



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**  
**MEDICINA VETERINARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

---

**ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE *ESCHERICHIA COLI BLEE* EN EL  
PROCESO DE COMPOSTAJE DEL ESTIÉRCOL DE GANADO BOVINO  
COMPOSTADO EN UNA HACIENDA LECHERA EN QUITO – ECUADOR**

---

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médicos  
Veterinarios y Zootecnistas

**Autores:**

Mesa Montalvo Edwin Fernando  
Valencia Valarezo Jason Alexander

**Tutor:**

Molina Cuasapaz Edie Gabriel MVZ. Mtr.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Marzo 2022**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

**Edwin Fernando Mesa Montalvo** con cédula de ciudadanía No. **1003293121**; y, **Jason Alexander Valencia Valarezo**, con cédula de ciudadanía No. 1805737861; declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: “**Análisis de la presencia de *Escherichia. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador**”, siendo el **Médico Veterinario y Zootenista Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz**, Tutor del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 25 de marzo del 2022

Edwin Fernando Mesa Montalvo  
Estudiante  
CC: 1003293121

Jason Alexander Valencia Valarezo  
Estudiante  
CC: 1805737861

MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz  
Docente Tutor  
CC: 1722547278

## **CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR**

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **MESA MONTALVO EDWIN FERNANDO** identificado con cédula de ciudadanía **1003293121** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** – **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina veterinaria titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**Análisis de la presencia de *Escherichia. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Abril 2017 - Agosto 2017

Finalización de la carrera: Octubre 2021 – Marzo 2022

Aprobación en Consejo Directivo. - 07 de enero del 2022

Tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

Tema: “Análisis de la presencia de *Escherichia coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador”

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de

investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 25 días del mes de marzo del 2022.

Edwin Fernando Mesa Montalvo

**EL CEDENTE**

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez

**LA CESIONARIA**

## **CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR**

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **VALENCIA VALAREZO JASON ALEXANDER**, identificado con cédula de ciudadanía 1805737861 de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**Análisis de la presencia de *Escherichia. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Abril 2017 - Agosto 2017

Finalización de la carrera: Octubre 2021 – Marzo 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 07 de enero del 2021

Tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

Tema: “Análisis de la presencia de *Escherichia coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador”

**CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- f) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- g) La publicación del trabajo de grado.
- h) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- i) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- j) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia,

la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 25 días del mes de marzo del 2022.

Jason Alexander Valencia Valarezo

**EL CEDENTE**

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez

**LA CESIONARIA**



## **AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

**“Análisis de la presencia de *Escherichia. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador”**, de Mesa Montalvo Edwin Fernando y Valencia Valarezo Jason Alexander, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 25 de marzo del 2022

MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

**DOCENTE TUTOR**

CC: 1722547278

## **AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Mesa Montalvo Edwin Fernando y Valencia Valerezo Jason Alexander, con el título del Proyecto de Investigación: “**Análisis de la presencia de *Escherichia coli* BLEE en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador**”, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 25 de marzo del 2022

### **Lector 1 (Presidente)**

MVZ. Mg. Cristian Fernando Beltrán  
CC: 0501942940

### **Lector 2**

MVZ. Mtr. Vanessa Herrera Yunga  
CC: 1103758999

### **Lector 3**

MVZ. Mg. Byron Andrés Valencia  
CC: 1719622647

## **AGRADECIMIENTO**

Esta tesis y nuestra formación profesional primeramente se la debemos, a nuestros docentes que han sido nuestros guías desde el primer día y han sido el pilar fundamental en el proceso para obtención de nuestro título universitario.

A nuestro tutor por el tiempo dedicado, su ayuda y los conocimientos brindados a lo largo de esta investigación.

A nuestros padres por la vida y por enseñarnos a vivirla, dándonos siempre un apoyo y consejos que hasta el día de hoy nos ha sido de mucha ayuda y, por último, pero no menos importante a todos nuestros familiares y amigos que han estado brindándonos su ayuda hasta los últimos momentos.

Jason Alexander Valencia Valarezo

Edwin Fernando Mesa Montalvo

### **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada especialmente a mi madre quien ha sido mi más grande apoyo en mis formación académica y profesional, a mi familia por siempre alentarme de igual forma a mis maestros, tutor y demás personas que me han ofrecido su ayuda en momentos difíciles.

Edwin Mesa

Quiero dedicarle este proyecto de investigación, a toda mi familia: a mi mamá, mis abuelitos y a mi tío, muchas gracias por el apoyo incondicional, los buenos consejos y enseñarme que el esfuerzo y la constancia, traen buenos resultados y opciones a la vida.

En este mismo aspecto quiero agradecer a todos los docentes quienes nos compartieron sus experiencias y conocimientos en todo este tiempo, permitiéndome entender que el trabajo duro atrae buenos resultados.

Jason Valencia

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO:** Análisis de la presencia de *Escherichia coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador

**Autores:** Mesa Montalvo Edwin Fernando  
Valencia Valarezo Jason Alexander

**RESUMEN**

El mal uso de antibióticos ha generado un catastrófico problema mundial, como es la resistencia a los antimicrobianos (RAM), causando graves problemas al sistema de salud, ya que los medicamentos usados para enfermedades de alta prioridad están siendo inefectivos, y en parte se atribuye a la producción pecuaria.

Se cultivaron 7 placas con Agar TBX y 7 con TBX+Ceftriaxona (CRO), donde se obtuvo crecimiento bacteriano, llevándolas a cuantificación y evidenciando crecimiento incontable en el p1 (Fase mesofílica), con 1000000 UFC *E. coli/g* en TBX, y TBX+CRO obtuvo 200 UFC *E. coli/g*, p2 ( Fase Termofílica) se manifestó un bajo crecimiento con 170 UFC *E. coli/g* en TBX, y TBX+CRO obtuvo 0, y en p3 ( Fase de maduración o enfriamiento) obtuvo 335063,3 UFC *E. coli/g* en TBX y con TBX+CRO 73,3 UFC *E. coli/g*.

En la evaluación de sensibilidad y resistencia se realizó un antibiograma determinando un 71.4% de sensibilidad y 28.6% de resistencia a *Escherichia coli BLEE* evaluados con los parámetros de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

La genotipificación mostró existencia de genes CTX-M 1, CTX-M 2 Y CTX-M-8 por lo tanto los resultados de este estudio muestran que, sí se obtuvo la presencia de *E. coli BLEE* en el proceso de compostaje.

Concluyendo que la RAM está presente, aunque en poca cantidad, pero va en aumento, ya que se obtuvo bacterias resistentes en todos los puntos, el antibiograma mostró resistencia a 6 antimicrobianos de 21 testeados, junto con sensibilidad dependiente e intermedia, mientras que la genotipificación mostro presencia de genes CTX-M.

**PALABRAS CLAVES:** Compostaje, Multirresistencia, PCR, Cuantificación, Resistencia a antimicrobianos, Antibiograma.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

**Analysis of the presence of *Escherichia coli BLEE* in the composting process of composted bovine cattle manure at a dairy farm in Quito - Ecuador**

**AUTHORS:** Mesa Montalvo Edwin Fernando  
Valencia Valarezo Jason Alexander

**ABSTRACT**

The misuse of antibiotics has generated a catastrophic global problem, such as antimicrobial resistance (AMR), causing serious problems to the health system, as the drugs used for high priority diseases are providing ineffective, and this is partly attributed to livestock production.

7 plates were cultivated with Agar TBX and 7 with TBX+Ceftriaxone (CRO), where bacterial growth was obtained, leading them to quantification and evidencing countless growth in p1 (mesophilic phase), with 1000000 CFU *E. coli*/g in TBX, and TBX+CRO obtained 200 CFU *E. coli*, p2 (Thermophilic Phase) showed low growth with 170 CFU *E. coli*/g in TBX, and TBX+CRO obtained 0, and in p3 (Maturation or cooling phase) obtained 3350633.3 CFU *E. coli*/g in TBX and with TBX+CRO 73.3 CFU *E. coli*/g.

In the sensitivity and resistance evaluation, an antibiogram was carried out determining 71.4% sensitivity and 28.6% resistance to *Escherichia coli BLEE* evaluated with CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) parameters.

Genotyping showed the existence of CTX-M 1, CTX-M 2, and CTX-M-8 genes; therefore, the results of this study show that the presence of *E. coli BLEE* was obtained in the composting process.

The conclusion is that AMR is present, although, in small quantities, it is increasing since resistant bacteria were obtained at all points. The antibiogram showed resistance to 6 antimicrobials out of 21 tested, along with dependent and intermediate sensitivity, while genotyping showed the presence of CTX-M genes.

**KEYWORDS:** Composting, Multi-resistance, PCR, Quantification, Antimicrobial resistance, Antibiogram.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	vi
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	ix
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	x
AGRADECIMIENTO .....	xi
DEDICATORIA.....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. PROBLEMÁTICA .....	4
4. OBJETIVOS: .....	8
4.1. General .....	8
4.2. Específicos.....	8
5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	8
5.1. Directos: .....	8
5.2. Indirectos:.....	8
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTADOS.....	9
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	10
7.1. Resistencia Antimicrobiana Historia .....	10
7.2. Mecanismos de Resistencia .....	11
7.2.1. Plásmidos:.....	12
7.2.2. Trasposones: .....	12
7.2.3. Integrones y casetes genéticos .....	12
7.3. Tipos de Resistencia .....	12

7.3.1.	Resistencia natural o intrínseca. - .....	12
7.3.2.	Resistencia Adquirida. - .....	13
7.4.	Manejo de desechos en las Granjas .....	13
7.5.	Contaminación en el suelo, agua, aire.....	15
7.5.1.	Suelo.....	15
7.5.2.	Agua .....	16
7.5.3.	Aire.....	16
7.6.	Compostaje .....	17
7.6.1.	Condiciones iniciales .....	18
7.6.1.1.	Humedad:.....	18
7.6.1.2.	Porosidad: .....	19
7.6.1.3.	Relación Carbono/ Nitrógeno (C/N): .....	19
7.6.2.	Fases del Compostaje.....	19
7.6.2.1.	Fase Mesofílica.....	19
7.6.2.2.	Fase Termófila o de Higienización .....	20
7.6.2.3.	Fase termofílica extrema .....	20
7.6.2.4.	Fase de enfriamiento y maduración .....	21
7.7.	Técnicas Genómicas de identificación de bacterias .....	22
7.7.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (RCP): .....	22
7.7.2.	Secuenciación del genoma: .....	22
7.7.2.1.	Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS): .....	23
7.7.2.2.	Pirosecuencia.....	23
7.7.3.	Hibridación de sondas de ADN.....	23
7.7.1.	Polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD).....	24
7.7.2.	RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción).....	24
7.8.	El compostaje en la RAM.....	24
8.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS .....	25
9.	INSTRUMENTAL .....	25
10.	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
10.1.	Trabajo de campo.....	26
10.2.	Trabajo de Laboratorio .....	26
10.2.1.	Cuantificación.....	26
10.2.2.	Antibiogramas.....	27
10.2.3.	Análisis bla <sub>CTX-M</sub> .....	29
11.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	30



12. IMPACTOS (TÉCNICOS, AMBIENTALES O SOCIALES).....	37
12.1. Impacto Técnico.....	37
12.2. Impacto Ambiental.....	37
12.3. Impacto Social.....	37
13. PRESUPUESTO PARA LA PROPUESTA DEL PROYECTO .....	38
14. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
16. ANEXOS .....	50

### Índice de Tablas

Tabla N°1: Investigaciones de la RAM en el Mundo y Latinoamérica .....	6
Tabla N°2: Investigaciones de la RAM en animales de producción en Sud América. ....	6
Tabla 3: Antibióticos usados.....	27
Tabla 4: Parámetros de susceptibilidad.....	28
Tabla 5: Protocolos PCR múltiple de identificación de la familia génica <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	30
Tabla 6: Cuantificación de las Muestras con y sin Ceftriaxona. ....	31
Tabla 7. Sensibilidad y Resistencia de <i>E. coli</i> . ....	33
Tabla 8: Cuantificación de Bacterias con TBX y TBX +CRO .....	54

