que son bacterias fermentadoras de lactosa (BritaniaLab, 2021b).

Resistencia a antibióticos

Al analizar el ensayo de antibiograma con las bacterias *Enterobacter CZGRY7* y a *Enterobacteriaceae Bacterium strain 172* se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 24.

Tabla 24.
Interpretación de resultados de la prueba de antibiograma

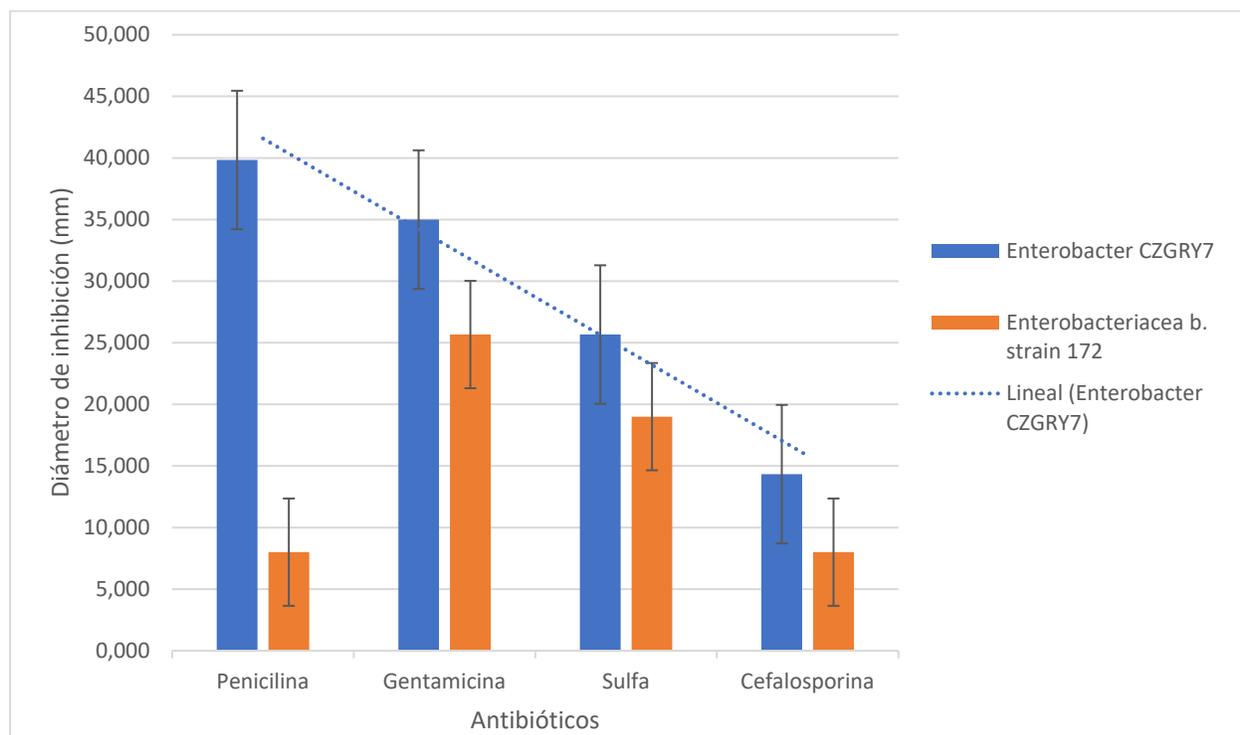
Bacterias	Antibiótico	Datos de inhibición (mm)		
		R1	R2	R3
Bacteria 4: Enterobacter	Cefalosporina	15	13	15
	Sulfamethox- trimetoprim	25	27	25
	Penicilina G	40	39,5	40
	Gentamicina	34	36	35
Bacteria 5: Enterobacteriaceae strain 172	Cefalosporina	8	8	8

Sulfamethox- trimetoprim	18	18	21
Penicilina G	8	8	8
Gentamicina	25	26	26

Nota: 8 mm significa que no hubo inhibición por parte de los antibióticos, ya que es la medida del disco OXOID.

Figura 26.

