



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



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

Autor: Alvear Falcones Jorge Sebastián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

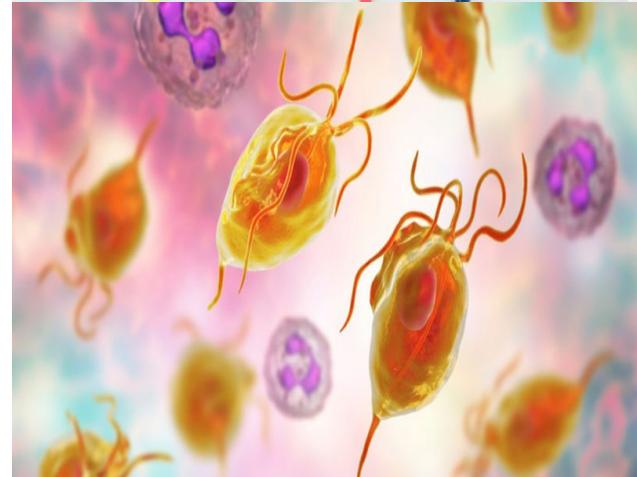
Directora: Naranjo Gaybor, Sandra PhD.

25 de agosto del 2022



# INTRODUCCIÓN

- Los fármacos han sido una herramienta de alta eficiencia para la crianza de animales para comercialización.
- La farmacorresistencia se ve influenciada por la mala práctica, por la ubicación geográfica en donde se genera y la transmisión mediante alimentos, personas o animales (*OMS, 2016*).
- Existen géneros de bacterias que limitan el funcionamiento de los antibióticos mediante métodos de resistencia específicos (*González Mendoza et al., 2019*).
- La identificación de bacterias que habitualmente se encuentran presentes en el ganado es importante cuando se requiere conocer la forma correcta de aplicar antibióticos frente a las enfermedades del ganado bovino.



## 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.



## Efluente



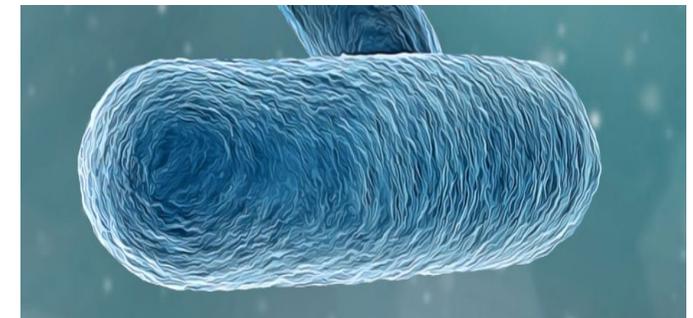
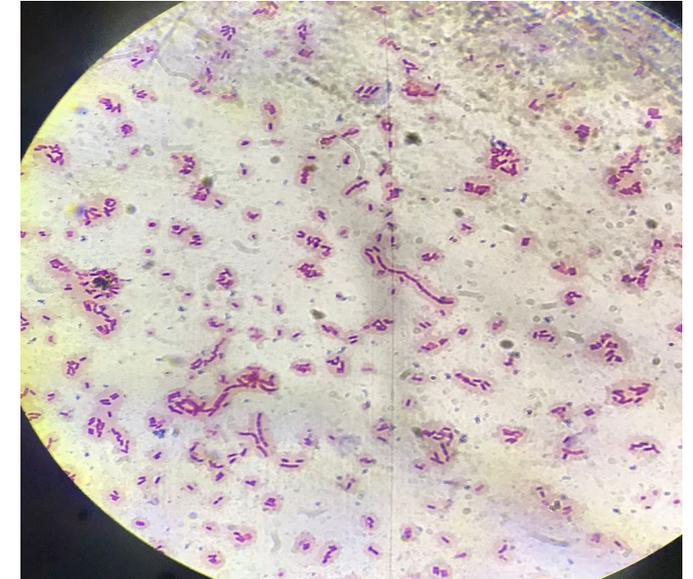
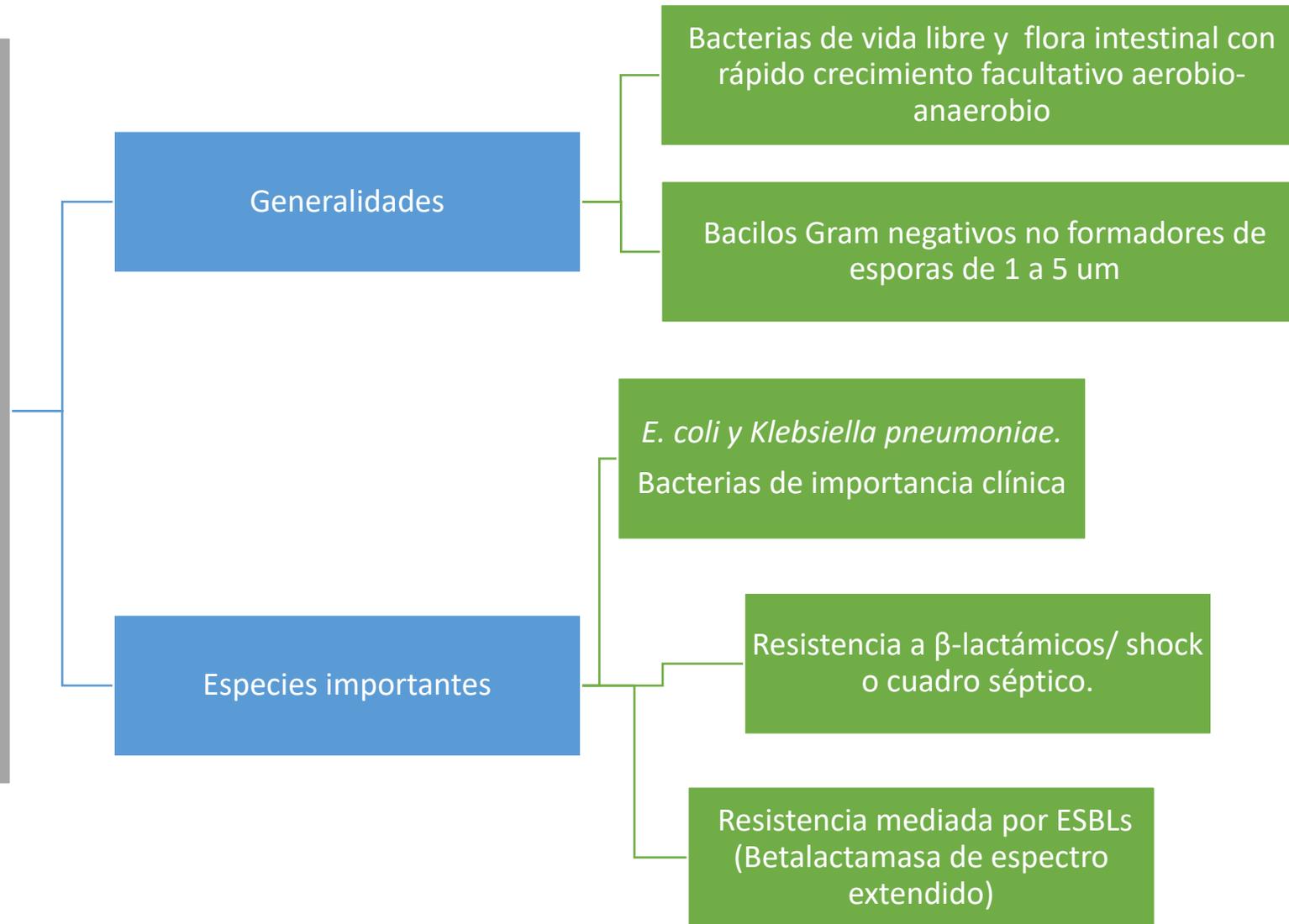
## Agua residual industrial

- 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).