### Índice de Figuras

Figura 1: Antibióticos resistentes a <i>Escherichia coli</i> BLEE.....	34
Figura 2: Identificación molecular del CTX-M.....	35
Figura 3: Recolección de Muestras.....	54
Figura 4: Preparación del Agar TBX para cultivos.....	55
Figura 5: Dilución de Muestras .....	55
Figura 6: Cultivos Bacterianos en Agar TBX con y sin antibiótico. ....	56
Figura 7: Filtración de diluciones en filtro nanopore .....	56

Figura 8: Crecimiento de las bacterias Escherichia coli. ....	56
Figura 9: Repique de Colonias y sembrado en nuevas placas .....	57
Figura 10: Cultivos puros .....	57
Figura 11: Raspado de colonias y cultivado a tubos eppendorf con TE y Soja Tréptica.57	
Figura 12: Tubos eppendorf con colonias y extracción de ADN .....	58

### ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°1. Aval de Traducción.....	50
Anexo N° 2 Hoja de vida Docente.....	51
Anexo N° 3. Hoja de Vida Estudiantes 1 .....	52
Anexo N°4. Hoja de Vida Estudiante 2.....	53
Anexo N° 5 Tabla de Cuantificación .....	54
Anexo N° 6 Trabajo de Campo y Laboratorio .....	54

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

**Título del Proyecto:** Análisis de la presencia de *Escherichia coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador

**Fecha de inicio:** Mayo 2021

**Fecha de finalización:** Marzo 2022

**Lugar de ejecución:**

Barrio Santa Clara, parroquia La Ecuatorina, cantón Quito, provincia Pichincha, zona 3

**Unidad Académica que auspicia**

LSI-EC Life Science Initiative

**Carrera que auspicia:**

Medicina Veterinaria

**Proyecto de investigación vinculado:**

Resistencia Antimicrobiana con enfoque de una sola salud.

**Equipo de Trabajo:**

Edwin Fernando Mesa Montalvo- Jason Alexander Valencia Valarezo

**Área de Conocimiento:**

Agricultura y Ganadería

**Línea de investigación:**

Desarrollo y Seguridad Alimentaria

**Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Microbiología, parasitología, Inmunología y Sanidad animal

Estudios de resistencia a agentes antimicrobianos de microorganismos patógenos

## 2. JUSTIFICACIÓN

La entidad encargada de la salud mundial (OMS) reconoció a la resistencia antimicrobiana (RAM) como uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud en este siglo al constituirse como amenaza para la salud del mundo. La producción animal es el mayor responsable de la diseminación de la resistencia antimicrobiana en el ambiente (1). Dicha resistencia es causada en su mayoría por el uso de promotores de crecimiento (2), los cuales son dosis subterapéuticas de los antimicrobianos (2), cuyo efecto es la selección de bacterias resistentes en el medio.

Es así como Merino L. (3) sugiere que la sensibilidad de las especies del género a los antibióticos ha evolucionado en los últimos años debido a la fuerte presión selectiva impuesta por el uso irracional de estos medicamentos. Este fenómeno se ha reflejado en el aumento del número de enfermedades causadas por cepas resistentes.

Así mismo, la RAM ocasiona pérdidas al frágil sistema de salud pública de nuestro país realmente considerables además de las vidas humanas que cobra. De seguir con esta tendencia para el año 2050 será el principal efecto que cause decesos en todo el mundo (4), y la repercusión económica alcanzará cifras superiores al producto interno bruto del país. Provocando una reducción del 2% al 3,5%, costándole al mundo hasta 100 billones de dólares (4).

Sin embargo, existe una idea generalizada de que la utilización de productos orgánicos es una alternativa ideal para conservar el ambiente. No obstante, es necesario analizar a través de las tecnologías desarrolladas hasta el momento como la genómica, la verdadera implicación de la utilización de compost en la dinámica en la resistencia antimicrobiana.

Por lo tanto, es necesario encaminar todas las estrategias posibles a nivel interinstitucional para combatir este problema.

Por ejemplo, los jefes de estado en la Asamblea de las naciones unidas en el 2016 (5) abordaron las causas profundas de la RAM en diferentes sectores de producción y de salud, implementando planes de acción en contra de la RAM como semanas de concientización, grupos de vigilancia, investigación y coordinación sobre la RAM.

Desde un enfoque de una “sola salud” el evitar contaminar los cuerpos de agua en las explotaciones pecuarias, por un lado, garantizar la seguridad alimentaria y evitar el mayor número de muertes ocasionadas por la RAM.

Posiblemente, al disminuir las contaminaciones de agua en las distintas explotaciones pecuarias, logramos una reducción significativa en la proliferación de patógenos resistentes a los antimicrobianos, de tal motivo que las bacterias que causan un elevado número de muertes al año van a parar, debido al tratamiento de compost que se va a emplear para el tratamiento de los desechos orgánicos.

Por tal motivo, los alimentos que son regados por los cuerpos de agua vecinos de granjas que crían animales, en especial bovinos, obtendrán un nivel más inocuo en sus producciones, por efecto del tratamiento que se les da a los desechos, así se asegurará una eficacia de tratamientos en el sector de salud ante cualquier infección bacteriana común, que ha sido causa de muerte en los últimos años por el efecto negativo de la RAM.

Por otra parte, es de vital importancia generar conciencia y concientizar a nuestro país y al mundo, en especial a las personas encaminadas y dedicadas a la producción alimenticia y pecuaria, que la RAM constituye una gran problemática que necesita ser tratada con una acción inmediata, ya que debemos cambiar de forma urgente, la manera de prescribir y dosificar antimicrobianos. Por esta razón, la creación y el descubrimiento de nuevos antibióticos no será la solución para contener la RAM, si la conducta mental de la sociedad no cambia (6) y se establecen protocolos estrictos en el área de salud, enfocado a la producción de alimentos, producción pecuaria, dosificación-prescripción de antibióticos.

La correcta realización del diagnóstico presuntivo y definitivo, es otro de los comportamientos actuales que se deben cambiar y reestructurar. Ya que, la equivocación en el diagnóstico, puede conllevar a la dosificación de un antimicrobiano incorrecto. Y, por tanto, llevar a las células a un proceso de selección adaptiva donde las que contengan en su material genómico genes con resistencia terminan colonizando a toda la molécula, debido a que el efecto bactericida y/o bacteriostático no afecta a la población con resistencia sino a la sensible, conllevando a que la molécula sea colonizada por la población resistente y esta a su vez replicándose una y otra vez.

Sin embargo, considerando todo el tiempo que estos microorganismos han estado latentes, es muy probable que hayan entrado en contacto con antimicrobianos naturales mucho antes que el hombre los descubriera, favoreciendo de esta manera la aparición de la RAM a través de un proceso adaptativo natural que adquirió a través de su evolución, limitando el uso de antimicrobianos por el hombre como una forma de poner en evidencia, acelerar o promover microorganismos.

Visto de esta manera, el uso de antimicrobianos debe seguir un protocolo estricto, en el cual su finalidad sea mantener y proteger la efectividad de estos fármacos, mediante una correcta prescripción y dosificación de los mismos. Para ello es necesario, entender que los antimicrobianos mientras más se utilicen durante un tiempo determinado y/o prolongado estos pierden su efectividad. Asimismo, otra de las estrategias para prevenir y disminuir la RAM, es precisamente el proceso de compostaje, el cual, a través del aumento de la temperatura durante varias fases, permite la eliminación de patógenos. Debido a esto, establecer un protocolo para compostar estiércol en explotaciones ganaderas en similares condiciones, favorecería en gran medida a los emprendedores encaminados a la ganadería bovina, ya que se establecerá una fórmula para realizar un correcto proceso de compostaje con la finalidad de eliminar cualquier rastro de microorganismos patógenos.

Por lo cual esta investigación analizara la resistencia antimicrobiana que se dan en el proceso de compostaje de residuos orgánicos de una hacienda lechera.

### **3. PROBLEMÁTICA**

La RAM perjudica en gran magnitud a la salud Pública de todo el mundo, se estima que a nivel mundial mueren alrededor de 700.000 personas al año (7), debido a la excesiva e inadecuada forma de utilización de fármacos por parte de médicos, granjeros, veterinarios y la población en general. El consumo indiscriminado de antibióticos a nivel mundial es preocupante ya que se disparó casi un 70% entre 2000 y 2010 (8), ocasionando que las opciones terapéuticas para las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes sean cada vez más escasas ya que los patógenos multirresistentes ya no sufren ninguna alteración con el tratamiento farmacológico empleado, debido a que los patógenos que afectan al organismo de los seres vivos han generado una fuerte resistencia ante los distintos fármacos desarrollados para inhibir su multiplicación, ocasionando así que los fármacos sean inútiles ante una infección patógena.

La dispersión de la RAM ocurre por la transmisión de genes que confieren resistencia entre las especies patógenas, a través de los alimentos, el agua, animales y personas. Dicha resistencia, se genera de forma natural o adquirida. Esta última es favorecida por la exposición a los antimicrobianos, a través de procesos bioquímico, como es la mutación de cromosomas, los cuales se van a intercambiar por conjugación lo que refiere a intercambio genético vía plásmidos, transposones e integrones, también por transducción que es el intercambio de ADN entre bacterias y transformación que va hacer la incorporación del material genético modificado de la bacteria, dando como resultado una resistencia a distintos antibióticos sin necesidad de una exposición a estos. Los plásmidos llevan variados genes de RAM, hacia las bacterias, aunque también estos genes son adquiridos por transposones, los cuales son secuencias de ADN móvil que se pueden integrar. Por ejemplo, el crecimiento acelerado a nivel mundial del clon ST258 de *Klebsiella pneumoniae carbapenemasa* KPC detectado, inicialmente, en Estados Unidos en 1996; el clon ST131 de *Escherichia coli* relacionado con resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas y el clon USA 300 de la bacteria *Staphylococcus aureus* con una resistencia al betalactámico meticilina. (9)(10).

En Latinoamérica en el año 2003 (11), Brasil reportó el primer caso de resistencia microbiana y seguidamente en el 2005 (11), Argentina y Colombia dieron a conocer más casos de resistencia, determinando que este problema ya era mundial. Por otro lado, en el Ecuador el primer reporte de RAM fue en el 2010 (11) identificada como *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas.

La OMS efectuó en el 2014 (8), una encuesta digital global de prevalencia de organismos multirresistentes, la cual se efectuó a 420 laboratorios en 67 países revelando amplias variaciones regionales para las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, y *Staphylococcus aureus* cuyos datos se muestran en tabla N°1, junto a otras investigaciones hechas a nivel Latinoamericano.

Tabla N°1: Investigaciones de la RAM en el Mundo y Latinoamérica

Año	País	Microorganismo	Antimicrobiano	% Resistencia	Autor
2014	Nivel Global	<i>Escherichia coli (BLEE)</i>	Betalactámicos	11,8–58,5%	(8) Harbarth S et al.
		<i>Klebsiella spp (BLEE)</i>		35,1–57,3%	
		<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	Metilicina	27,7–44,4 %	
	Latino América	<i>Staphylococcus aureus</i>	Metilicina	+ 25%	(12) Primo MGB et al.
Sudamérica	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Carbapenémicos	21 %		
2007	Ecuador	<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina	98,4%* y 49,2%	(6*,7) Srinivasan V et al*, y Salinas L et al.
2019			Sulfisoxazol	34,1%* y 49,2%, 24,1%	
			Tetraciclinas	24,8%* y 50,8%, 39,7%	

Entre los animales con más susceptibilidad a microorganismos resistentes son los destinados a la producción como es principalmente el ganado bovino, porcino y avícola, debido a que son los animales con más producción para el consumo humano, por ello que los ganaderos, y veterinarios utilizan los antibióticos como promotores de crecimiento, beneficiando así a la RAM, cuyas investigaciones se muestran en la tabla N°2.

Tabla N°2: Investigaciones de la RAM en animales de producción en Sud América.