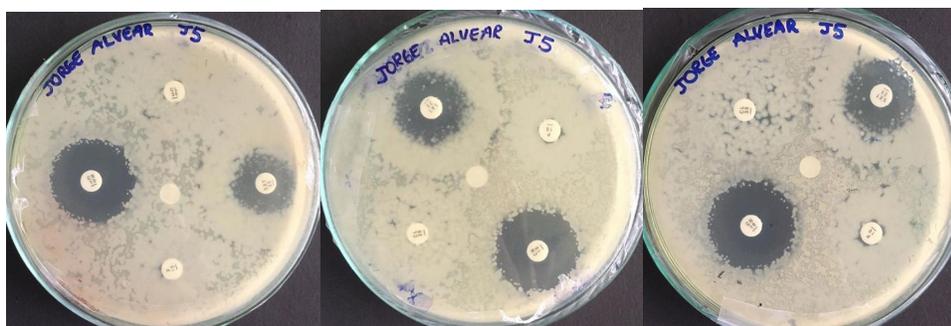
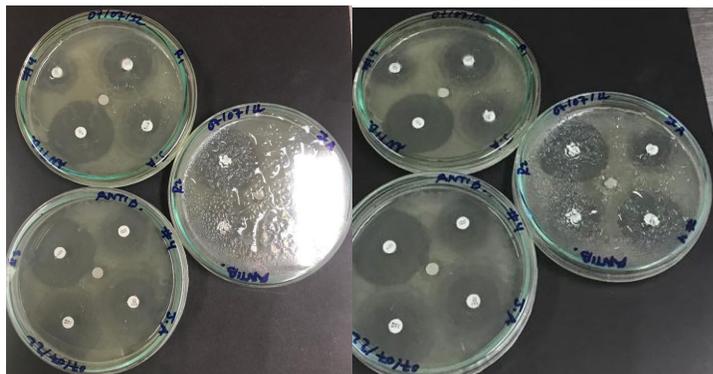
Gráfico de barras comparativas de los resultados obtenidos



Nota: La línea de tendencia indica que el diámetro de inhibición de *Enterobacter CZGRY7* fue mayor en cada antibiótico que el obtenido por *Enterobacteriaceae b. strain 172*.

Se observó un diámetro de inhibición (mm) mayor frente a los antibióticos en el antibiograma realizado con *Enterobacter CZGRY7*, con un promedio de inhibición de 39,83 mm frente a penicilina. El diámetro promedio mayor de inhibición por *Enterobacteriaceae b. strain 172* fue de 25,67 mm frente a gentamicina.

Figura 27.
Resultados antibiograma de las bacterias 4 y 5
Bacteria 4



Nota: Se realizaron 3 repeticiones del antibiograma para cada bacteria con la finalidad de dar consistencia a los resultados.

Diseño experimental

Para el análisis de los datos se utilizó una herramienta de análisis estadístico, *Infostat/E*, que permitió utilizar un ANOVA con 5% de confiabilidad. Los resultados se muestran en la tabla 23.

Análisis de varianza de las enterobacterias identificadas

Tabla 25.
Análisis de varianza de las Enterobacterias identificadas

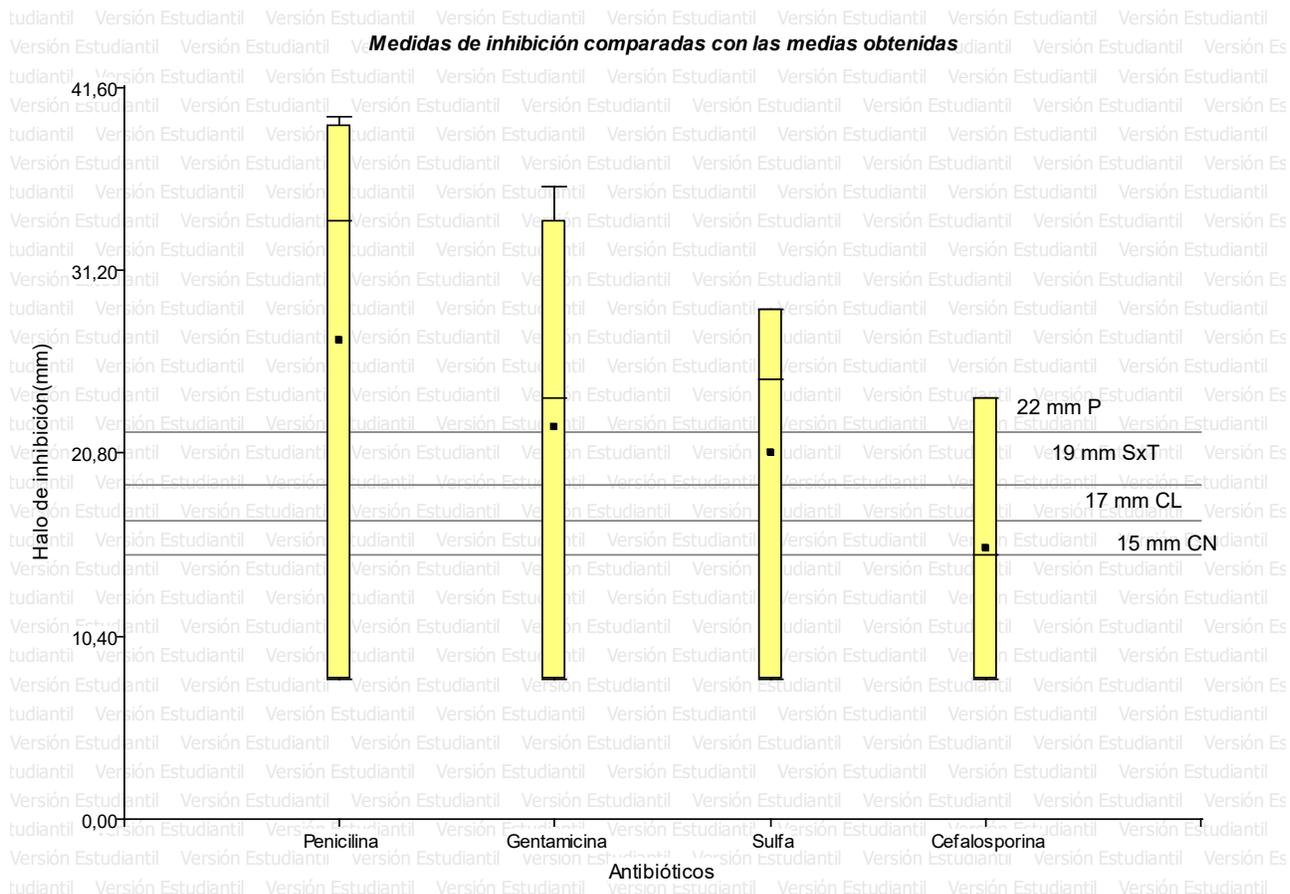
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8278,82	17	486,99	1927,14	<0,0001
Enterobacterias	6045,07	3	2015,02	7973,96	<0,0001
Antibióticos	918,13	3	306,04	1211,09	<0,0001
Repeticiones	0,52	2	0,26	1,03	0,3637
Enterobacterias*Antibiótico	1627,5	9	180,83	715,6	<0,0001
Error	13,65	54	0,25		
Total	8292,47	71			