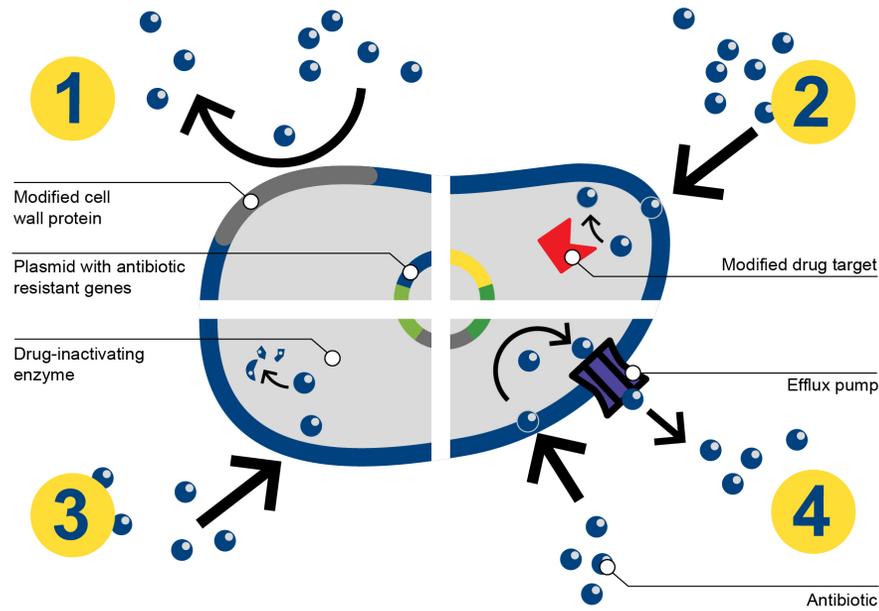
## *Uso del agua en producciones pecuarias*

- Líquido producto de los lavados.
- Capacidad contaminante diaria  
1 kg de excremento = 12 litros/día.
- Generación de efluentes con carga contaminante alta en dependencia de la condición entérica del animal.

# Enterobacterias



## Mecanismo de resistencia antibióticos



- Modificación de la membrana
- Modificación del objetivo
- Modificación del antibiótico
- Mecanismo de bomba de eflujo

## Genes resistentes

### 1. Inserción de secuencias

Alta estabilidad por sus extremos invertidos repetibles. De 1 a 2 fragmentos de lectura abierta que dan paso a genes facilitadores de la transposición (*Hallstrom & McCormick, 2014*)

### 2. Integrones/casete de genes

Sistema SOS (reparación del ADN bacteriano) precursor de la resistencia por administración ininterrumpida de fármacos (*Baltazar et al., 2022*).

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>.

Baltazar, M., Bourgeois-Nicolaos, N., Larroudé, M., Couet, W., Uwajenezza, 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>



Obtención de la muestra

Dilución seriada

(Fadare et al. 2020)

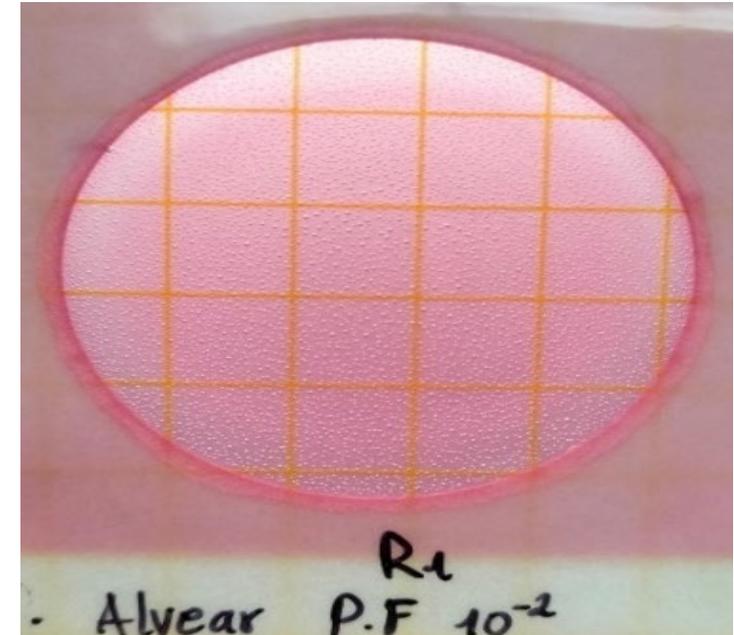
Siembra en Petri film 3M

Placa de recuento bacteriano



Conteo

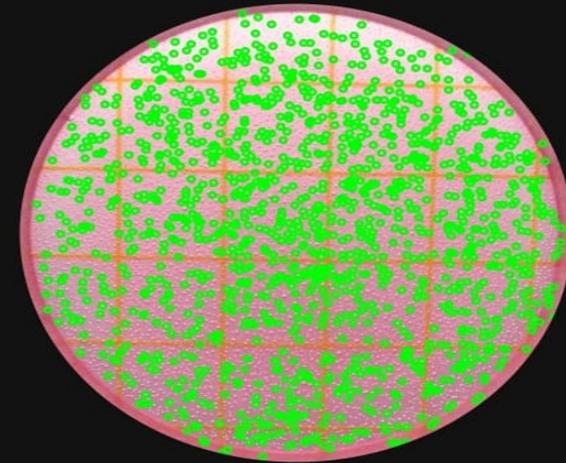
APD ColonyApp

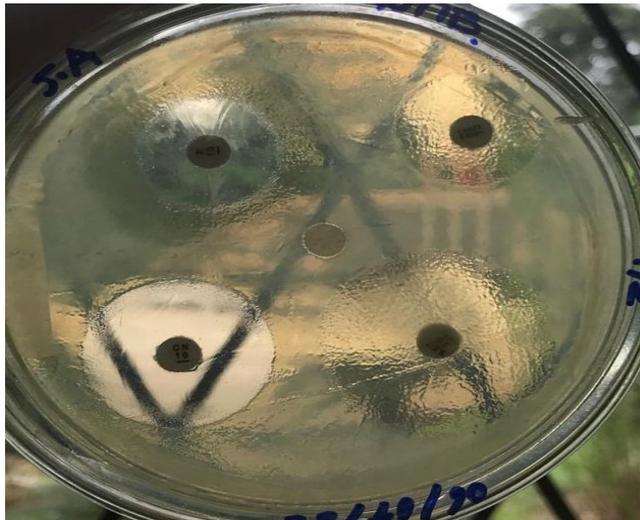
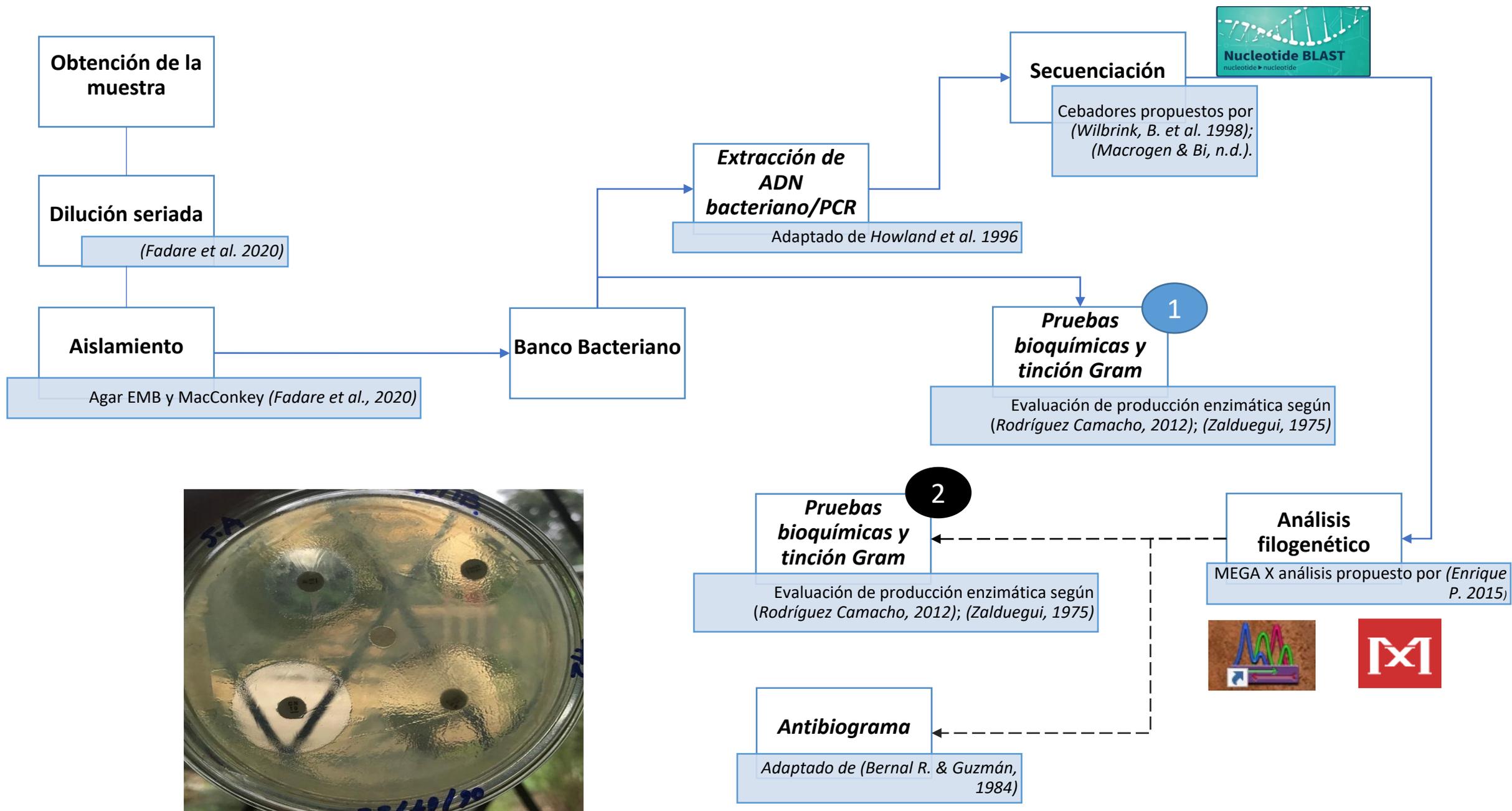