País	Especie	Microorganismo	Antimicrobiano	% Resistencia	Autor
Argentina	Porcinos	<i>Escherichia coli</i>	Penicilinas	50%* y 63%	(8*,9) Pantozzi FL et al*, y Edna Carvajal B et al.
Colombia	Aves		<i>Escherichia coli (BLEE)</i>		
		Sulfamidas			
		Estreptomincinas			
Colombia	Bovinos	<i>Stafilococos coagulasa negativos</i>	Eritromicina	52%	(17) Del Pilar Sánchez Bonilla M et al.
			Penicilina G	58%	
		<i>S. Aureus</i>	74%		
		<i>Streptococcus spp</i>	88%		
Ecuador	Aves producción	<i>E. coli</i>	Tetraciclinas	78%	(18) Braykov NP et al.
			sulfisoxazol	69%	
			Trimetoprim sulfametoxazol	63%	
	Aves domesticas		Tetraciclinas	34%	
			sulfisoxazol	20%	
			Trimetoprim sulfametoxazol	17%	



La RAM también es ocasionada por profesionales del área de la salud que usan los antimicrobianos de forma indiscriminada sin antes realizar exámenes clínicos, cultivos bacterianos y otros análisis complementarios, que dan a conocer de forma más exacta a qué patógeno se está enfrentando y así poder elegir un antimicrobiano apropiado, en el caso de que sea necesario. Además, los antimicrobianos, en el Ecuador, están a la venta pública sin restricciones, las personas pueden adquirirlos sin problemas para su automedicación o para medicar a sus familiares, conocidos o sus animales.

La globalización es un obstáculo para el control de RAM, debido a que existe importaciones y exportaciones de alimentos, el turismo de personas a distintos lugares y el uso excesivo de antimicrobianos en la salud humana y veterinaria, por lo tanto, el mundo durante los últimos años se está enfrentado a una aparición acelerada de RAM permitiendo al mismo tiempo que estas bacterias multirresistentes emerjan y existan, colonizando de forma fácil el planeta entero. Sin embargo, debido a las diferentes necesidades y diversos privilegios de los estratos sociales no solamente de nuestro país sino a nivel mundial, encontramos una gran desigualdad ya que la información no es recibida de una manera correcta o simplemente los estratos sociales menos favorecidos no llegan a conocer nada sobre esta problemática de resistencia antimicrobiana, y como esta puede llegar a afectar la calidad de vida de una comunidad, como muchas de las resistencias a los antimicrobianos están asociadas al uso indiscriminado, y varias investigaciones asocian la emergencia de la resistencia a los diferentes tipos de uso en la medicina veterinaria.

El estiércol animal, de igual forma está comprometido al efecto de la RAM debido a los principalmente los antimicrobianos veterinarios mal usados, en EE.UU. se alcanzó un record de 10 años en fármacos veterinarios vendidos que oscilan entre 10.9 y 15.6 millones kg /año (19), ocasionando que los desechos animales contengan en su estructura parte de los antimicrobianos y al ser expulsado en suelo lo contaminen y generen resistencia en las bacterias que se encuentren o tengan contacto.

Por lo tanto, la alternativa de usar el compostaje para tratar los desechos de animales podría ser es una opción en la reducción de este problema, si se controlan varios factores como la frecuencia de volteo, la temperatura, entre otros (20).

#### **4. OBJETIVOS:**

##### **4.1.General**

Analizar la presencia de *Escherichia coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito – Ecuador.

##### **4.2.Específicos**

- Cuantificar las *E. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol bovino.
- Genotipificar los genes *bla<sub>CTX-M</sub>* de las *E. coli BLEE* en el proceso de compostaje del estiércol bovino.
- Establecer los patrones de multirresistencia de las *E. coli BLEE* aisladas de los residuos ganaderos en el proceso de biodigestión.

#### **5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

##### **5.1.Directos:**

- Investigadores principales del proyecto, requisito previo a la obtención del título de médico veterinario

##### **5.2. Indirectos:**

- Pobladores que conviven en la provincia de Cotopaxi relacionados con la ganadería bovina.
- Diferentes poblaciones bovinas donde existe la prevalencia de *E. coli* como bacteria multirresistente que conviven en la provincia de Cotopaxi relacionados

## 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTADOS

<b>Objetivo 1</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Analizar y cuantificar las <i>E. coli BLEE</i> en el proceso de compostaje del estiércol bovino.	Muestreo y análisis de compostaje en el inicio, a la mitad y al final del proceso de compostaje.	Cantidad de <i>E. coli</i> resistente y no resistente en el compostaje.	Técnica de filtración con nanopore de 0,45µm en método m-colibblue más CRO el laboratorio
<b>Objetivo 2</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Genotipificar los genes <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> de las <i>E. coli BLEE</i> en el proceso de compostaje del estiércol bovino	Análisis molecular de bacterias <i>E. coli</i> resistente a <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Descripción de las variantes génicas	PCR convencional
<b>Objetivo 3</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Establecer los patrones de multiresistencia de las <i>E. coli BLEE</i> aisladas de los residuos ganaderos en el proceso de biodigestión	Suspensión de colonias puras, sembrado en agar Mueller Hinton, e inhibición con antibiótico para la susceptibilidad de la bacteria.	Protocolo establecido.	Antibiogramas

## 7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

### 7.1. Resistencia Antimicrobiana Historia

Consta una certeza que desde mucho antes los antibióticos ya estuvieron descubiertos inadvertidamente antes de su publicación ante las personas, puesto que, se ha encontrado presencia de tetraciclinas en objetos derivados de la antigua civilización egipcia, además, de la costumbre de utilizar tierra para tratar enfermedades por parte de civilizaciones y tribus pasadas tenga relación con la certeza que el suelo es uno de los principales fuentes de microorganismo generadores de antibióticos (21).

Antes del descubrimiento en sí de la penicilina como antibiótico, E. de Freudenreich descubrió un antibiótico al estudiar la piocianasa, que es liberado por el bacilo piociánico como sustancia azul, el cual en nuestra actualidad se lo conoce como *Pseudomonas aeruginosa*, esta sustancia en los cultivos mostraba una acción de inhibición ante otras bacterias. Oscar Loew junto a Rudolf Emmerich en el año 1889 (21), fueron los primeros en realizar experimentos con este pigmento evidenciado que no solo frenaban la diseminación bacteriana, pues estas también destruían bacterias patógenas, pero debido a la inestabilidad y acción tóxica de la piocianasa no se permitió utilizarla en los seres humanos, ocasionando el fin de este antibiótico. Y así en posteriores años se descubrió otras sustancias que de igual manera fueron descontinuadas por sus efectos tóxicos.

En 1928 (21) Alexander Fleming, descubrió en su laboratorio la lisis de un patógeno por crecimiento de un hongo en su placa de agar al cual posteriormente aisló para mantenerlo en cultivo y generar más experimentos de lisis bacteriana, Fleming sabía que este descubrimiento ya se había hecho años atrás por otras personas, pero él fue el primero en dar a conocer que el moho (*Penicillium*), produce una sustancia capaz de lisar una bacteria, a la cual la llamó Penicilina, la cual fue el origen para que muchos empezaran a investigar nuevos antibióticos.

El descubrimiento estuvo estancado como simple averiguación de laboratorio por mucho tiempo, pero en Oxford los científicos Howard Florey, Ernst Chain y Norman Heatley volvieron a revelar lo que Fleming descubrió tiempo atrás. el trabajo de Fleming (22), los cuales investigaron y aislaron a la penicilina para observar su efecto quimioterapéutico

en ratones, para luego desarrollar a la penicilina como antimicrobiano sistémico, dando paso así a la formación de nuevos antibióticos como son las penicilinas semisintéticas.

Al empezar la era antibiótica la penicilina fue utilizada de manera desmedida, ya que era un fármaco de venta libre y disponible en distintas presentaciones (21). Este uso indiscriminado por este antibiótico ocasionó que las bacterias mutaran a organismos resistentes por lo cual las farmacéuticas crean nuevos compuestos con un efecto más alto que la penicilina como fue la meticilina, el cual funcionaba contra los organismos resistentes., pero en el año de 1961 en Gran Bretaña se reportó la aparición de la bacteria *Staphylococcus aerus* resistente al betalactámico meticilina (21), la cual se diseminó en poco tiempo por todo el mundo, dando lugar así a la gran problemática que tenemos en la actualidad de RAM.

La RAM tiene como definición la habilidad que tiene una bacteria de sobrevivir a los antibióticos y con ellos una mejoría para expandir su nicho ecológico y facilitar su multiplicación, siendo en nosocomios o el ambiente (23).

Estas bacterias resistentes nacen por un transcurso de selección adaptativa bajo la acción del mismo antimicrobiano (22), ya que en las bacterias existen células que no se inhiben por el efecto bactericida del antibiótico por lo cual van a formar genes resistentes, por lo tanto si se somete a una población bacteriana con genes resistentes a la acción inhibitoria del antibiótico se producirá un efecto mortífero hacia la subpoblación sensible, mientras que la subpoblación resistente continuará su desarrollo, provocando una sustitución a la población bacteriana sensible, creando así nuevas bacterias con potencial resistente sin que haya tenido contacto con un antimicrobiano.

## 7.2. Mecanismos de Resistencia

Las bacterias adquieren resistencia a causa de distintos mecanismos. Según sea el grupo del antibiótico y el tipo de bacteria, estos mecanismos se agrupan en cuatro:

- Hidrólisis o Transformación Química
- Transformación del Sitio Blanco.
- Transformación de la permeabilidad.
- Exclusión del Antimicrobiano, principal mente ocasionada por las bombas de eflujo (23).

Los genes resistentes son permitidos por células bacterianas móviles como integrones, transposones y plásmidos quienes posibilitan la transmisión de las células resistentes a los antibióticos.

**7.2.1. Plásmidos:** Son porciones redondas de ADN extracromosómico el cual pudiera generar resistencia a un antimicrobiano determinado. Estos al codificar resistencias se denominan plásmidos R. De igual forma son autorreplicantes bacteriófagos y a su vez también puede transferirse entre células por la conjugación (37).

**7.2.2. Transposones:** Se los conoce como genes saltarines ya que estas cadenas saltan de un sentido a otro como de cromosoma a plásmido o plásmido a bacteriófago (37). Su característica más importante es la de integrarse fácilmente a las cadenas de ADN distintas a la inicial, diferente de plásmidos, estas no son autorreplicantes por lo cual deben estar dentro de la estructura autoreplicante para su replicación. Su rasgo central y peligroso es la posibilidad de codificar resistencia a varias drogas, incluidos en un mismo plásmido, permitiendo adquirir multirresistencia a la bacteria receptora.

**7.2.3. Integrones y casetes genéticos:** Distintos a los transposones pero con mecanismos casi similares, estos se van a recombinar en un lugar específico y van a codificar resistencia a un solo antibiótico. Con los transposones, son los que más actúan en la adquisición de genes resistentes por plásmidos. Estas están formadas por 3 regiones, 2 invariables y 1 central variable, la cual lleva el casete, el mismo que tiene 1 gen y 1 sitio de recombinación, pues se han logrado evidenciar casetes superiores a los 40, en su mayoría con resistencia. (37).

### **7.3. Tipos de Resistencia**

La resistencia bacteriana puede ser natural o intrínseca y adquirida.

**7.3.1. Resistencia natural o intrínseca.** - Es la que interviene a una especie de bacteria en particular, en la cual la resistencia es antes de la utilización de un antibiótico.

**7.3.2. Resistencia Adquirida.** - Se la conoce cuando el antimicrobiano fue expuesto a la bacteria actuando sobre organismos sensibles y quedando los organismos resistentes, por ende, va a existir una mutación de la genética celular, y mutaciones en el trascurso de replicación del ADN.

Tolerancia es un fenómeno conocido que se considera como un tipo de resistencia adquirida aun cuando haya sensibilidad por parte de los microorganismos a un medicamento. (38).

#### **7.4. Manejo de desechos en las Granjas**

Las granjas pecuarias enfrentan cómo una de sus principales problemáticas al manejo de estiércol, por sus altos niveles de contaminación continua y su gran proporción que se tiene por lo cual estas deben ser eliminadas continuamente. La contaminación se presenta, cuando no se cuentan con procedimientos adecuados debido a la falta de conocimiento técnico y de conciencia medioambiental.