Nota: El coeficiente de variación obtenido fue de 2,61; Se logra identificar que tanto el factor Enterobacterias como el factor Antibióticos y su interacción resultaron ser significantes con un nivel de confianza del 5% y para estimar los efectos de cada factor se realizó una prueba de ajuste de Tukey HSD. Para las repeticiones no se observó una significancia, lo que significa que la prueba está bien realizado el experimento. En las siguientes tablas se muestran los resultados de los análisis de significancia de Tukey.

Se realizaron comparaciones individuales entre las medias teóricas y las medias obtenidas en este estudio. Los resultados obtenidos se relatan en las siguientes tablas.

Figura 28.

Gráfico de puntos medios en comparación con la inhibición obtenida con Enterobacter CZGRY7



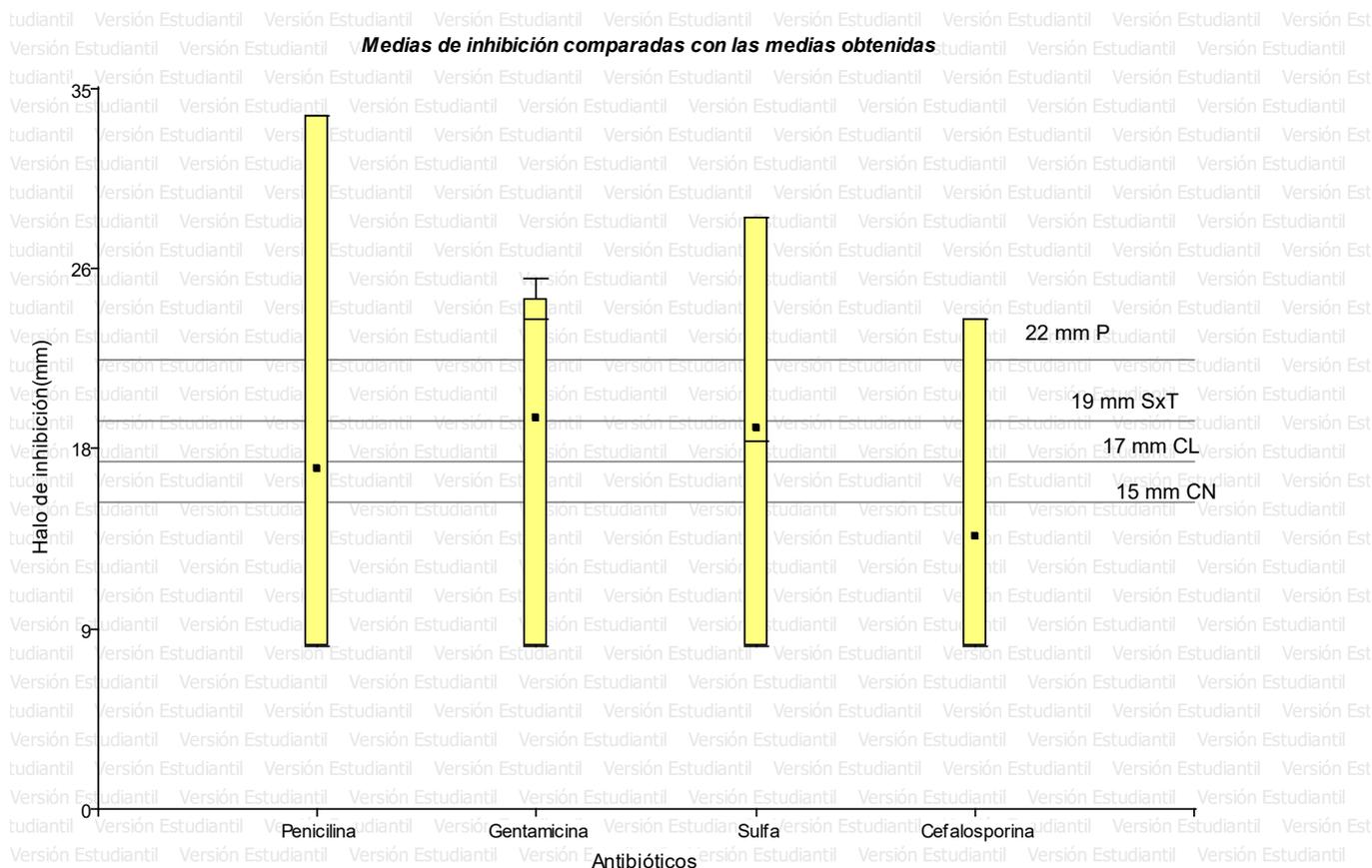
Nota: Líneas horizontales son las medias teóricas de cada antibiótico.