Total Colonies: 1364

Removed: 0

Added: 1364



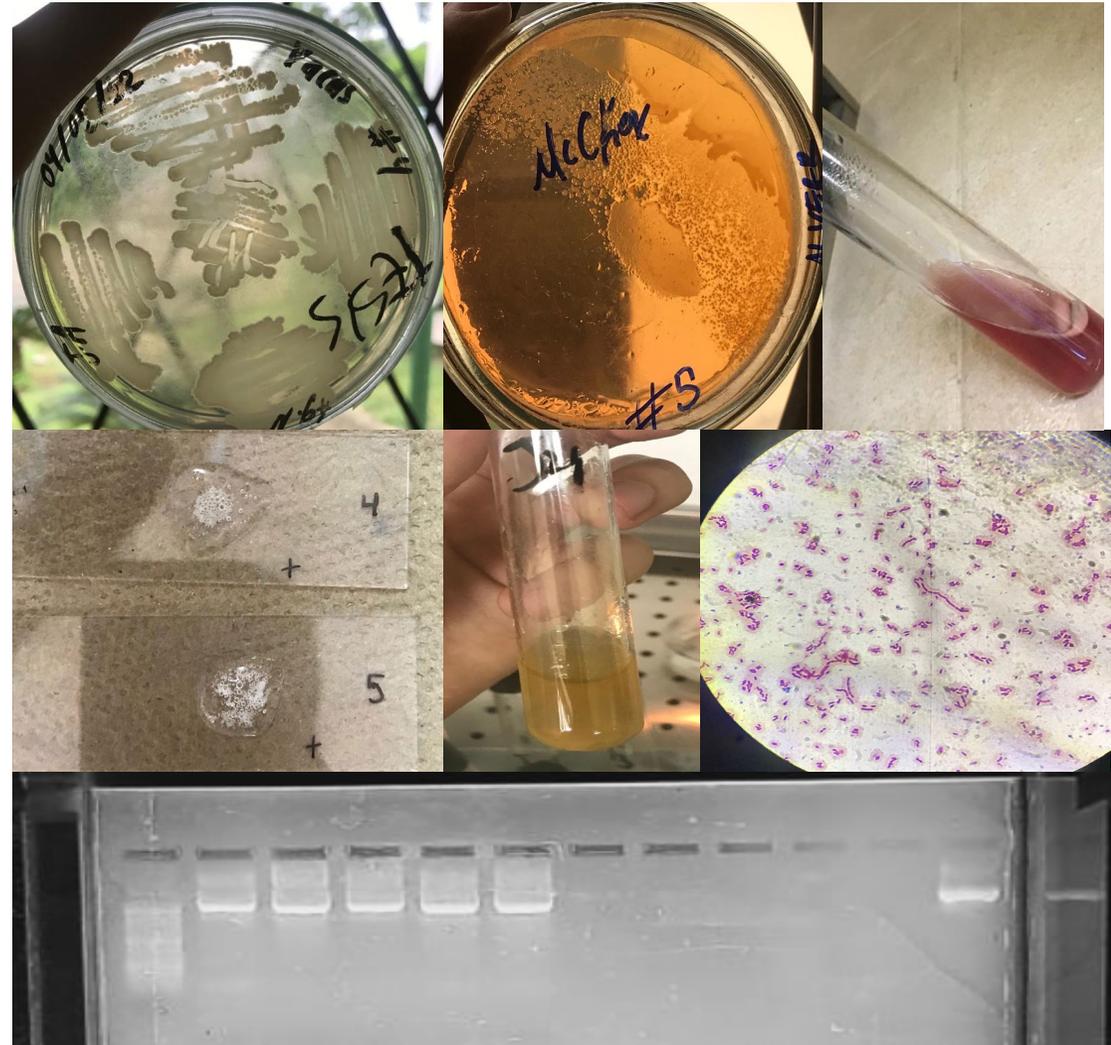


# METODOLOGÍA

## Análisis microbiológicos, bioquímicos y moleculares

### Hipótesis

- **Hipótesis nula ( $H_{0_1}$ ):** 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 alternativa ( $H_{a_1}$ ):** Existen enterobacterias en los desechos de aguas residuales provenientes de la ganadería de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo.



## Diseño experimental

Nomenclatura de los microorganismos y antibióticos para el análisis estadístico

	Antibiótico (a)	Penicilina (a0)	Gentamicina (a1)	Cefalosporina (a2)	Trimetoprima Sulfametoxazol (a3)
BACTERIA (b)					
<i>Enterobacter sp.</i> (b0)		a0b0	a1b0	a2b0	a3b0
<i>Enterobacter sp.</i> (b1)		a0b1	a1b1	a2b1	a3b1
C+ (b2)		a0b2	a1b2	a2b2	a3b2
C- (b3)		a0b3	a1b3	a2b3	a3b3

**Diseño factorial A(4) x B(4) con tres repeticiones. Total de unidades experimentales: 48**

## Hipótesis

- Hipótesis nula ( $H_{02}$ ): Ningún aislado enterobactérico presentó resistencia frente a los antibióticos estudiados.

- Hipótesis alternativa ( $H_{a2}$ ): Al menos un aislado enterobactérico presentó resistencia frente a los antibióticos estudiados

## Amplificación de ADN bacteriano (subunidad 16s)

16S\_rRNA F (5'– AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3')

16S\_rRNA R (5'– ACGGATACCTTGTACGACTT– 3')

Cebadores propuestos por (Wilbrink, B. et al. 1998)