En cuanto a la conciencia medioambiental, la definimos como el grupo de actividades e ideas encaminadas en la preservación y cuidado del medio ambiente, mediante leyes reglamentarias que regulen los varios protocolos de acción para los distintos aspectos que conllevan una producción pecuaria, entre las cuales tenemos el manejo de desechos en producciones de diferentes especies de producción o igual se definen como: La propagación del entendimiento hacia los peligros que un crecimiento económico desequilibrado puede conllevar para el medio ambiente y a su vez, para el hombre (39).

La FAO ha señalado que la producción pecuaria en ganado avícola, ovino y porcino, son una de las causas principales hacia los problemas del medio ambiente como son: el calentamiento global, biodiversidad perdida, erosión de los suelos, y contaminación atmosférica junto con el agua. A demás se estima que el ganado es uno de los contaminantes, produciendo el 18% del efecto invernadero (39).

De igual forma se debe a la gran demanda y comercialización de los diversos productos resultantes de la producción pecuaria, junto con los sistemas intensivos de producción animal, caracterizados por la explotación máxima del cultivo y la crianza animal. Por tal razón, pueden crear enormes problemas de polución, debido a las grandes cantidades de

sustancias contaminantes que producen, iniciando así grandes volúmenes de estiércol que se colocan en el suelo implantando nuevos procesos entrópicos.

El compostaje es un manejo adecuado para los desechos orgánicos, el cual consiste en la desintegración de desechos orgánicos por acción microorgánica (bacterias, hongos y actinomicetos) en condiciones aeróbicas controladas, para la creación de un producto final homogéneo, idóneo para utilizarlo como fertilizante, denominándose composta (40).

Por otro lado, el uso erróneo del material orgánico es debido a que no se cumple con sus dimensiones en bioseguridad, recolección, traslado y eliminación por falta de concientización hacia el medio ambiente por parte de los productores. Es decir, los productores no tienen protocolos de higiene y desinfección, ni cuentan con un protocolo en manejo de desechos y de igual forma con su debido traslado, por lo cual se los deja en el campo sin control responsable alguno, y dejándose expuestos a enfermedades infecciosas poniendo en un riesgo a toda la población (39).

Por lo tanto, el impacto que tendrá en el ambiente, se va a definir por la manera que se maneja y se utiliza el estiércol. Los nutrientes junto con la materia orgánica contenidos en el estiércol al aplicarse de manera óptima van a mejorar los rendimientos de los sembradíos y pasturas junto con la fertilidad de la tierra (41). Mientras que un manejo mal estructurado genera un efecto dañino que degrada la calidad de los cuerpos de agua superficiales y subterráneas, inhabilitando la calidad de la tierra y trayendo daño al medio ambiente, la forma de contrarrestar esto es colocando el estiércol por lo menos 30 metros de distancia del cuerpo de agua más cercano. Poner el estiércol e incorporarlo inmediatamente al suelo impide que haya escurrimiento superficial a la vez de disminuir las pérdidas de nitrógeno (41).

El manejo de desechos en el Ecuador por parte de las grandes empresas es aceptable ya que se rigen a un estricto control en manejo de desechos peligrosos, como por ejemplo esta PRONACA que es una de las principales empresas de alimentos en el Ecuador, la cual presenta su Declaración Anual de Generación y Manejo de Desechos Peligrosos. También mantiene contratos de servicios con empresas gestoras autorizadas por el MAE, que se encargan del transporte, manejo y la disposición final de estos materiales, conforme se establece en la norma técnica NTE-INEN-2266.



En 2018 se registró una producción de 77.921 toneladas de desechos orgánicos que son utilizados como insumo para la elaboración de abonos por su negocio agrícola INDIA (42)

PRONACA controla el destino de los desechos a través de los registros entregados por el gestor que realiza el servicio, ya que estos documentos oficiales constituyen la cadena de custodia, en 2018 la cantidad de desechos peligrosos generados se incrementó con relación al año 2017 (42), esto debido a que las actividades de mantenimiento de esto no se realizan cada año sino que se las realiza con una periodicidad superior.

En el 2018 se observa un incremento en la cantidad de lodos y grasas residuales respecto al año 2017, debido a la incorporación de nuevos mecanismos para el manejo de las aguas de residuo, que son la fuente generadora de este tipo de desechos (42).

De igual forma ECO AMBIENTAL ANDINA CIA. LTDA, otra empresa ecuatoriana, tiene como parte de su infraestructura, una «Planta Ecológica para la Gestión de Residuos» ubicada en la provincia de Orellana, con Licencia Ambiental otorgada por el MAE mediante Resolución Ministerial N° 009 con fecha 17 de enero de 2013 y un área total de 12 hectáreas. El transporte de residuos peligrosos cuenta con Licencia Ambiental emitida por el MAE mediante Resolución Ministerial N°012 (43).

La Industria láctea en el Ecuador al igual que la de alimentos tiene factores de riesgo que afectan a la población, como es: el tratamiento de aguas residuales y el manejo de residuos sólidos. Los residuos sólidos que se generan en lo productivo son en mayor parte reutilizados en diversas industrias y los lodos producidos en plantas de tratamiento se las pone en vertedero o utilizados en abono.

Este acontecimiento origina una gran duda medioambiental: en un lado el beneficio económico y por otro un evidente deterioro medioambiental mediante la contaminación de los recursos naturales y degradación en la calidad de vida de numerosas comunidades (44).

## **7.5. Contaminación en el suelo, agua, aire.**

### **7.5.1. Suelo**

Este tiene la desventaja de ser dañado por el estiércol si contiene altos niveles de nutrientes (fosforo, nitrógeno), microorganismos patógenos (*E. coli*), antimicrobianos y algunos compuestos que se relacionen con el sistema endocrino (hormonas esteroidales, fitoestrógenos, plaguicidas y herbicidas).

### **7.5.2. Agua**

Al igual que el suelo tiene desventajas por contaminación de excretas, escurrimiento, infiltraciones, flujo de agua en las granjas con escorrentías y flujos superficiales de las zonas del pastoreo y en los suelos de siembra. El estiércol tiene grandes cantidades de nitrógeno y se relaciona con la contaminación de las aguas subterráneas por la extracción de nitrato por medio del suelo, mientras que el fosforo se relaciona con la contaminación en aguas superficiales.

### **7.5.3. Aire**

El aire es contaminado por efecto de descargas de estiércol en polvo, aromas y gases, resultado de la digestión anaerobia y descomposición aeróbica, el polvo se presenta en zonas áridas donde los animales están en confinamiento, puesto que a la remoción de la vegetación se va acumular grandes cantidades de estiércol y en el movimiento se producirá una gran capa de polvo.

Los contaminantes liberados por el estiércol en la atmosfera son el amoníaco y otros gases de efecto invernadero en donde se incluye el metano y óxido nitroso. Las emisiones globales de metano entérico, metano de estiércol y de óxido nitroso son 113, 40 y 10 TgCO<sub>2</sub>Eq (45).

El estiércol aporta con 50 % del total de emisiones de amoníaco hacia la atmósfera, porque su tasa de volatilización es mayor a 23 % (45).

Para el control de los residuos el manejo es la manera más adecuada para separar las sustancias peligrosas. Estos son peligrosos y no peligrosos, subproductos residuales, que quedan o sobran donde permanecieron los desechos orgánicos que son objetos, sustancias o elementos, fruto de las distintas acciones diarias de origen orgánico que puede ser reutilizada en variadas formas (40).

Al hablar del metano, es un gas de efecto invernadero tiene un efecto superior al CO<sub>2</sub>, a una elevación de 23, con un 16% de estiércol hacia las emisiones globales, por otra parte el Óxido nitroso está a una elevación de 296, superior al CO<sub>2</sub>, con una aproximación del 25% de emisiones antropogénicas de N<sub>2</sub>O (45).

El mal control de las autoridades y el desecho de residuos perturban de forma directa al suelo, aire, ríos y entorno natural, situación que compromete su modelo de negocio por lo que varias empresas ejercen presión e influencia sobre ecologistas y sociedad civil con el afán de que estos acepten un grado pequeño de contaminación poniendo la idea que las empresas son socialmente responsables con el medio ambiente (44).

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador, existen 25 compañías encaminadas a la formación de productos lácteos. Estas compañías se abastecen principalmente de proveedores nacionales, los cuales su mayoría se encuentran en la Región Sierra, en concreto un 73%, esto es debido a las características geográficas ideales para la producción ganadera, en costa se tiene un 19% y la Región amazónica un 8% (44).

La concientización ambiental de las empresas lecheras se ha vuelto un tema primordial para varias industrias del sector ya pueden generar impactos negativos a nivel de suelo, agua, aire y en el hábitat de la flora y fauna de la zona. La producción de aguas residuales ocasiona una gran cantidad de materia contaminante derivada de procesos industriales, y caracterizándose por contener una gran parte de material orgánico.

## **7.6. Compost**

Esto es un producto oxidativo otorgado por microorganismos para el tratamiento de material orgánico inestable hacia un material estable mineralizándose y humificándose (46).

Mediante el proceso de compostaje, ocurre una compleja sucesión poblacional de microorganismos los cuales son capaces de degradar o descomponer los elementos orgánicos, detallar estos microorganismos es complicado, ya que estas cambian de forma continua en varios aspectos como temperatura, reserva de nutrientes, volumen de oxígeno y de agua, pH, restos de antimicrobianos, etc (46).

El ecosistema del compostaje se limita así mismo cuando el calor es de forma excesiva, conforme va aumentando la temperatura, cada población bacteriana va siendo

reemplazada, quedando las bacterias mejor adaptadas, cada una de ellas con una duración limitada. En el caso de la realización de una correcta y continua aireación, la fase termófila va a continuar hasta que la producción de calor sea inferior a la dispersión del mismo, debido a que el agotamiento de los compuestos es fácilmente metabolizado.

La conformación del compostaje está dada por una variedad de microorganismos, los cuales principalmente son las bacterias *Actinomycetes* y hongos filamentosos. Las bacterias son las que mayor número tienen en el compost ya que estos pueden formar un 80% y 90% de todos los microorganismos que actúan (46), estas son un conjunto de variabilidad metabólica, puesto que utilizan enzimas que degradan químicamente una gran cantidad de residuos orgánicos.

La cuantificación de las bacterias aerobias totales representa, de alguna manera, un índice de actividad biológica (46), las *actinomycetes* durante la modificación de la materia orgánica del compost tienen la capacidad enzimática de degradar compuestos orgánicos complejos como es la celulosa, lignina, etc, la mayoría de las especies que intervienen en este proceso son tolerantes a la temperatura que tiene el compost, por tal motivo son las que poseen un mayor número en la obtención del compostaje. Además, las *Actinomycetes* tienen capacidad de regular la microbiota rizosférica a través de la producción de antibióticos y otros compuestos (46).

Los hongos filamentosos constituyen un grupo amplio en el proceso de compost por el cual pueden estar implicados en la degradación aeróbica de la materia orgánica debido a su alta capacidad lignocelulolítica. De igual forma estos se encuentran en el suelo como parte de la microbiota normal los cuales están implicados en los procesos de degradación y solubilización de compuestos orgánicos complejos y compuestos inorgánicos.

### **7.6.1. Condiciones iniciales**

Para que el proceso de formación de compostaje se pueda iniciar, se debe cumplir con condiciones iniciales de humedad, estructura y composición.

**7.6.1.1. Humedad:** Esta condición es esencial para el proceso de descomposición ya que si hay falta de humedad el proceso se va a ralentizar y la descomposición no será total, en cambio si hay un exceso de humedad ocasionará que el oxígeno no pueda entrar en los poros y limite el crecimiento de los

microorganismos. Se considera un intervalo óptimo para iniciar el proceso entre el 30 y 65%, o en todo caso por debajo del 80% (47).

**7.6.1.2. Porosidad:** La porosidad, la estructura, la textura o el tamaño de la partícula influyen en el proceso, por lo cual limitan o favorecen la aireación y al mismo tiempo la descomposición, para conseguir esta porosidad se requiere el implemento de material vegetal como paja, restos de poda, corteza de pino, entre otras.