Los datos reflejan que existen al menos 4 medias de inhibición diferentes para esta bacteria. Una media de 15,44 mm en cefalosporina refleja una resistencia intermedia ya que se no pasa los 17mm que es el límite para considerar a una bacteria sensible a este antibiótico. Para el antibiótico sulfamethox-trimetoprim (SxT) se encontró una inhibición media de 20,89

mm de halo, reflejando sensibilidad ante SxT con una inhibición de 19 mm que es el rango máximo para considerar a una bacteria sensible a este antibiótico. Para el antibiótico Penicilina G, se encontró un halo de inhibición medio de 27,28 mm lo que representa que este aislamiento presenta sensibilidad al antibiótico ya que la media de inhibición en penicilina G es de 22 mm. Para la Gentamicina, se encontró una media de inhibición de 22,33 mm, siendo la más alta formación de halo de todos los antibióticos. Frente a la media de inhibición, según literatura es de 15 mm, nuestra bacteria es sensible al antibiótico demostrando diferencia por más del 5% de la media teórica. Todos los datos teóricos fueron extraídos de (Bernal R. & Guzmán, 1984).

Figura 29.

Gráfico de puntos medios en comparación con la inhibición obtenida con *Enterobacteriaceae strain 172*.



Notas: Las líneas horizontales son las medias teóricas de cada antibiótico

Los datos reflejan que existen al menos 4 medias de inhibición diferentes entre sí para la bacteria *Enterobacteriaceae strain 172*. Una media de 13,33 mm en cefalosporina refleja una resistencia intermedia ya que se no pasa los 17mm que es el límite para considerar a una bacteria sensible a este antibiótico. Para el antibiótico sulfamethox-trimetoprim (SxT) se encontró una inhibición media de 18,67 mm de halo, reflejando sensibilidad ante SxT con una inhibición de 19 mm que es el rango máximo para considerar a una bacteria sensible a este

antibiótico. Para el antibiótico Penicilina G, se encontró un halo de inhibición medio de 16,67 mm lo que representa que este aislamiento presenta sensibilidad al antibiótico ya que la media de inhibición en penicilina G es de 22 mm. Para la Gentamicina, se encontró una media de inhibición de 19,22 mm, siendo la más alta formación de halo de todos los antibióticos. Frente a la media de inhibición, según literatura es de 15 mm, nuestra bacteria es sensible al antibiótico demostrando diferencia por más del 5% de la media teórica. Todos los datos teóricos fueron extraídos de (Bernal R. & Guzmán, 1984).