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

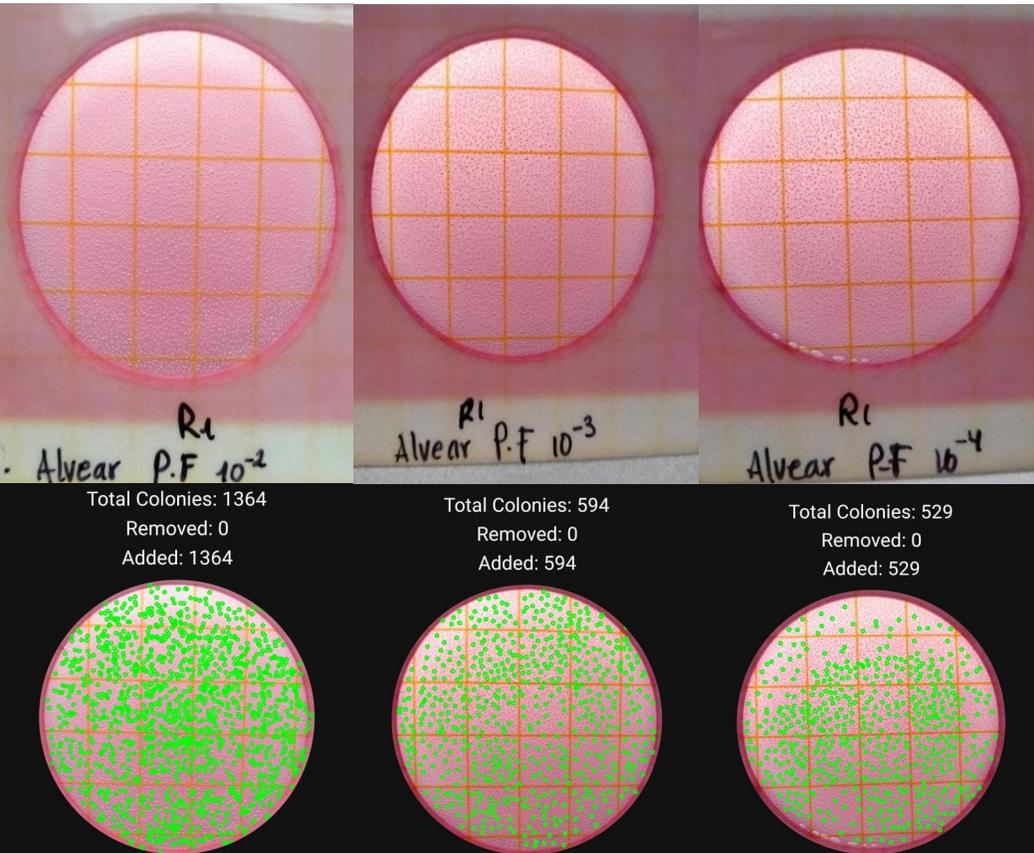
Protocolo de PCR estandarizado por (Howland et al., 2020)

Preparación del mastermix de ADN

Reactivo	Unidad	C. inicial	C. final	Vol. De reacción (uL)(1rxn)	Vol. De reacción (uL)(5rxn)
Agua UP	-	-	-	10,5	52,5
Taq	x	2x	2x	12,5	62,5
Cebador F.	uM	100	10	1	5
Cebador R.	uM	100	10	1	5
ADN	-	-	-	1	5
Total				25	125

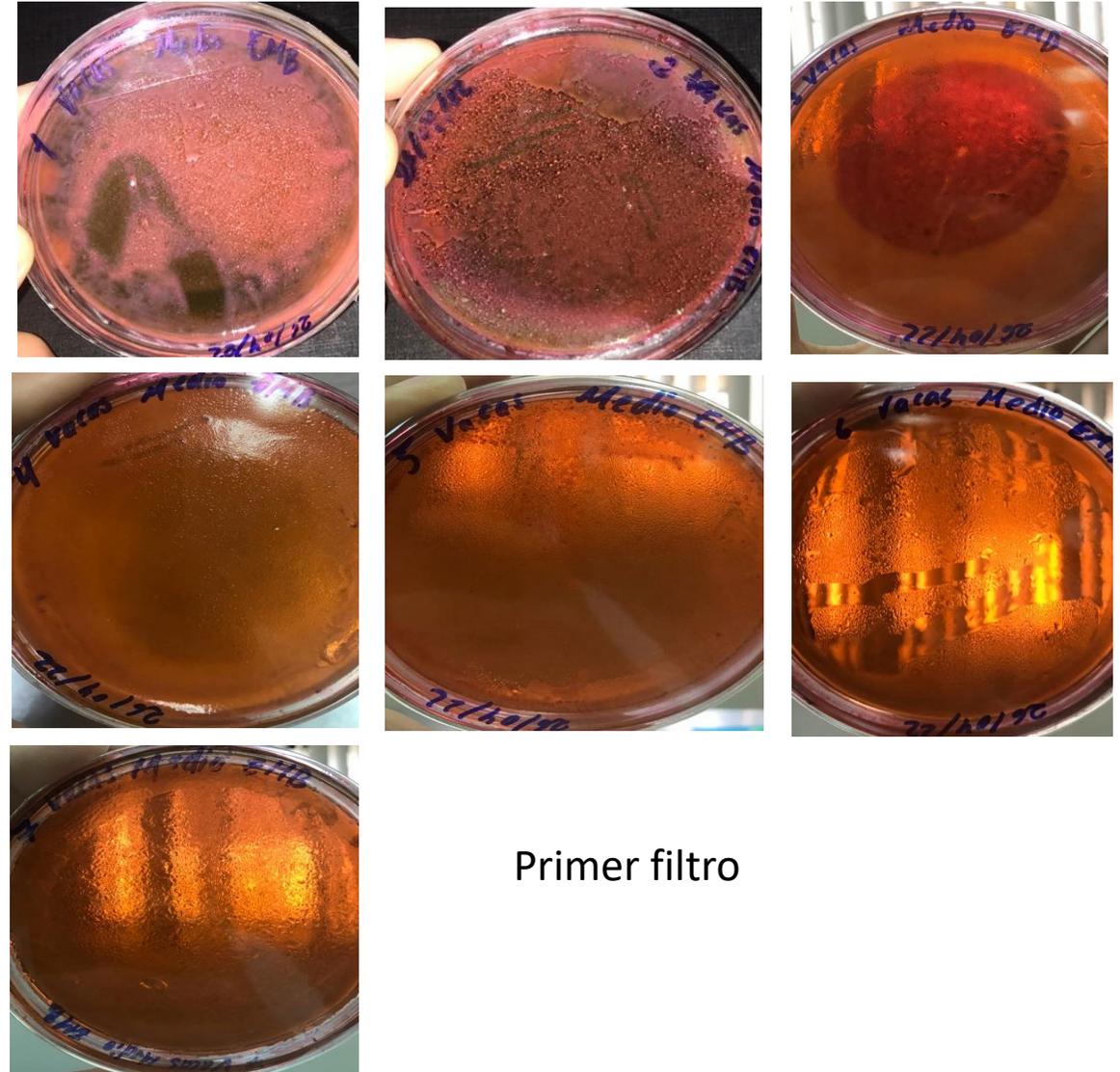
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Petri film y conteo por aplicación



Factor de dilución: (1)  $10^{-2}$  (2)  $10^{-3}$  (3)  $10^{-4}$

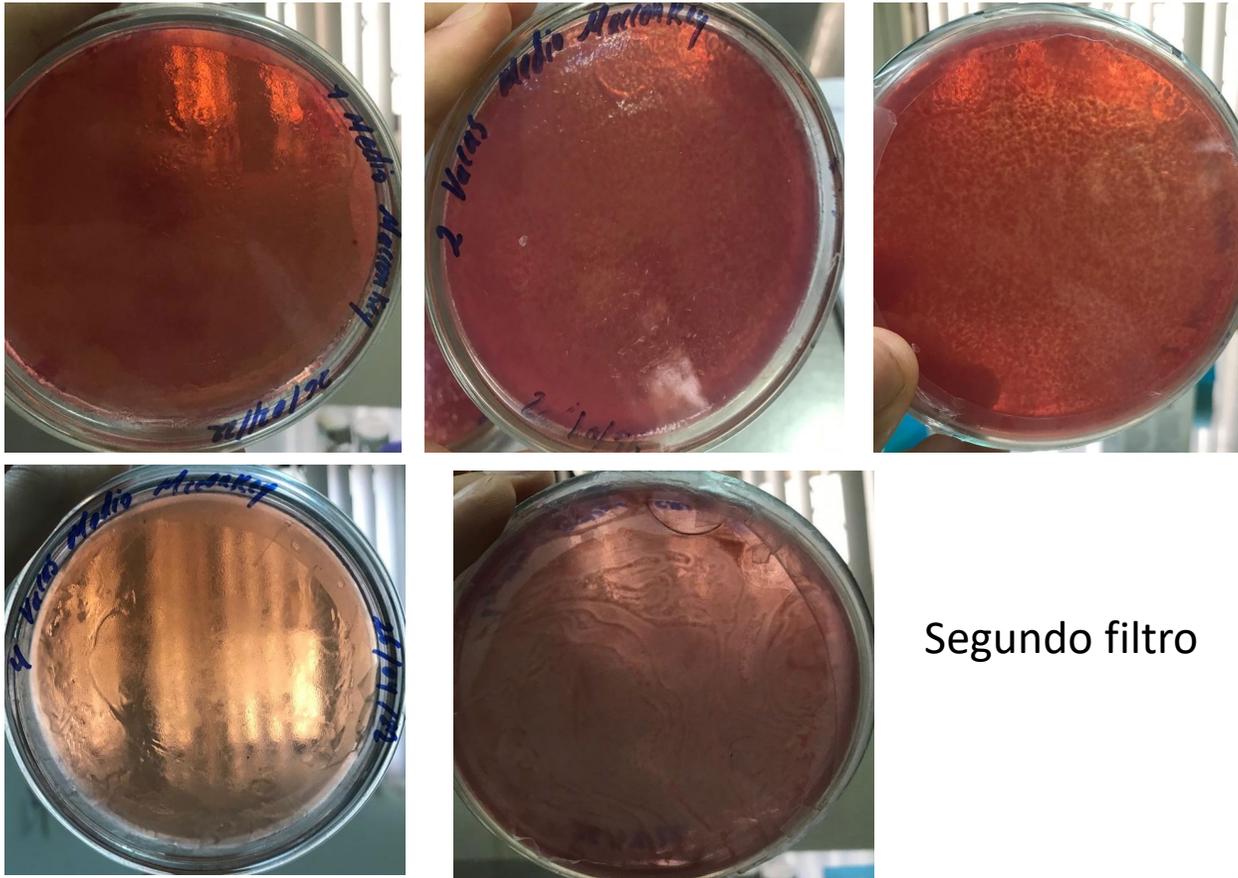
## Segregación por cultivos selectivos: EMB