**7.6.1.3. Relación Carbono/ Nitrógeno (C/N):** Esta relación se situará entre 25 y 35 para empezar el proceso (47), las deyecciones ganaderas están compuestas normalmente por una alta cantidad de nitrógeno, por lo cual se debe realizar una mezcla que contenga por contra, alta cantidad de carbono con poco de nitrógeno, hay que mezclarla con material vegetal para la regulación de la humedad, la porosidad y la relación C/N.

## **7.6.2. Fases del Compostaje**

### **7.6.2.1. Fase Mesofílica**

En esta fase la temperatura del compostaje va a ir desde los 20°C hasta los 45°C, esta temperatura es debida a la actividad microbiana, puesto que en esta fase estos microorganismos utilizan la fuente de C y N para generar calor. La degradación elementos solubles como lo son los azúcares, ya que producen ácidos orgánicos y por ende el pH bajaría (48). Esta fase va a durar pocos días entre los dos y ocho días.

Una amplia variedad de especies han sido descritas en esta fase del proceso, estas bacterias puede llegar a 100 millones de células por gramo de material (46).

Las bacterias descritas en esta fase pertenecen a diferentes familias; *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Caryophanaceae*, *Caulobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*,

*Flexibacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Intrasporangiaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Nitrosomonadaceae, Nocardiosaceae, Paenibacillaceae, Phyllobacteriaceae, Propionibacteriaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhodobacteraceae, Sphingobacteriaceae, Staphylococcaceae, y Xanthomonadaceae* (46).

Un género bacteriano que predomina en este estadio es el *Bacillus*, por lo que las familias de este género y están a temperaturas de hasta 50°C, pero mientras la temperatura va en aumento la actividad de este va disminuyendo (46).

#### **7.6.2.2.Fase Termófila o de Higienización**

Esta fase la temperatura va desde los 40 a los 60°C (46), por lo que los microorganismos de la fase mesófila empiezan a disminuir su actividad de forma rápida, los microorganismos mesófilos son parcialmente eliminados a estas temperaturas y las bacterias, hongos y *Actinomycetes* termófilos o termotolerantes van incrementando su población.

En esta fase, los microorganismos termófilos o termotolerantes incrementan su población a valores del orden de los 100-1000 millones de células por gramo (46).

Estos microorganismos transforman el nitrógeno en amoníaco por lo que el pH sube. Al llegar a los 60° C, se muestran bacterias productoras de esporas y actinobacterias, encargadas de la descomposición de ceras, hemicelulosa y más compuestos de carbono (48). La fase puede durar desde pocos días hasta meses, según las condiciones a las cuales este sometido.

Por lo que se la conoce como higienización debido a que el calor generado destruye los microorganismos patógenos con formación fecal como es *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Además, va a eliminar quistes, huevos, esporas y germinación de malezas, y produciendo productos inocuos.

#### **7.6.2.3.Fase termofílica extrema**

En esta fase las temperaturas que se tienen son desde 60 a 80°C, la fase termófila, con temperaturas que exceden los 60°C, son habitualmente consideradas como un “suicidio microbiano” (46), por lo que se asumiría que para tener una adecuada descomposición la

temperatura no debería sobrepasar los 55 a 60°C, pero la presencia de bacterias termófilas extremas es fundamental para la biodegradación y mineralización de los residuos biológicos a altas temperaturas.

La detección de bacterias termófilas durante la fase de alta temperatura, evidencia la posibilidad de realizar el compostaje a 65-75°C (46), por periodos temporales largos, sin exceder de 80°C. Las bacterias termófilas, así como las mesófilas, actúan sobre la hemicelulosa, descomponen una variedad importante de compuestos orgánicos (carbohidratos, ácidos orgánicos, polisacáridos, proteínas, lípidos, alcoholes) y reducen el azufre inorgánico (46).

En esta etapa los hongos se mantienen inactivos, permaneciendo en estructuras resistentes y esporas, mientras los *Actinomycetes* están en bajas concentraciones y no realizando un papel importante en la degradación y mineralización del material orgánico.

#### **7.6.2.4. Fase de enfriamiento y maduración**

Esta es la última fase del compost, la cual adquiere la temperatura de 50 a 20°C, ya que al agotarse las fuentes de C y N mediante el final del compostaje la temperatura baja de los 40° C (48), por lo tanto los microorganismos mesofílicos resurgen y el pH se mantiene alcalino ya que disminuye levemente. La fase puede durar varias semanas.

En cambio, en la fase de maduración la diversidad y el número de *Actinomycetes* mesófilos/termotolerantes y de hongos filamentosos capaces de degradar polímeros naturales complejos (lignina, hemicelulosa, celulosa), va a incrementarse significativamente. En esta fase las bacterias representan el 80% del recuento total de microorganismos (10<sup>9</sup> -10<sup>11</sup> ufc/g) y una pequeña proporción corresponde a bacterias esporuladas (48).

Esta mayoría de microorganismos en esta fase, poseen actividad proteolítica, amonificante, amilolítica y celolítica. Asimismo, se han descrito especies fijadoras libres de nitrógeno (*Azotobacter*, 10<sup>3</sup> -10<sup>5</sup> ufc/g), desnitrificadoras, y sulfato reductoras (46). Por lo cual esta diversidad microbiana va a ocasionar un papel fundamental en la estabilidad del compost.

Las bacterias mesofílicas que lograron mantenerse inactivas en la anterior fase y lograron resistir las altas temperaturas, vuelven a recolonizar el sustrato, esta “reactivación”

depende de la cantidad de bacterias con la capacidad de formar endosporas o cápsulas, por lo tanto, estas bacterias mesofílicas van a incrementar su actividad metabólica.

Y así favoreciendo la descomposición de los compuestos orgánicos, la oxidación y mineralización del nitrógeno inorgánico y los compuestos azufrados, la formación de compuestos del humus (exopolisacáridos) a través de la polimerización de compuestos orgánicos simples, la fijación del nitrógeno atmosférico, la supresión de fitopatógenos, la mineralización del hierro, manganeso y fósforo, la capacidad de intercambio catiónico y la formación de agregados minerales y también contribuye a la degradación de compuestos orgánicos tóxicos (pesticidas) y a la disminución de la cantidad de metales pesados a través de la formación de sales insolubles (46).

### **7.7. Técnicas Genómicas de identificación de bacterias**

#### **7.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP):**

Constituye una de las técnicas más empleadas y revolucionarias en la actualidad, (49) ya que nos permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Los métodos genotípicos amplifican regiones in vitro específicas de ADN al emplear secuencias que delimitan la zona de amplificación. (50)

Dicho esto, en esta etapa, lo que sucede es que a partir de una copia de la región seleccionada para la amplificación se adquieren millones de copias que posibilitan la detección y reflejan la presencia de la región de ADN en la muestra a analizar, asimismo, para esta transformación actúan varias proteínas que cooperan en la síntesis de nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

#### **7.7.2. Secuenciación del genoma:**

Con esta técnica en particular lo que se logra es obtener secuencias de hasta 500 bases aprox. Estas son ensambladas a un genoma de referencia que secuencia un genoma completo. Pero también determina el orden de la citosina, adenina, guanina y timina en un fragmento de ADN.



Este método ha cambiado la manera de entender la genética basándose en la identificación de las causas reales de la herencia, centrándose en estudios genéticos de individuos con un fenotipo definido y enfermedades de herencia mendeliana producida por genes conocidos. (50) igualmente presenta una sensibilidad muy alta para detectar mutaciones, de igual manera se evalúa el fenotipo y la secuencia de los genes que podrían estar afectados.

#### **7.7.2.1. Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS):**

Esta secuencia se la conoce también como No-Sanger, está disponible en diferentes plataformas o formatos que permiten la generación de datos con ventajas y desventajas propias de cada casa matriz (50), entre las ventajas se destaca la robustez, el bajo ruido presente el cromatograma y principalmente la calidad de los datos obtenidos a partir de las secuencias (50).

Y, como desventajas se ha reportado la falta de disponibilidad de un laboratorio con capacidad bioinformática que garantice la calidad en obtención e interpretación de los datos, así como la necesidad de realizar control sobre secuencias aleatorias o inespecíficas que pueden interferir con esta secuencia.

#### **7.7.2.2. Pirosecuencia**

Se caracteriza por la secuencia por síntesis de ADN con detección en tiempo real (50) Esta técnica de identificación genómica, atravesó del fosfato durante la incorporación de los nucleótidos a la cadena de ADN, seguido de una serie de reacciones enzimáticas, permite la identificación de secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones preestablecidas o también de bases individuales.

#### **7.7.3. Hibridación de sondas de ADN**

La hibridación de sondas se conoce como el análisis en muestras para detectar la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN), realizando una combinación anti paralela de estas con una molécula de doble cadena. (50) Estas técnicas se utilizan partiendo primeramente de

una sonda complementaria lo que le permite detectar moléculas diana. A su vez, una gran variedad de técnicas moleculares está basados en la hibridación. Asimismo, estas tienen varios propósitos entre los cuales, podemos destacar que se usan en el diagnóstico de enfermedades en la identificación de patógenos, en el estudio de perfiles de expresión génica y además participa en la localización de genes en cromosomas o de ARN mensajero en tejido in-situ y en la comparación de especies patógenas.

#### **7.7.1. Polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD)**

También conocida como polimorfismo de producto amplificado al azar, es una técnica que emplea marcadores moleculares para amplificación por RCP de secuencias cortas de ADN polimórfico empleando un cebador de secuencia corta (49). Sin embargo, al ser una técnica basada en RCP, existen varios aspectos que influyen directamente en el adecuado desempeño de la técnica como los nucleótidos, la temperatura de hibridación, tiempo de extensión, ciclos y la integridad de la cadena molde.

#### **7.7.2. RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción)**

Se denomina también fragmentos de restricción de longitud polimórfica, resultante de la variación de una secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción usadas para cortar secuencias de ADN en lugares conocidos; son empleados principalmente como marcadores en mapas genéticos. (50) De la forma que constituye un método ampliamente empleado por varios factores: Su bajo costo y especificidad, ya que necesita que se cumplan ciertas condiciones para su funcionamiento, por la rapidez en la obtención de resultado, también porque son consistentes en uso de enzimas de restricción adecuadas, junto con condiciones de optimización, amplificación y análisis de productos amplificados, a través de electroforesis mayoritariamente en gel azarosa.

#### **7.8.El compostaje en la RAM**

Debido al uso excesivo de antibióticos en la industria ganadera, se encuentran grandes cantidades de diversos genes de resistencia a los antibióticos (ARG) en el estiércol animal (51), por lo cual el compostaje es una opción para controlar esta grave situación.

De forma extranjera en Canadá los ministros del medio ambiente se han adaptado al compostaje como una alternativa de evaluación de riesgos (52), por lo tanto la industria ganadera está adoptando de mayor forma el uso del compostaje como reciclaje de nutrientes en la producción de cultivos, recuperación de suelos o un uso urbano.

Se ha estimado que entre el 25 % y el 75 % de los antimicrobianos administrados de forma subterapéutica o profiláctica en el ganado podrían excretarse inalterados en las heces (52), permitiendo que las bacterias resistentes y los ARG excretados en el estiércol, pueden dispersarse y persistir en el suelo tras su aplicación (19).

Un estudio realizado por (Wang, et, al 2017) otorgan resultados que indican una reducción hacia los patógenos con genes de resistencia antimicrobiana, por lo que sugieren al compostaje como una forma competente de disminuir el crecimiento de genes resistentes a microorganismos de importancia clínica (53). De igual forma se la define como tecnología esencial para la reducción de contaminantes ambientales emergentes ya que recicla desechos convirtiéndolos en fertilizantes, por lo tanto, refuerza el beneficio como tratamiento del estiércol.

## **8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS**

Los procesos de digestión favorecen la reducción de *Escherichia coli BLEE* del estiércol de ganado bovino compostado en una hacienda lechera en Quito- Ecuador.