Tabla 26.
Prueba de Tukey HSD para factor: Antibiótico

Antibióticos	Medias	n	E.E.	
Gentamicina	23,17	18	0,13	A
Penicilina	22,46	18	0,13	B
Sulfa	20,42	18	0,13	C
Cefalosporina	13,58	18	0,13	D

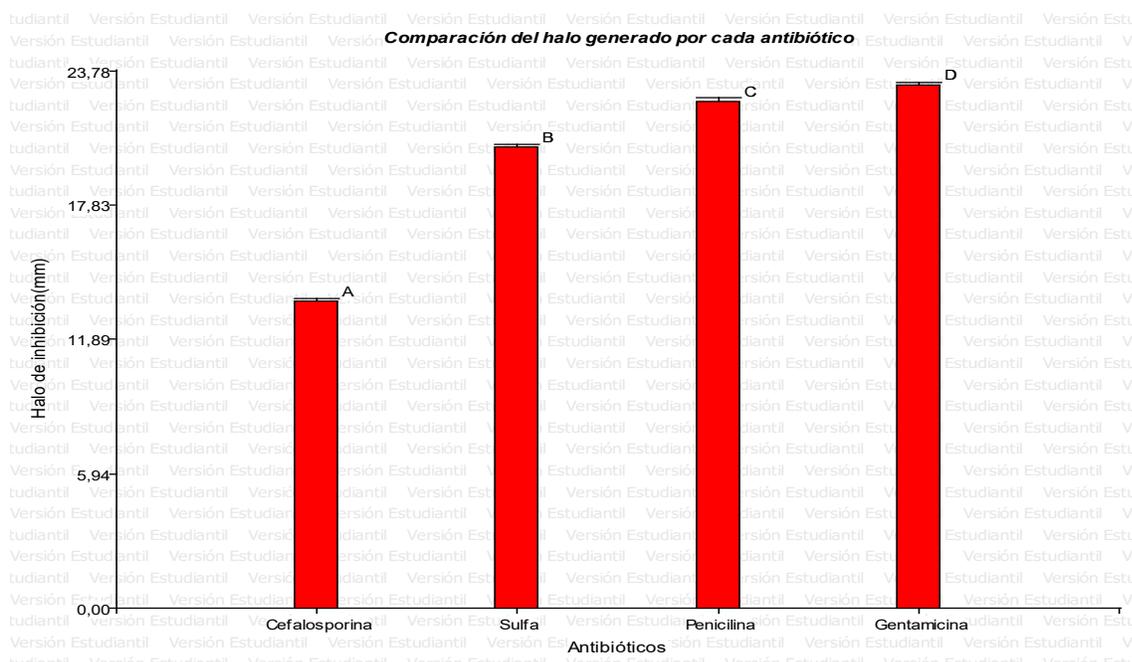
Nota: Podemos observar que cada grupo de antibiótico es significativamente diferente a los otros formando 4 grupos diferentes (A) para las cefalosporinas, (B) sulfa, (C) Penicilina, Gentamicina (D). Demostrando que Gentamicina presentó el mayor halo de inhibición con una media de 23.17 mm.

Tabla 27.
Prueba de Tukey HSD para el factor: Enterobacterias

Enterobacterias	Medias	n	E.E.	
Enterobacter	28,71	12	0,15	A
C+	27,75	24	0,1	B
Enterobacteriaceae	15,17	12	0,15	C
C-	8	24	0,1	D

Nota: Se determinaron 4 grupos significantes (D) para el control negativo, (C) para Enterobacteriaceae, (B) para el control positivo y (A) para la Enterobacter. Con un medio mayor de significancia para el grupo A, con una media 28,71.

Figura 30.
Barras de inhibición de antibióticos



Nota: resumen gráfico de inhibición media de los antibióticos.

Tabla 28.