Primer filtro

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Segregación por cultivos selectivos: MacConkey



Segundo filtro

Del pase de EMB a MacConkey Agar, se descartaron 2 bacterias por no crecer en este medio; descartadas #6 y #7/ El crecimiento en *MacConkey* indica que las bacterias son fermentadoras de lactosa.

## Interpretación 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

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Purificación de cepas en Agar nutriente



Se realizó la purificación en Agar nutriente:

- Para la realización de pruebas bioquímicas
- Para la obtención de un banco

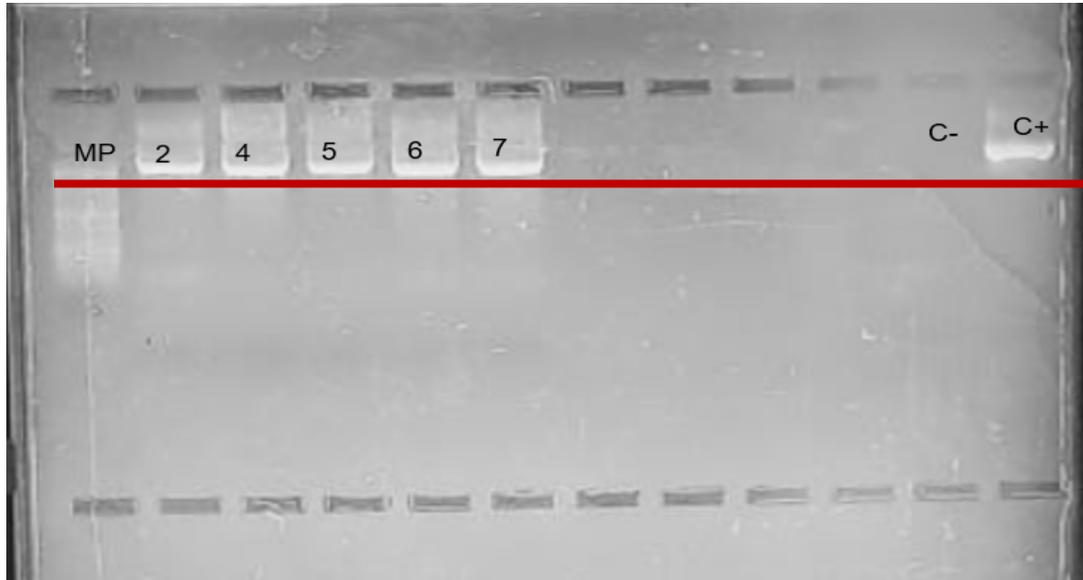


## Pruebas bioquímicas

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 producción de gas (-)	Fermentativa	Negativo	Negativo
Bacteria 5	Positivo	Pico amarillo/Fondo rojo; Fermenta Lactosa (+)	Fermentativa	Negativo	Negativo
Bacteria 6	Positivo	Medio completamente negro; el medio produce ácido sulfhídrico	Oxidativa	Positivo	Negativo
Bacteria 7	Positivo	Pico rojo/fondo rojo; Presenta líquido blanquesino en la superficie; no fermenta azúcares	Fermentativa	Positivo	Negativo

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

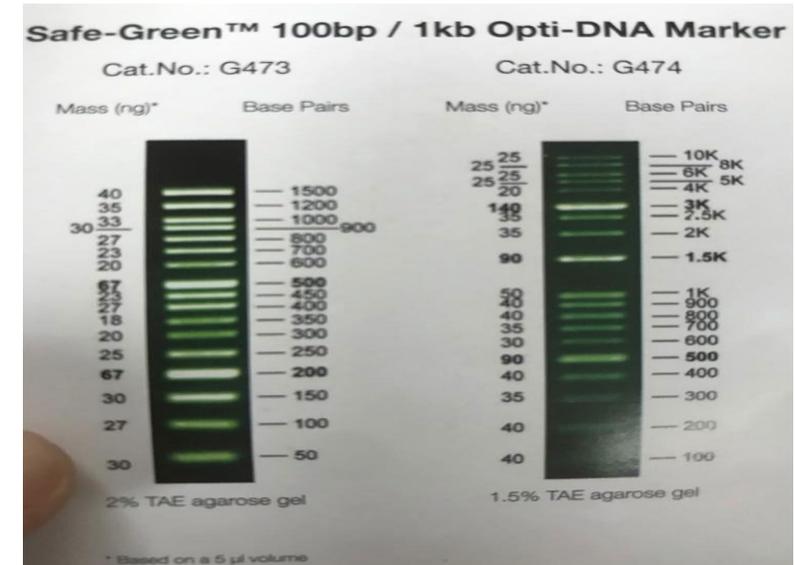
## Amplificación de ADN bacteriano



1500 pb

La amplificación del 16s de bacterias, una macromolécula de región conservada en bacterias, se utilizó una adaptación de los cebadores propuestos por (Wilbrink, B. et al. 1998).

La generación de un cebador generalizado es con la finalidad de identificar la parte más conservada del ADN bacteriano, en este caso *rrs* o *16s* que se trata de una región de 1,500pb. En dependencia de los cebadores utilizados y la posición del que se extraigan se pueden generar fragmentos de hasta 1,500pb (todo el 16s) o un fragmento parcial de 500 pb (Barrett et al., 2020).