## **9. INSTRUMENTAL**

Autoclave, Modelo LS-1

Cámara de Flujo Laminar, Serie: BBS-11H1408011D/, Modelo: BB-H1100,

Esterilizador, Modelo: Basic SNB 400, Código: 4202

Balanza electrónica, Modelo EHA351

Incubadora Mini Fridge

Refrigeradora Haier

Ultracongeladora -20°C Modelo FCC15A6HQW, Serie, Marca Electrolux

Termociclador Applied Biosystems Modelo 2720. Serial 272s6121312

Termobloque Labnet. Modelo AccuBlock. Serial s92420168

Transiluminador Espectroline. TR365A, serie 936924

Fuente de poder Bio-Rad. Modelo Power Pac 300, Serie 282BR18394  
Cámara electroforesis Labnet. Modelo EasyGel, Serie. S2656  
Centrífuga jouan. Modelo winchester. Serie. 00550119  
Vortex LB Scientific. Modelo TM-1000. Serie 0407179

## **10. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **10.1. Trabajo de campo**

1. El muestreo tuvo lugar en una hacienda lechera en Quito – Ecuador en noviembre del 2021.
2. Las muestras fueron recolectaron en las tres fases del compostaje:

Se recolectó en tres fases: la primera fase, mesofílica 20° C, luego se recolectó en la mitad del proceso, en la etapa termofílica 60° C y finalmente se tomó muestras al final del proceso de compost en la etapa de enfriamiento o maduración 20° C.

3. Se recolectaron 3 repeticiones por punto de 100 g del compostaje, y se registró la temperatura y pH.
4. Las muestras se a conservaron en incubadora Mini Fridge a 9° C durante 24 horas.

### **10.2. Trabajo de Laboratorio**

#### **10.2.1. Cuantificación**

5. Se preparó el medio de cultivo selectivo para *Escherichia Coli*, Tryptone Bile Glucoronic Agar (TBX Agar). Según las recomendaciones del fabricante.
6. Se repartió en dos porciones iguales de 250 ml cada uno y colocamos 10 µl llegando a una concentración de 4 µg/ml.

7. Se colocó el agar en las placas Petri, 7 con Ceftriaxona y 7 sin antibiótico más 2 de control, dándonos un total de 16 placas y dejamos reposar hasta que se solidifique.
8. Las diluciones se realizaron en base a la concentración de las muestras.  
 Punto 1:  $10^{-2}$ - $10^{-4}$ .  
 Punto 2:  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ .  
 Punto 3:  $10^{-2}$ - $10^{-3}$
9. Posterior a este proceso, se seleccionó las bacterias mayores a un diámetro de 0.45  $\mu\text{m}$  mediante un filtro nanopore, siguiendo las recomendaciones del fabricante. (Millipore Corporation Bedford, MA 01730).
10. El filtro se colocó inmediatamente sobre las placas con el medio de cultivo selectivo.
11. Colocamos el nanopore en las placas respectivas y se dejó cultivar durante 18 h a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C.
12. Realizamos el conteo de UFC/g de cada placa para estimar la dinámica de la carga bacteriana a través de los puntos antes mencionados en el transcurso del compost.
13. Para la purificación de las colonias preparamos el agar mencionado con anterioridad al cual adicionaremos 6  $\mu\text{l}$  de Ceftriaxona repartido en 9 placas con 20 divisiones cada una etiquetadas por número de punto, dilución y colonia.
14. Realizamos 9 repiques de colonias por punto seleccionadas de las 3 repeticiones por su morfología y color.
15. Estas son sembradas en diferentes placas con el mismo agar y concentración de Ceftriaxona.

### 10.2.2. Antibiogramas

16. Se realizó una suspensión de cada una de las 9 colonias de un cultivo puro, en 10 ml de suero fisiológico estéril, a una concentración de 0.5 Mac Farland.
17. Posteriormente se sembró homogéneamente esta suspensión en cajas petri con agar Mueller Hinton. Se dispuso sobre el agar, discos de sensibilidad con:

**Tabla 3: Antibióticos usados**

<b>Familia</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>Abreviatura</b>
Aminoglucósidos	<i>Amikacina</i>	AK

	<i>Gentamicina</i>	CN
	<i>Netilmicina</i>	NET
Quinolonas	<i>Ácido nalidíxico</i>	NA
	<i>Ciprofloxacina</i>	CIP
	<i>Levofloxacina</i>	LEV
	<i>Norfloxacina</i>	NOR
Beta-lactámicos	<i>Aztreonam</i>	ATM
	<i>Cefoxitin</i>	FOX
	<i>Cefepime</i>	FEP
	<i>Cefotaxima</i>	CTX
	<i>Ceftazidima</i>	CAZ
	<i>Imipenem</i>	IMP
Tetraciclinas	<i>Doxiciclina</i>	DO
	<i>Tetraciclina</i>	TE
Fosfonatos	<i>Fosfomicina</i>	FF
Macrólidos	<i>Azitromicina</i>	AZM
Anfenicoles	<i>Cloranfenicol</i>	C
Nitrofuranos	<i>Nitrofurantoína</i>	F
Antagonistas del folato	<i>Sulfametoxazol/trimetropina</i>	STX
Gliciliclinas	<i>Tigeciclina</i>	TGC

18. Se incubó a 37° C por 24 horas.

19. Finalmente, la susceptibilidad de los antibióticos se midió a través de los siguientes parámetros:

**Tabla 4: Parámetros de susceptibilidad**

			≥S	SDD	I	R
1	Aztreonam	30µg	21	-	18-20 <sup>^</sup>	17
2	Ácido nalidíxico	30µg	19	-	14-18	13
3	Amikacin	30µg	17	-	15-16 <sup>^</sup>	14
4	Azithromycin	15µg	13	-	-	12
5	Cefotaxima	30µg	26	-	23-25 <sup>^</sup>	22
6	Ceftazidime	30µg	21	-	18-20 <sup>^</sup>	17
7	Cefepime	30µg	25	19-24	-	18
8	Cefoxitin	30µg	18	-	15-17 <sup>^</sup>	14
9	Ciprofloxacina	5µg	26	-	22-25 <sup>^</sup>	21
10	Chloramphenicol	30µg	18	-	13-17	12
11	Doxycycline	30µg	14	-	11-13	10
12	Fosfomicina	200µg	16	-	13-15	12
13	Gentamicina	10µg	15	-	13-14 <sup>^</sup>	12
14	Imipenem	11µg	23	-	20-22	19
15	Levofloxacina	5µg	21	-	17-20 <sup>^</sup>	16
16	Netilmicin	30µg	15	-	13-14 <sup>^</sup>	12

17	Nitrofurantoin	300µg	17	-	15-16	14
18	Norfloxacin	10µg	17	-	13-16	12
19	Sulphamethoxazole/ trimethoprim	5µg	16	-	11-15	10
20	Tigecycline	15µg				
21	Tetracycline	30µg	15	-	12-14	11

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). CLSI M100 30th Edition. Journal of Services Marketing (Vol. 30th).

### 10.2.3. Análisis *bla<sub>CTX-M</sub>*

20. Se colocó en 4 eppendorf 300 µl de TE buffer (1N TRIS, 05M EDPA, pH 8,0) por cada uno, adicionalmente en la misma cantidad de eppendorf se colocó 500µl de Caldo de soja tréptica (TSB), Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA. Los cuales se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante.
21. Se identificó con un código a cada una de las colonias, al igual que los eppendorf con cada uno de los medios.
22. Se realizó un raspado en cada colonia con un asa estéril, la misma que fue introducida en los tubos eppendorf que contenían el medio TE, posteriormente la misma asa se introdujo en los tubos eppendorf que contienen el caldo TSB.
23. Una vez terminado el procedimiento antes mencionado en los 4 tubos eppendorf con caldo TSB se los llevó a incubar 24h y finalmente adicionamos 500 µl de glicerol para su almacenamiento como ADN de respaldo.
24. Terminados los 4 tubos eppendorf con medio TE los llevamos a termobloque durante 10 min a una temperatura de 90° C, posteriormente los pusimos a centrifugar durante 3 min a 12400 rpm, finalmente se extrajo 150 µl del sobrenadante (ADN) los cuales fueron depositados en nuevos eppendorf y etiquetados.
25. Seleccionamos el PCR Master Mix Hot Start Taq (GOLDBIO) 12.5 µl (2x), iniciador derecho 1 µl (10mM), iniciador izquierdo 1 µl (10mM) (Eurofins Genomics 8785689) ADN 3.5 µl (~200nmol) y agua libre de nucleasa hasta completar 25 µl.
26. Colocamos los eppendorf PCR en el termociclador según los protocolos correspondientes a cada familia génica *bla<sub>CTX-M</sub>*.

**Tabla 5: Protocolos PCR múltiple de identificación de la familia génica *bla*<sub>CTX-M</sub>**

<i>bla</i>	CTX-M1		CTX-M9		CTX-M2		CTX-M8	
	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5min	94°C	5min	94°C	5min	94°C	5min
<b>SEGMENTADO</b>								
Desnaturalización	94°C	30seg	94°C	30seg	94°C	30seg	94°C	30seg
Alineación	60°C	30seg	55°C	30seg	55°C	30seg	55°C	30seg
Extensión	72°C	30seg	72°C	30seg	72°C	30seg	72°C	30seg
Extensión Final	72°C	7min	72°C	7min	72°C	7min	72°C	7min
<b>CICLOS</b>	35		35		35		35	
<b>Adelante</b>	CCC ATG GTT AAA AAA TCA CTG C		TGG TGA CAA AGA GAG TGC AAC G		ATG ACT CAG AGC ATT CG		TGA TGA GAC ATC GCG TTA AG	
<b>Inversa</b>	CAG CGC TTT TGC CGT CTA AG		TCA CAG CCC TTC GGC GAT		TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC		TAA CCG TCG GIG ACG ATT TT	

27. Se preparó el gel de agarosa con 80 ml de TBE 5x y 1.5 g de Agarosa, el cual se colocó en la cámara de solidificación con un peine que enmarca los espacios donde posteriormente introdujimos el resultado PCR (5 µl) y Sybr gold (1 µl).
28. Una vez completado este proceso se colocó el gel en la cámara de electroforesis a 150 V-400 mAh durante 45 minutos.
29. Transcurrido los 45 minutos llevamos el gel al Transiluminador, para observar las bandas de acuerdo con el peso molecular del gen.

## 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El compostaje es un método prometedor para el manejo de desechos sólidos de animales de granja. Sin embargo, es necesario determinar la capacidad de mitigar la resistencia antimicrobiana producida en las explotaciones pecuarias. Por lo tanto, se realizó la evaluación de la *E. coli* BLEE en el compostaje en la hacienda lechera LYG FARM en la ciudad de Quito, en la cual se recolectaron muestras de compost en sus 3 fases para luego proceder con sus respectivos cultivos, y visualizar el número de bacterias resistentes existentes en cada fase por medio de la cuantificación bacteriana, para lo cual las placas fueron cultivadas a distintas diluciones, esto debido a que la filtración en los filtros nanopore se obtengan colonias bacterianas contables, ya que si la dilución es mínima el resultado obtenido serán colonias incontables ocasionando que el conteo de la unidad formadora de colonias (UFC) no sea posible, esto dado que el número de colonias es proporcional al número de bacterias existentes en el cultivo por lo tanto al identificar el



número de colonias y por medio de una fórmula se obtiene el número de UFC en cada punto de dilución (Tabla 9).

Las muestras se cultivaron con Ceftriaxona y sin la misma, verificando la cantidad de crecimiento bacteriano obtenida, evidenciando la eliminación y reducción que presenta el compost en sus fases.

**Tabla 6: Cuantificación de las Muestras con y sin Ceftriaxona.**

<b>Puntos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
TBX. UFC.E. coli/g	10000000	170	335063,3
TBX+CRO UFC.E. coli/g	200	0	73

**Nota:** El TBX significa el agar utilizado como medio de cultivo, el CRO (Ceftriaxona) es el antibiótico usado para medir la resistencia de las bacterias, mientras que la UFC, es el número de colonias de la *E.coli* por gramos existentes en los cultivos.