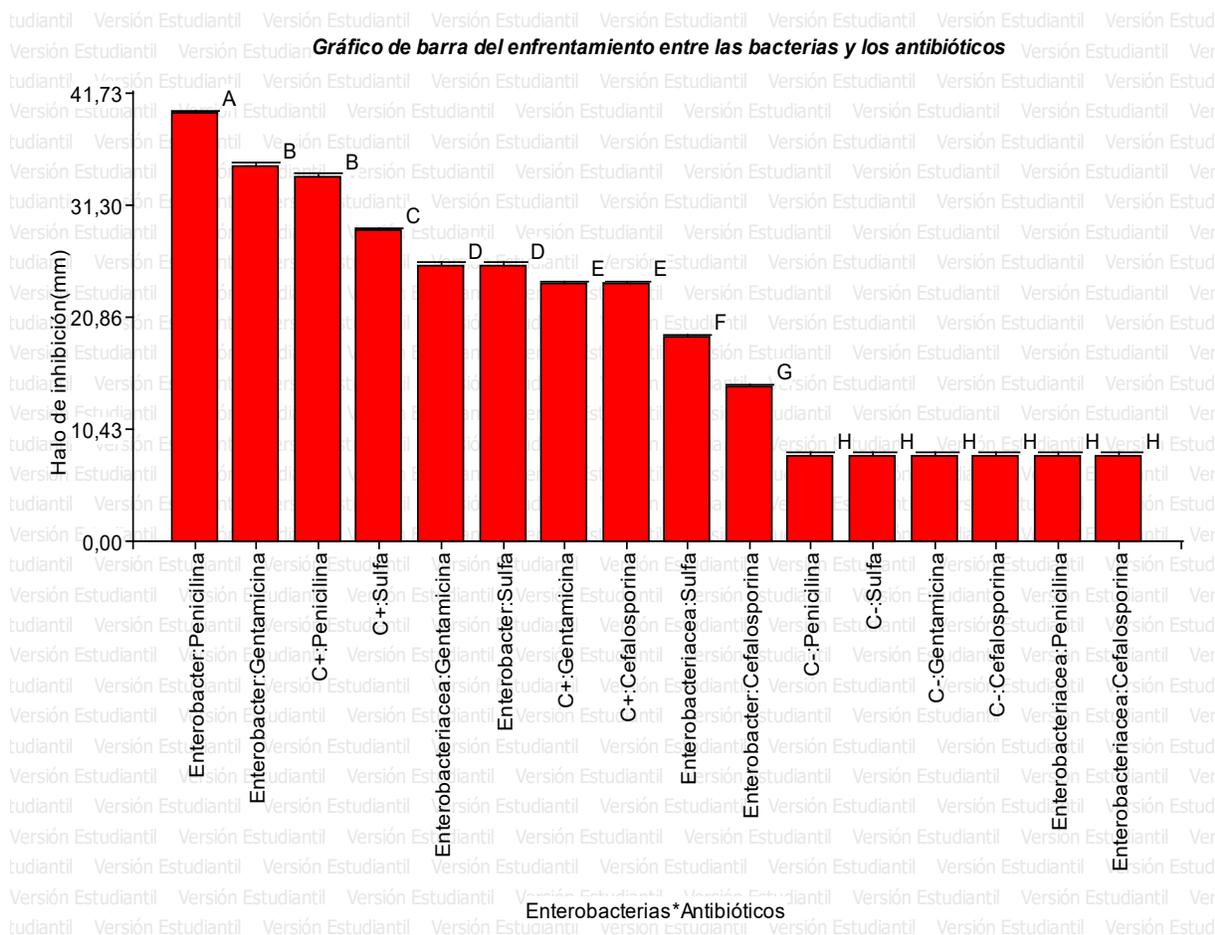
Prueba de Tukey para el factor de la interacción: Enterobacterias + Antibióticos

Enterobacterias	Antibióticos	Medias	n	E.E.			
Enterobacter	Penicilina	39,83	3	0,29	A		
Enterobacter	Gentamicina	35	3	0,29	B		
C+	Penicilina	34	6	0,21	B		
C+	Sulfa	29	6	0,21	C		
Enterobacteriaceae	Gentamicina	25,67	3	0,29	D		
Enterobacter	Sulfa	25,67	3	0,29	D		
C+	Gentamicina	24	6	0,21	E		
C+	Cefalosporina	24	6	0,21	E		
Enterobacteriaceae	Sulfa	19	3	0,29	F		
Enterobacter	Cefalosporina	14,33	3	0,29	G		
C-	Penicilina	8	6	0,21			H
C-	Sulfa	8	6	0,21			H
C-	Gentamicina	8	6	0,21			H
C-	Cefalosporina	8	6	0,21			H
Enterobacteriaceae	Penicilina	8	3	0,29			H
Enterobacteriaceae	Cefalosporina	8	3	0,29			H

Nota: Se encontraron 8 grupos significativos para la interacción de los antibióticos*Enterobacterias en relación con la producción de halos.

El grupo más significativo es el (A) *Enterobacter* frente a penicilina con una media 39,83 mm de generación de halo, los grupos con más resistencia a los antibióticos fueron la combinación de *Enterobacteriaceae* en presencia de cefalosporina (8mm) y penicilina (8mm).

Figura 31.
Inhibición de bacterias según tratamientos empleados



Nota: Tomado de *Infostat/E*.

Tabla 29.
Cuadro de error medio entre repeticiones

Repeticiones	Medias	n	E.E.	
3	20,01	24	0,1	A
2	19,91	24	0,1	A
1	19,8	24	0,1	A

Nota: Existió un solo grupo de significancia para el error medio entre las repeticiones. El error encontrado no fue significativo lo que confiere robustez al análisis, denotando que no existe diferencia entre cada repetición, dando fidelidad a los resultados.