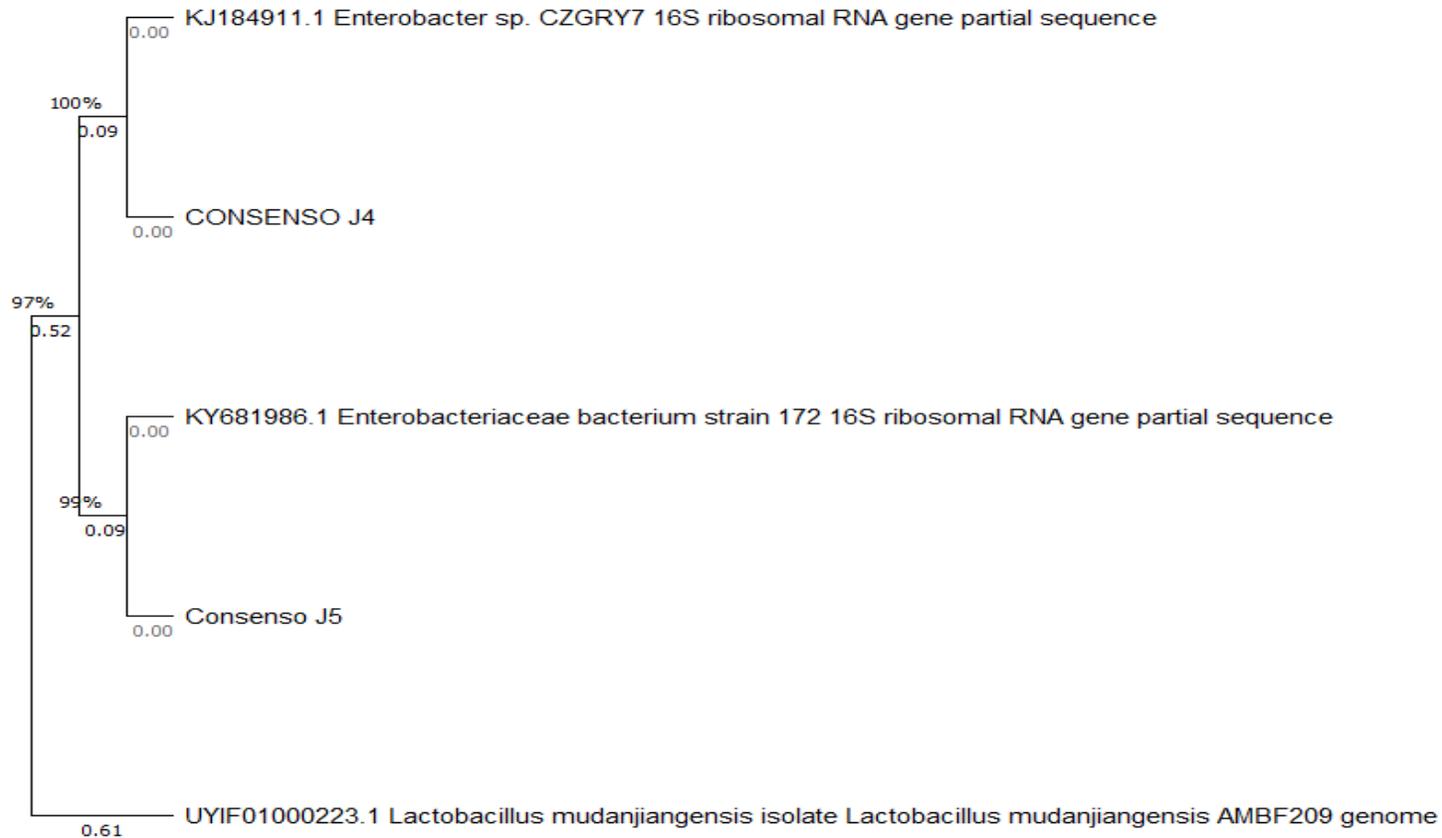


*Safe green*™ – Marcador de peso molecular para la identificación del tamaño de fragmento obtenido.

Una región más específica que otra.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis filogenético



Se observó que las distancias entre los aislados obtenidos y los microorganismos moldes es  $< 1\%$  y su porcentaje de similitud de entre secuencia es del  $> 97\%$ . El modelo de máxima similitud evidencia el agente externo con un diferencia del **70%**. (Patel, J., 2001)

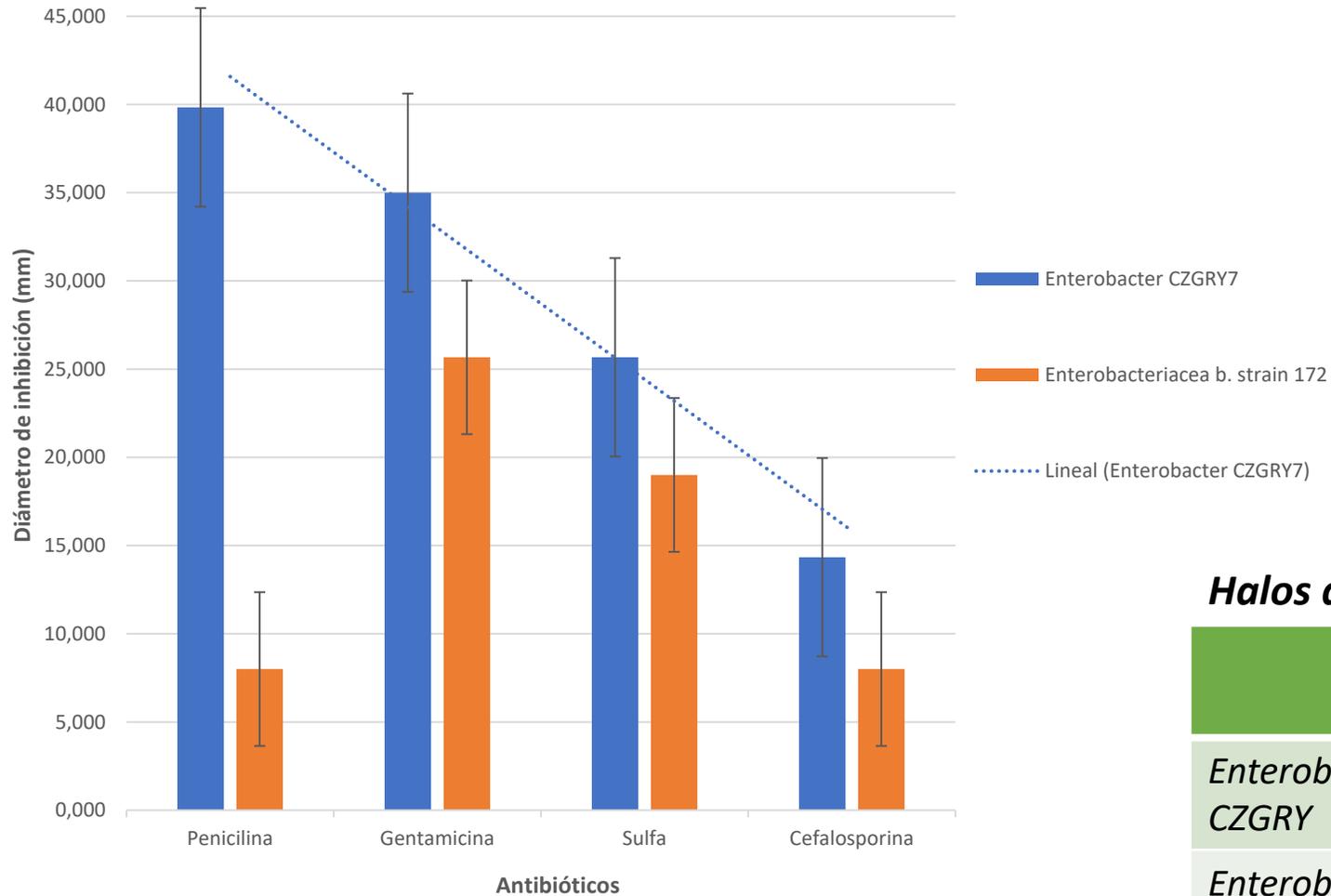
El método de máxima verosimilitud juntamente con el modelo Tamura-Nei, utilizado por *MEGA X (MEGAX, 2016, Evolutionary Probabilities)* permite inferir la historia evolutiva de un organismo Duchen, P. (2021).

<b>Bacteria 4</b>	>J4_16S_RrnaF	>J4_16S_rRNAR	>KJ184911.1 <i>Enterobacter sp.</i> CZGRY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<b>Bacteria 5</b>	>J5_16S_RrnaF	>J5_16S_rRNAR	>KY681986.1 <i>Enterobacteriaceae bacterium</i> <i>strain 172</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

*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.

*Enterobacteriaceae Bacterium strain 172*, es un cultivo sin clasificar dentro de las *Enterobacterias* según (Schoch CL, 2020).

## Análisis de sensibilidad antibiótica



### Datos de inhibición referente

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
<b>P(G)</b>	11<	12-21	>22
<b>CN</b>	12<	13-16	17<
<b>SXT</b>	10<	11-15	19<
<b>CL</b>	14<	15-17	18<