En las UFC del P1 con TBX muestra un valor elevado debido a que el cultivo bacteriano presentó un valor incontable, esto debido a que en la etapa inicial del compost la temperatura está a 20°C en cambio en el P2 se obtuvo una disminución considerable, debido a que en esta fase la temperatura es la más alta con 60° C y donde más patógenos se eliminan, pero en el P3 las UFC obtuvieron un incremento de bacterias resultado de la fase de enfriamiento 20° C debido a que las bacterias que sobreviven vuelven a replicarse.

En los puntos de TBX+CRO se muestra que las UFC obtuvieron un número elevado en el P1 que en las de más fases, esto debido a lo explicado anteriormente, pero el P2 hay tuvo crecimiento nulo, esto podría deberse a la fase termofílica, pero además se puede entender que en este punto no hay bacterias resistentes ni genes que puedan sobrevivir, algo similar ocurre en un estudio, en el cual los genes de resistencia de las tetraciclinas bajó considerablemente al momento de ingresar en la etapa termofílica (53).

Estos resultados muestran reducción del P2 y aumento en el P3 de la muestra con TBX debido a que las bacterias resistieron la fase 60° C y se multiplicaron, pero en las muestras de TBX+CRO las UFC del P2 fue nulo y el P3 aparecieron nuevamente, pudiendo ser por un muestreo insuficiente, o que *E. coli*, haya obtenido una actividad proteolítica, la cual impidió que la bacteria se perdiera del todo, o como explica López O. et.al, en sus estudios de detección de resistencia a *E. coli* y *Salmonella*, en donde indica que, el que no haya crecimiento bacteriano en todos los puntos no necesariamente sugiere la ausencia de la misma, ya que se ha reportado que las bacterias en ambientes hostiles entran en estado viable pero no cultivable, lo que dificulta su aislamiento en medios de cultivo selectivos (54), por lo cual es otra explicación hacia este resultado de crecimiento nulo.

Pero, hay que recordar que las bacterias que lograron resistir al proceso termofílico son las bacterias que adquirieron más patogenicidad resistente, por lo tanto, son las bacterias con más peligrosidad, en específico a las 73 obtenidas en el P3 de la TBX+CRO.

Entonces se indica que en las muestras con TBX y TBX+CRO el compostaje disminuye los patógenos portadores de genes resistentes hasta el P2, pero en el P3 hubo nuevamente crecimiento por ende necesitamos determinar los factores que limitan el crecimiento y se mantengan en el P3, estos resultados son agravantes por la resistencia a Cefalosporinas de tercera generación, y hay que considerar que están a un paso de generar resistencia hacia más antibióticos, por medio de intercambio genético vía plasmidios, transposones y conjugación podrían llegar a ocasionar más problemas.

Para determinar la sensibilidad y resistencia de la *E. coli*, se realizó (Figura 1). Ocasionalmente con ello tener patrones de multiresistencia de las *E. coli* BLEE hacia la utilización de antibióticos en las producciones pecuarias del país.

Tabla7. Sensibilidad y Resistencia de *E. coli*.

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	RESISTENCIA	SENSIBILIDAD DEPENDIENTE A LA DOSIS	INTERMEDIA
AZM	100%	0%	0%	0%
CTX	100%	0%	0%	0%
NA	33.3%	55.6%	0%	11.1%
FOX	100%	0%	0%	0%
CIP	55.6%	44.4%	0%	0%
C	33.3%	66.7%	0%	0%
AK	88.9%	0%	0%	11.1%
FEP	44.5%	0%	55.5	0%
DO	77.8%	0%	0%	22.2%
TE	33.3%	66.7%	0%	0%
F	100%	0%	0%	0%
CN	100%	0%	0%	0%
NET	100%	0%	0%	0%
ATM	100%	0%	0%	0%
NOR	44.4%	44.4%	0%	11.2%
CAZ	77.8%	0%	0%	22.2%
IPM	100%	0%	0%	0%
LEV	66.7%	33.3%	0%	0%
FF	100%	0%	0%	0%
SXT	100%	0%	0%	0%

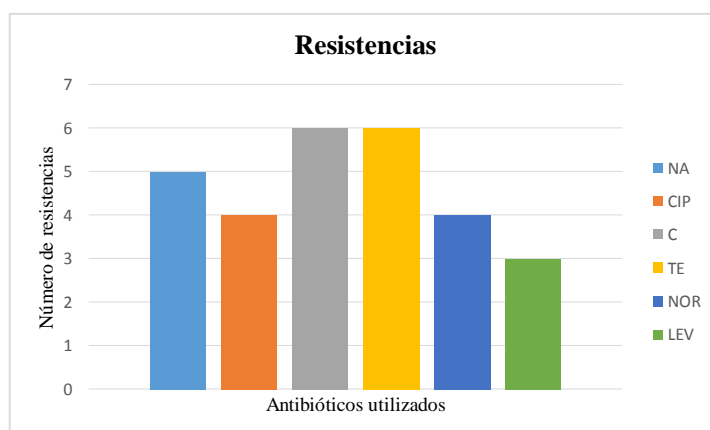
**Nota:** La tabla 10 muestra los resultados del Antibiograma con los siguientes antibióticos: AZM (azitromicina); CTX (cefotaxima); NA (ácido nalidíxico); FOX (cefexitina); CIP (ciprofloxacina); C (cloranfenicol); AK (amikacina); FEP (cefepime); DO (doxiciclina); TE (tetraciclina); F (nitrofurantoina); CN (Gentamicina); NET (netilmicina); ATM (aztreonam); NOR (norfloxacina); CAZ (ceftazidima); IMP (imipenem); LEV (levofloxacina); FF (fosfomicina); SXT (trimetoprim / sulfametoxazol).

En este caso se encontró resistencia de *E. coli BLEE* a determinados fármacos establecidos por la CLSI (Tabla 10), en este caso fueron el ácido nalidíxico; ciprofloxacina; cloranfenicol; tetraciclina; norfloxacina; levofloxacina, con un 28.6% mientras que la sensibilidad está a un 71.4% por lo cual, el compostaje aeróbico se lo puede usar ampliamente para el reciclaje de estiércol animal y para reducir la cantidad de genes de resistencia a los antibióticos (55)., evidenciando estos resultados se tiene una prueba de que los genes de las bacterias resistentes en el compost tienen una disminución muy evidente, por tal motivo estas solo mostraron resistencia a 6 antibióticos de los 21 expuestos.

La resistencia en su mayoría fue a fluoroquinolonas, lo cual genera mucha atención, por la potencial forma de acción en la medicina Humana, ya que es un medicamento de elección en enfermedades nosocomiales, y su resistencia va ocasionar que su uso

hospitalario sea ineficaz, mientras su uso en la medicina veterinaria ha estado causando resistencia en la alimentación, por esta razón, la OMS recomendó el uso de fluoroquinolonas fuera de la medicina humana y mejorar las evidencias epidemiológicas sobre como la resistencia tanto en humanos como en animales se desarrolla, persiste y extiende entre los animales y el hombre (56), y de igual forma la resistencia a las tetraciclinas y cloranfenicol ocasionan un déficit terapéutico, y al mismo tiempo el resto de antibióticos testeados presentan sensibilidad, lo que significa que esta bacteria aún no llega al grado de conjugación a estos antibióticos.

**Figura 1: Antibióticos resistentes a *Escherichia coli* BLEE**



**Nota:** Se muestra en la figura el número de resistencias encontrados hacia los antibióticos: NA (ácido nalidíxico); CIP (ciprofloxacina); C (cloranfenicol); TE (tetraciclina); NOR (norfloxacina); LEV (levofloxacina).

Los resultados sugieren que la presencia de genes resistentes en el compostaje de ganado bovino, ocasionan resistencia a estos antibióticos (Figura 2). Esta resistencia podría ser producida por la transferencia de genes entre cepas de la misma especie y entre especies a través de múltiples mecanismos que incluyen, entre otros, la transferencia de plásmidos, la transducción de fagos y la transformación natural (57).

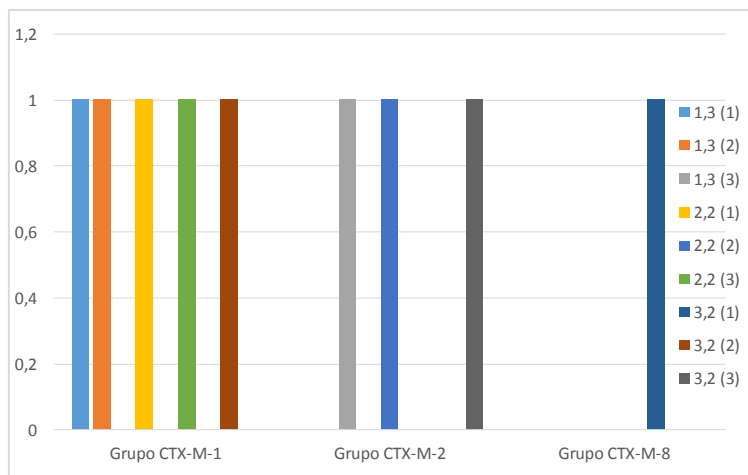
Un estudio realizado por Heringa S. et.al. de resistencia a *E. coli* en compostaje, donde se usó 136 muestras y 10 antibióticos, dando como resultado las resistencias en 37% de tetraciclina y 63 % en ampicilina (58), en similitud a este estudio se muestra resistencia a

tetraciclina, por lo que se puede decir que este antibiótico es uno de los más utilizados en las producciones pecuarias.

Por lo tanto, los resultados que muestra el antibiograma nos da la idea de que la resistencia a estos antibióticos está creciendo, debido a que se encontró sensibilidad intermedia y sensibilidad dependiente de la dosis, por lo cual se establece la existencia de multirresistencia en el compostaje de ganado bovino, que también nos lleva a pensar cómo va en aumento la problemática de la RAM.

Con respecto a la identificación molecular se obtuvo resultados positivos a tres grupos del CTX-M, encontrando 5 genes del grupo CTX-M-1 y 3 en el gen CTX-M-2 en todos los puntos del compostaje, pero el último el gen CTX-M-8 solo se encontró en el punto 3, estos resultados muestran que la incidencia mayor en *E.coli* BLEE es la del gen CTX-M-1 concordando con Suá NMA, Rez en su investigación de detección y caracterización de CTX-M en cepas de *enterobacterias* donde el gen CTX-M-1 es el de mayor incidencia (59).

**Figura 2: Identificación molecular del CTX-M**



**Nota:** En la figura se muestran los resultados obtenidos en la identificación molecular del gen CTX-M, en donde se puede visualizar que se encontró 5 del grupo CTX-M-1 en las muestras de compost, 3 del grupo CTX-M-2 y 1 del grupo CTX-M-8.

Las CTX-M han demostrado ser las lactamasas más exitosas en su dispersión en el entorno clínico y, en general, se han convertido en las BLEE más prevalentes en todo el mundo (60), su estudio es de importancia para la salud pública y el entorno pecuario, y al identificar estos genes implicaría una reducción en la proliferación de estos genes. El estudio es realizado en *E. coli* debido a que en la mayoría de estudios junto a *K. pneumoniae* son reportada como huéspedes comunes a las CTX-M (60).

Los productores de CTX-M han revelado tasas de mortalidad de alrededor del 20-30% (60), con riesgo a enfermedades como diabetes, antecedentes recientes de infecciones del tracto urinario, enfermedades renales y uso reciente de antibióticos principalmente fluoroquinolonas, obteniendo una similitud en este estudio que se muestra en los resultados obtenidos en la (figura 2), donde se tienen resistencia en antibióticos pertenecientes al grupo mencionado.

Las cefotaximas CTX-M plasmídicas se han considerado procedentes de penicilinasas de la bacteria *Kluyvera spp.* Tanto las secuencias de inserción (IS, del inglés insertion sequences) como algunos fagos estarían involucrados en este salto a los plásmidos (61).