Capítulo V: Conclusiones

Conclusiones

Se toma y se acepta la hipótesis alternativa (H_{a1}) lo que indica que si existen enterobacterias en los desechos líquidos que genera la ganadería de la Universidad de las Fuerzas armadas ESPE-Sede Santo Domingo.

Mediante el análisis bioquímico y molecular se logró identificar 2 especies de la familia Enterobacteriaceae sp.: *Enterobacteriaceae bacterium strain 172* (aislamiento 5) y *Enterobacter CZGRY7* (aislamiento 4) y a través del análisis de filogenia se determinó que comparten ciertas características y propiedades evolutivas, compartiendo un ancestro común.

Se acepta la hipótesis alternativa (H_{a2}) ya que se encontró al menos a una de las bacterias con baja sensibilidad a un antibiótico, que corresponde a *Enterobacteriaceae Bacterium strain 172* que demostró resistencia a cefalosporina y penicilina G, concluyendo que la mejor inhibición para *Enterobacteriaceae Bacterium strain 172* se obtuvo con SxT y a CN, con medias de inhibición de 25,67 y 19 mm, respectivamente. Para *Enterobacter CZGRY7* el mayor efecto de inhibición se obtuvo con Penicilina G con un promedio de 39 mm, lo que también se observó con Cefalosporina que generó un halo de 14,33 mm.

Capítulo VI: Recomendaciones

Recomendaciones en base a las conclusiones

En base al muestreo realizado, se debe tomar en cuenta mantener siempre el aseo del lugar de muestreo, la existencia de estancamiento y el tiempo de reposo para tomar una buena muestra.

Se recomienda estandarizar un protocolo completo de extracción de ADN 16s con la finalidad de obtener ADN de mejor calidad.

Para la parte de resistencia a antibióticos se recomienda realizar más enfrentamientos de antibióticos a las bacterias ya secuenciadas para obtener una base de datos de resistencia por bacteria previamente identificada.

Bibliografía

- (Ministerio del Ambiente del Ecuador[MAE]. (2015). Revision Del Anexo 1 Del Libro Vi Del Texto Unificado De Legislacion Secundaria Del Ministerio Del Ambiente: Norma De Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes Al Recurso Agua. *Registro Oficial No. 387, 97*, 1–40. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155128.pdf>
- 3M Microbiology. (2008). 3MTM Petrifilm™ Placas para Recuento de Aerobios. *Guía de Interpretación*, 5–7. https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petriefilm_guias.pdf
- Al-Turki, A., & Abdullah, R. R. H. (2021). Native plant growth-promoting rhizobacteria for growth promotion of lettuce from qassim, saudi arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *24*(7), 773–779. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.773.779>
- Alfred E., B., & Heidi R., S. (2017). Microbiological applications 14e: Laboratory Manual in General Microbiology. In *American Journal of Public Health* (14th ed., Vol. 14, Issue 1). McGraw-hill. <https://doi.org/10.2105/ajph.17.1.64-c>
- Alonso, L., & Poveda, A. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm. *Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Comercial Experimental*, 213. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8238/tesis230.pdf?sequenc>
- Amos, G. C. A., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. (2014). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(7), 1785–1791. <https://doi.org/10.1093/jac/dku079>
- Baltazar, M., Bourgeois-Nicolaos, N., Larroudé, M., Couet, W., Uwajeneza, S., Doucet-Populaire, F., Ploy, M. C., & Re, S. Da. (2022). Activation of class 1 integron integrase is promoted in the intestinal environment. *PLoS Genetics*, *18*(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010177>
- Becton Dickinson and Company. (2014). *BBL Kligler Iron Agar Slants. September*, 4–7. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22735>
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, *4*(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- BritaniaLab. (2021a). Kligler iron agar. *Laboratorios Britania*.
- BritaniaLab. (2021b). Mac Conkey Agar. *Laboratorios Britania*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

- Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Checa, A. (2020). Método: Gel de electroforesis Agarosa – Conogasi. *Biomedicina*, 4(1), 3–5.
<https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>
- Coico, R. (2005). Gram Staining Basic Protocol Commonly Used Techniques. *Current Protocols in Microbiology*, 3–4.
- Cuevas, L. B. (2009). Microbiología clínica. *Universidad Europea de Madrid*, 1, 236–265.
<https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Elizondo-Salazar, J. A., & Marín-Hernández, D. E. (2019). Uso de agua para limpieza en una lechería del Valle Central de Costa Rica. *Nutrición Animal Tropical*, 13(2), 43–57.
<https://doi.org/10.15517/nat.v13i2.39731>
- Enrique P, L. (2015). Análisis filogenético Desarrollo de un trabajo final en base a secuencias de ADN para un curso de pregrado. *Departamento de Ecología y Evolucion, Facultad de Ciencias.*, 1–30.
- Enterobacterias. (2022). *Características generales*. 1–33.
- Espinosa Castaño, I., Báez Arias, M., Hernández Fillor, R. E., López Dorta, Y., Lobo Rivero, E., & Corona-González, B. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio. *Revista de Salud Animal*, 41(3), 1–19.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v41n3/2224-4700-rsa-41-03-e07.pdf>
- Espinosa, J. (2018). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. In *Tesis* (Vol. 1).
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Fadare, F. T., Adefisoye, M. A., & Okoh, A. I. (2020). Occurrence, identification, and antibiogram signatures of selected Enterobacteriaceae from Tsomo and Tyhume rivers in the Eastern Cape Province, Republic of South Africa. *PLoS ONE*, 15(12 December), 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238084>
- Gil Martínez, C. (2019). *METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)*.
https://rpubs.com/Cristina_Gil/RSM
- González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., & González Ponce, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Medica Peruana*, 36(2), 145–151.
<https://doi.org/10.35663/amp.2019.362.816>
- Gram, T. De. (1884). *TINCIÓN DE GRAM*. 13. <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Tincion-de-Gram.pdf>
- Hallstrom, K. N., & McCormick, B. A. (2014). Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis. In *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00016-0>
- Howland, J. L. (1996). Short protocols in molecular biology, third edition: Edited by F Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith and K Struhl. P 836. John Wiley & Sons, New York. 1995. \$74.95. ISBN 0-471-13781-2. *Biochemical Education*, 24(1), 68.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.1996.5690240143>

- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ (Online)*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- Lee, A. (2021). *Mb352 General Microbiology*.
- Macrogen, E., & Bi, A. (n.d.). *Guía a para la presentación de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen . Contactos Ú tiles Ayuda y consejos técnicos Dirección de enví. 2009(C)*.
- Materiales, I., No, R., Bacteriol, A., Est, G., Desempe, C. D. E., Por, T., Nutritivo, A., Reactivos, D. E. L. O. S., Almacenamiento, C. D. E., Reactivos, E. D. E. L. O. S., Nutritivo, E. A., Resultadosanal, D. E., Calidad, C. D. E., & Nutritivo, E. A. (2015). *Medio de cultivo Nutritivo*. 6–7.
- MDM. (2020). SERIES DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (UREA , CITRATO , LISINA , SIM Y TSI) Kit x unidad, 10 unidades, 20 unidades de medio de cultivo en tubo, listo para usar. *MDM Científica S.A.S.*, 4. <https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-SERIES-DE-IDENTIFICACION-BIOQUIMICA.pdf>
- Mendoza, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Medica Herediana*, 23(2), 119–127. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000200008%0Ahttp://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2012000200008&script=sci_arttext
- Muso, E., & Acosta, C. (2017). “Evaluación de bioaerosoles asociados en el sitio de disposición final de residuos sólidos en la Empresa Pública de Aseo y Gestión Ambiental del Cantón Latacunga (EPAGAL)”. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 80. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25305/1/BQ_120.pdf
- OMS. (2016). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- Pacheco, P. O., M., del C. S.-A., & M., J. E. O. (2020). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. *GuíaABE*, 1–21.
- Partridge, S. R. (2015). Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology*, 47(3), 276–284. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000237>
- Rodríguez Camacho, L. (2012). Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias. *Microsoft Word*, 9–11. https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf
- Rustrían, E., Ramírez, D., Solano, G., & De Anda, M. A. (2013). Estudio preliminar de identificación bioquímica de Enterobacterias en heces de Coyote (*Canis latrans*) en vida salvaje y cautiverio. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación*

de La Universidad Simón Bolívar, ISSN-e 1665-692X, Nº. 12, 2013, Págs. 121-132, 12, 121–132. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4745474>

Schoch CL, et al. N. T. (2020). *Enterobacteriaceae bacterium 172. A comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1348078>

Tankeshwar, A. (2022). *Mueller Hinton Agar (MHA): Composition, Preparation, Uses*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/mueller-hinton-agar/>

UNPSJB. (2017). *Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía*. 1–38.
<http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/07-Metabolismo-Identificacion-y-taxonomia.pdf>

Valdivieso Menéndez, M. L., & Naranjo Gaybor, S. J. (2022). Diagnóstico de la contaminación de las descargas de las aguas residuales generadas en la ESPE, Sede Santo Domingo y diseño de la planta de tratamiento. *Repositorio ESPE*, 8.5.2017, 2003–2005.
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/31522/1/T-ESPE-052389.pdf>

Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2019). *Prescott 's Microbiology*.

Zalduegui, P. (1975). Bioquímica de las fermentaciones. *Monografías de La Universidad Politécnica de Madrid*, 50.