### Halos de inhibición

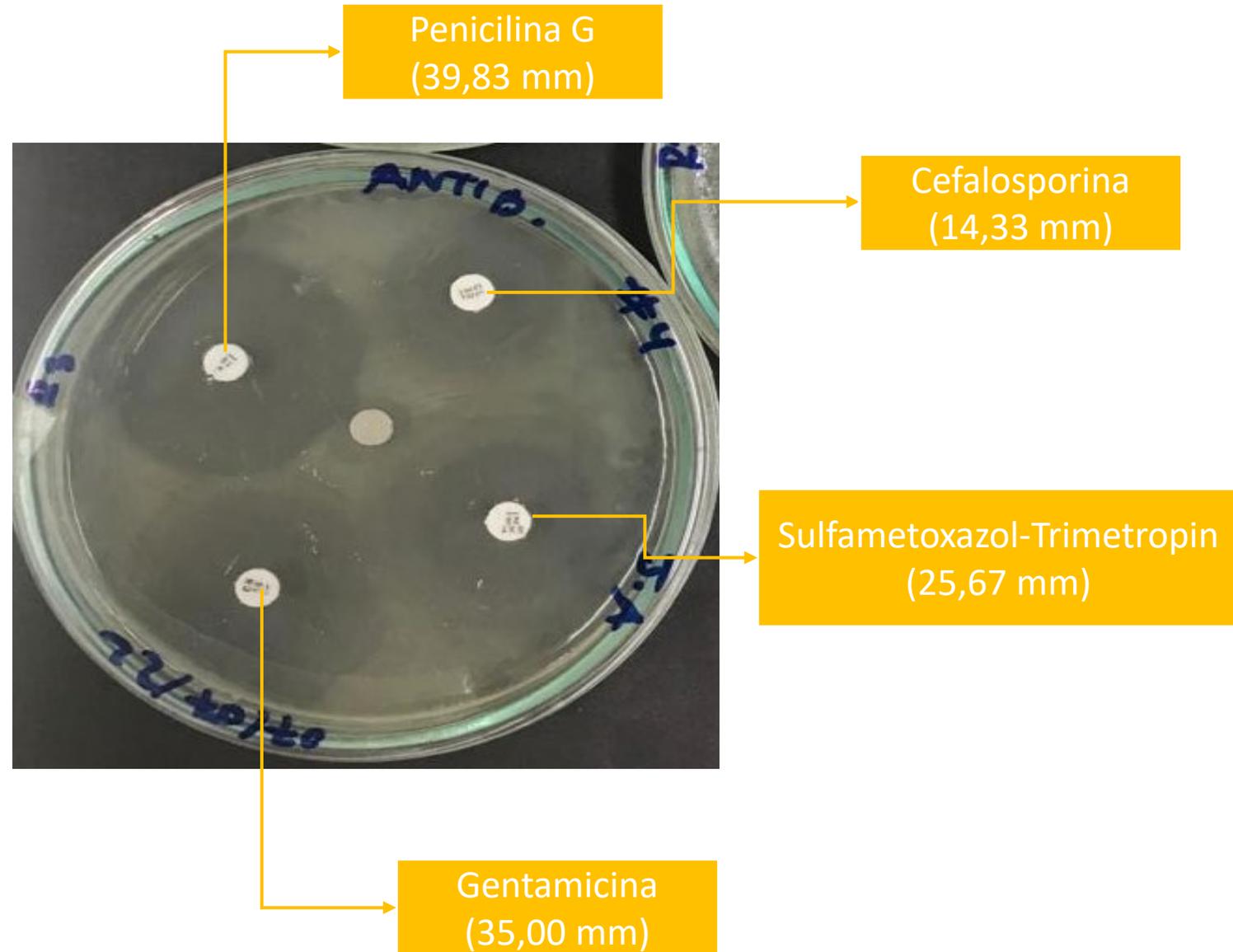
	Penicilina	Gentamicina	SxT	Cefalosporina
<i>Enterobacter CZGRY</i>	39,83	35,00	25,67	14,33
<i>Enterobacteriaceae b. Strain 172</i>	8,00	25,67	19,00	8,00

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## *Enterobacter CZGRY*

La resistencia de las enterobacterias se da por sus enzimas  $\beta$ -lactámicas que degradan Penicilina, asociada con la degradación de pseudomonas; degradadoras de cefalosporinas de 3ra generación. Esto gracias a dos tipos de genes *blaACT* y *blaMIR*.

Esto se evidencia en el trabajo realizado por (Partridge, S. R., 2015), en *Enterobacter asburiae* y *cloacae*.

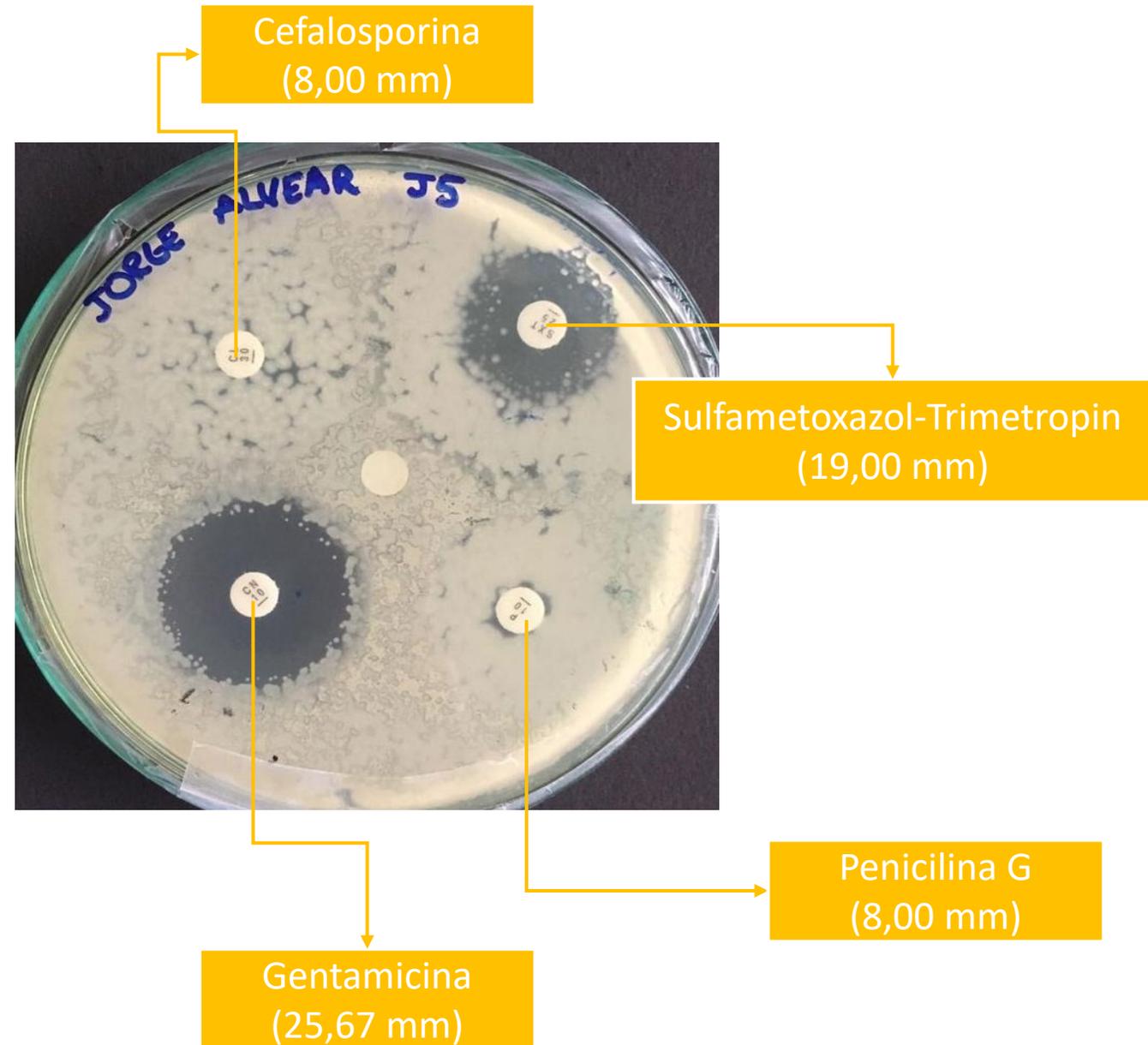


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

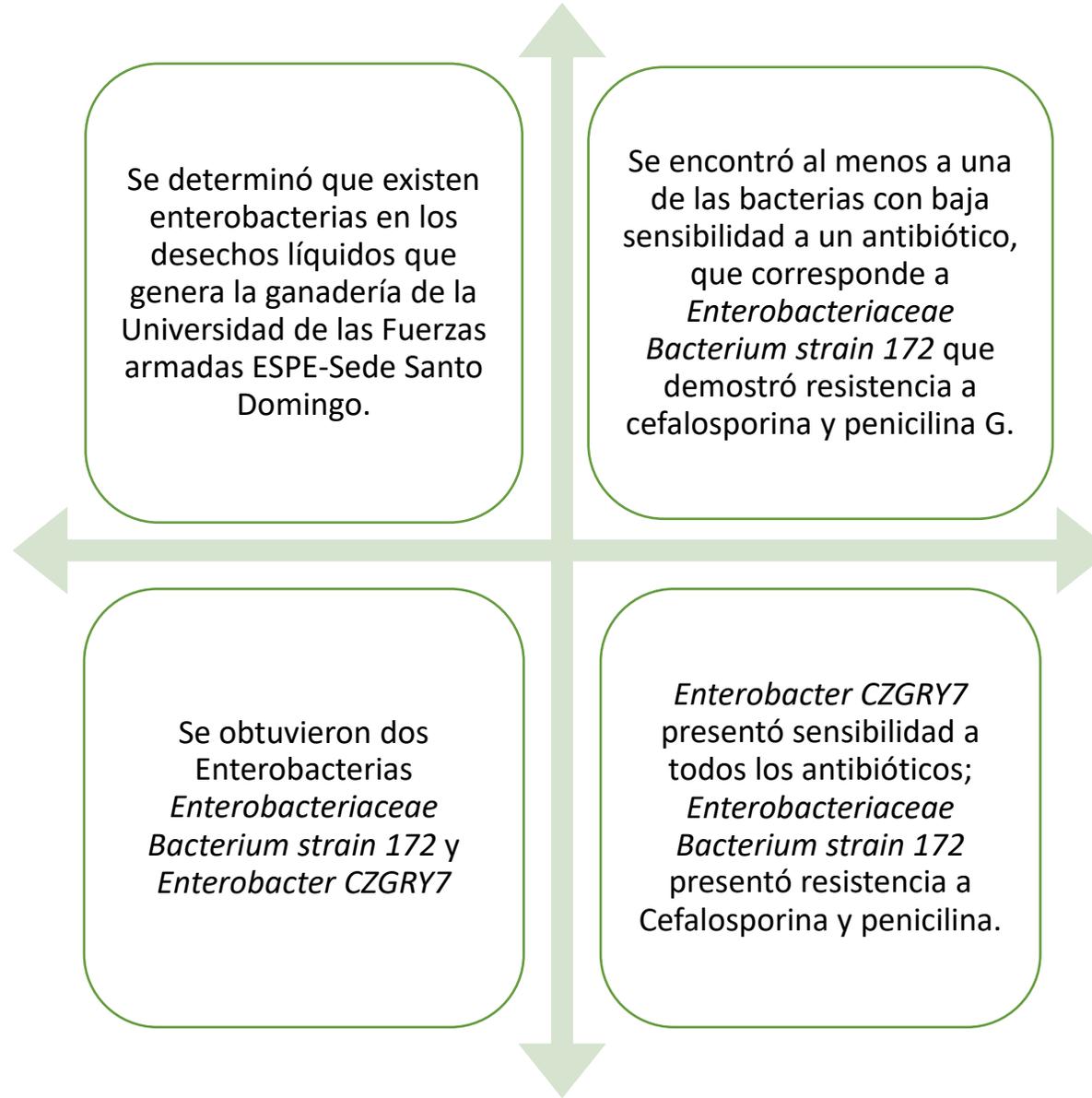
## *Enterobacteriaceae b. Strain 172*

El gen *blaMIR* es un elemento móvil que se ubica en la clasificación de secuencias de inserción (*IS*), denominado *ISCR* el cuál está datado que se transpone en el ADN por el mecanismo de círculo rodante (síntesis de plásmidos) tomado de (*Partridge, S. R., 2015*). Este gen la clasifica como una bacteria resistencia APP (anti-pseudomonal Penicillins) que es un inhibidor de  $\beta$ -lactámicos; confiere resistencia a 3GC (Third-generation of cephalosporin)

También, *Enterobacteriaceae b. Strain 172* no se encuentra, aún, clasificada dentro de un género del las *Enterobacteriaceae sp.*



# CONCLUSIONES



# ***RECOMENDACIONES***

## **Antibiograma**



Con respecto a la inhibición se recomienda realizar más enfrentamientos para tener una base de datos de resistencia para *Enterobacter CZGRY7* y *Enterobacteriaceae b. Strain 172*.

## **Extracción de ADN**



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

## **Efluente**



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.

# ***AGRADECIMIENTOS***

A Sandra Naranjo.

A Armando Reyna, Jaffer Gooty, Santiago Ulloa

A Katty Medina, Mariela Valdivieso, Vanessa Armijos .

A Kevin C., Mateo B., Hugo A., Jorge C., Brandon C. Jefferson J.,

Johnny M., y Harrison D.

A mi familia

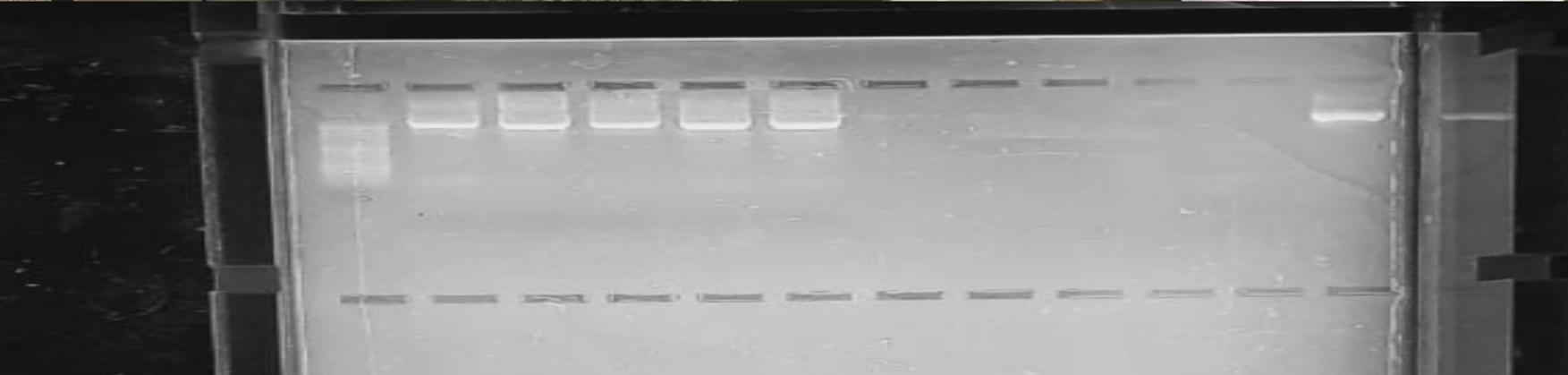
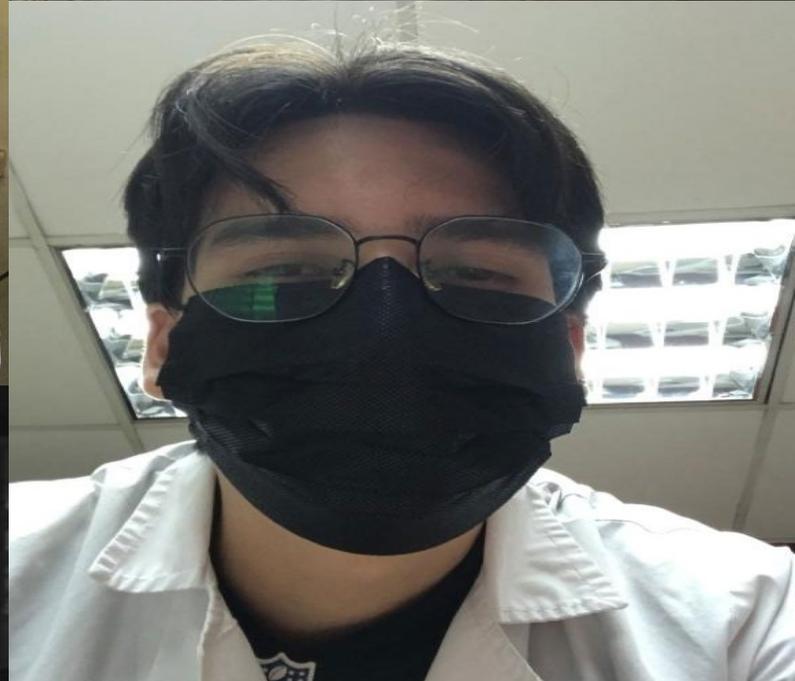
A Martha Calderón, quién fue mi apoyo incondicional y a Juan

Fernando Alvear, por apoyar el cumplimiento de mi meta.

A quien me brindó su ayuda

**¡Muchas gracias!**





***¡MUCHAS GRACIAS!***