Por otra parte, en otro estudio Mugnaioli C. menciona que en particular la notable diversidad genotípica entre los aislados de *E. coli* que producen CTX-M-1 y la alta frecuencia con la que se pudo detectar la transferencia conjugativa del gen blaCTX-M-1. nos insinúa que se desarrolló un papel importante en la diseminación a través transferencia horizontal mediada por plásmidos. (62)

El gen CTX-M-1 es el que más prevalencia se encontró, debido a su alta diseminación, con más frecuencia es detectado en los animales, como se comprueba en el estudio de Hartmann A. et.al. de presencia de *E.coli* en suelos, ganado y entornos agrícolas, donde de igual forma se encontró genes CTX-M-1 (63) pero, en este estudio se obtuvo solo 8 genes CTX-M-1 de 182 muestras diseminadas evidenciando que en Francia no existe mucha diseminación de estos, mientras que en nuestro estudio se evidencia que el gen CTX-M-1 tiene una alta proliferación en este entorno.

Mientras que en Asia de igual forma se encontró una excesiva prevalencia de el gen CTX-M-1 con total del 93% (64) de aislamientos positivos en tratamiento de lodos fecales, poniendo la evidencia que este gen es el más diseminado en el mundo, pero de igual

manera así mismo se muestra que CTX-M-2 y CTX-M-8, no tienen incidencia a comparación del nuestro que si se obtuvo estos genes, por tal motivo nos permite deducir que estos tipos de genes no tienen alta diversidad.

Pasando al gen CTX-M-2 tiene solo tres proliferaciones, esto debido a que este es un gen en el cual hay más proliferación en estiércol de equinos que en la de los demás animales (65), por lo tanto el compostaje bovino tiene poca diseminación.

El gen CTX-M-8 solo presentó un positivo en el P3, esto pudiendo ser ocasionado por los puntos del compostaje y a su temperatura, teniendo en el P1 y P2 negatividad sobre este gen, y su aparición en el P3 se pudo deber a la actividad proteolítica que adquieren las bacterias la que la hace ser un grupo más peligroso.

## **12. IMPACTOS (TÉCNICOS, AMBIENTALES O SOCIALES)**

### **12.1. Impacto Técnico**

Este está enfocado en la utilización de diversos tipos de trabajos en el laboratorio, cultivos de muestras, repique de colonias, identificación y cuantificación de bacterias junto con la realización de antibiogramas.

### **12.2. Impacto Ambiental**

La investigación demuestra que la manera en que dosificamos los antimicrobianos, tiene una repercusión a nivel mundial, ya que su uso irracional, permite la proliferación de bacterias multirresistentes que se proliferan a través de la producción pecuaria. Por esta razón, establecer protocolos para la identificación de genes de multirresistencia y su tratamiento ayudándonos del compostaje, el cual permite la disminución de estas bacterias.

### **12.3. Impacto Social**

Con respecto al impacto social, esta investigación denota que el papel de los profesionales de salud, es fundamental, ya que el uso desmedido de los antimicrobianos como promotores de crecimiento, conlleva a una gran problemática a largo plazo como es la RAM, que para el 2050 será la principal causa de muerte en el mundo, todo esto por el uso irracional de los antimicrobianos.

## 13. PRESUPUESTO PARA LA PROPUESTA DEL PROYECTO

<b>PRESUPUESTO</b>				
<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>VALOR UNITARIO</b>	<b>VALOR TOTAL</b>
<b>TOMA DE MUESTRAS</b>				
Fascos plásticos estériles 100 mL	Paquete de 25 U	2	15	15
Recipientes plásticos estériles 1000 L	Unidad	5	30	150
Cubre zapatos	Paquete de 100 U	40	0.15	6
Cofia estéril	Caja de 50 U	1	3.75	3.75
Guantes estériles	Caja de 50 pares	2	8.36	16.72
Hielo químico	Pieza	3	0.5	1.5
Mascarilla	Caja 50 U	1	3.4	3.4
Termo refrigerante para transporte de la muestra	Pieza	1	7.8	7.8
<b>SUBTOTAL</b>				204.17
<b>MATERIALES FÍSICOS</b>				
Asa metálica	Unidad	1	2.5	2.5
Cajas petri desechables	Paquete de 20 U.	4	3.25	13
Gradilla plástica universal para tubos de 2 ml	Pieza	1	7.5	7.5
Soporte individual para mantener fundas abiertas	Pieza	3	10.08	30.24

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)



Tijeras de disección	Pieza	2	2.5	5.0
Tubos de 1,5 ml Ependorf ®	Funda de 1000 tubos	1	38	38
Microtubos 0,2 mL(PCR)	Funda de 1000 tubos	1	38	38
Vaso de precipitación	Pieza	2	2.5	5.0
<b>SUBTOTAL</b>				139.24
<b>MATERIALES QUÍMICOS</b>				
Alcohol Industrial 99°, Laboratorio Quimfas®, lote 061300317	Galón	1	8.21	8.21
Alcohol al 70% (30 ml por muestra) Quito- Ecuador, ALFAMED	Galón	1	8.21	8.21
m-ColiBlue24® (Merck, EE. UU.)	Caja 50 U	4	60	240
Membranas de 0.45 (Merck, EE. UU.)	Caja 50 U	4	60	240
Muller Hinton Agar	500g	1	80	80
Muller Hinton Broth	500g	1	80	80
MasterMix Green Promega	Vial	1	300	300
Primers	Vial	10	20	200
Agarosa Invitrogen	Frasco 100g	1	80	80
TBE buffer 10X	Frasco 1 L	1	50	50
Agua libre de nucleasa	Frasco 0.5 L	1	30	30
Sybr gold	Vial	1	140	140

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

<b>SUBTOTAL</b>				1456.42
<b>EQUIPOS</b>				
Autoclave, Modelo SIM-E. Serie 058452, Markel Forge	Uso mensual	3	0.00	0.00
Balanza electrónica, Boeco Germany BLC 500	Uso mensual	3	0.00	0.00
Cámara de flujo laminar con filtros HEPA: Biological Hazard Biobase Midcis Precision Scientific CO PS. Modelo BSC-15011 A2-X Serie BSC16A0971 Marca Biobase	Uso mensual	3	0.00	0.00
Incubadora DAIHAN SCIENTIFIC Capacidad de 155 L a 42°C	Uso mensual	3	0.00	0.00
Refrigeradora Durex RDE 1090SUBO, Serie 125271896	Uso mensual	3	0.00	0.00
Termociclador Applied Biosystems Modelo 2720. Serial 272s6121312	Uso mensual	3	0.00	0.00
Termobloque Labnet. Modelo AccuBlock. Serial s92420168	Uso mensual	3	0.00	0.00
Transiluminador Espectroline. TR365A, serie 936924	Uso mensual	3	0.00	0.00
Fuente de poder Bio-Rad. Modelo Power Pac 300, Serie 282BR18394	Uso mensual	3	0.00	0.00
Centrífuga jouan. Modelo winchester. Serie. 00550119	Uso mensual	3	0.00	0.00
Vortex LB Scientific. Modelo TM-1000. Serie 0407179	Uso mensual	3	0.00	0.00
MicrofilS (Merck, EE. UU.)	Uso mensual	3	0.00	0.00

<b>SUBTOTAL</b>				0.00
<b>BIOLÓGICOS (Cepas control)</b>				
*Controles <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> Grupo 1	1 vial	2mL	0.00	0.00
Antibiogramas				400.00
<b>SUBTOTAL</b>				0
<b>TOTAL</b>				2599.83

#### 14. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La RAM junto con la proliferación de genes de multirresistencia ha provocado una problemática de relevancia e impacto mundial, por lo cual la presencia de esta en el compost da evidencia que la *E. coli* está presente generando multirresistencia en la producción pecuaria.
- Se llegó al resultado, que en las muestras con TBX en el P1 hubo una reducción de 1000000 UFC/g a 170 UFC/g del P2 y al P3 335063,3 UFC/g probando reducción y proliferación, mientras en las muestras con TBX+CRO, en el P1 se observó una reducción de 200 UFC/g a 0 UFC/g en el P2, pero en P3 proliferaron 73 UFC/g, debido a las temperaturas con las que se manejan los puntos del compost, siendo estas las más peligrosas ya que transmiten una resistencia más elevada.
- La identificación molecular obtuvo tres grupos CTX-M presentes en las muestras, lo cual permite evidenciar la presencia de *E. coli* BLEE, sin embargo, en un rango menor a lo esperado ya que se encontró la presencia de tres grupos de los cinco principales existentes, con una mayor presencia de positividad en el grupo CTX-M-1, lo que finalmente, nos permite concluir que el proceso de compostaje del estiércol, se simboliza como un proceso que nos permite alcanzar la reducción de genes resistentes.

- La evaluación de sensibilidad y resistencia, los resultados muestran claramente que la *E. coli* BLEE presenta un 71.4% de sensibilidad a los antibióticos presentados en los parámetros de la CLSI, y 28.6% de resistencia a los demás fármacos. En tal sentido, analizando estos resultados establecemos que en el caso de estas muestras encontramos multirresistencia ya que se ven afectados por más de dos antimicrobianos.

### **Recomendaciones**

- Realizar estudios que determinen la presencia de los grupos CTX-M en muestras de compost es la manera de lograr cambios para una disminución e incluso hablar de eliminación de estos microorganismos.
- El compostaje se podría mejorar con el uso de aditivos como cascara de yuca de huevo o arcilla debido a sus moléculas cargadas de montmorillonita y calionita, reduciendo concentraciones de metales tóxicos y mejoran la eficacia del compostaje en la eliminación de patógenos.
- Generar conciencia en la prescripción, dosificación y forma de uso de antimicrobianos en la producción pecuaria y en los alimentos, ya que el uso irracional genera RAM.
- Efectuar un correcto control de los desechos orgánicos, con el uso del compostaje ayudándonos con la biología molecular para conocer los genes que se encuentran en el hato ganadero para de esta manera conocer en particular cuales grupos están en alta incidencia.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez DQ. Antimicrobial resistance: Evolution and current perspectives in the context of the “one health” approach. *Rev Cubana Med Trop.* 2017;69(3):1-17.
2. Ardoino S, Toso R, Toribio M, Álvarez H, Mariani E, Cachau P, et al. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Cienc Vet.* 2017;19(1):50-66.
3. Merino LA, Hreňuk GE, Ronconi MC, Alonso JM. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste Argentino. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2004;15(4):219-24.
4. Neill JO'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014;(December).
5. OMS. Resistencia a los antibióticos. Temas de Salud [Internet]. 2020; Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>
6. Labarca L J, Araos B R. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infectol.* 2009;26(SUPPL. 1):8-9.
7. García Apac C. Resistencia antimicrobiana. *Diagnóstico.* 2018;57(2):79-81.
8. Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan R, et al. Antimicrobial resistance: One world, one fight! *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2015;4(1):1-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>
9. Gisele Peirano PAB, Krystyna M. Kazmierczak REB, Meredith Hackel DJH, Pitout and JDD. Global Incidence of CarbapenemaseProducing *Escherichia coli* ST131. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014;12(1):5. Disponible en:

- [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70360-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70360-7)
10. Zhang J-AMK. Complete Genome Sequence of a Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hypervirulent Strain, USA300-C2406, Isolated from a Patient with a Lethal Case of Necrotizing Pneumonia. *2017*;5(22):17-9.
  11. MSP. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. Minist Salud Publica [Internet]. 2018;10. Disponible en: [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta\\_ram2018.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf)
  12. Primo MGB, Guilarde AO, Martelli CMT, Batista LJ de A, Turchi MD. Healthcare-associated *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: Length of stay, attributable mortality, and additional direct costs. *Brazilian J Infect Dis*. 2012;16(6):503-9.
  13. Srinivasan V, Gillespie BE, Lewis MJ, Nguyen LT, Headrick SI, Schukken YH, et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet Microbiol*. 2007;124(3-4):319-28.
  14. Salinas L, Cárdenas P, Johnson TJ, Vasco K, Graham J, Trueba G. Diverse commensal *E. coli* clones and plasmids disseminate antimicrobial resistance genes in domestic animals and children in a semi-rural community in Ecuador. *bioRxiv*. 2019;(May).
  15. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42(1):49-52.
  16. Edna Carvajal B, Walter Hernández A, María Torres C, Diana López V, Egberto Rueda G, María Vásquez R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the bursa of Fabricius in broilers. *Rev Investig Vet del Peru*. 2019;30(1):430-7.
  17. del Pilar Sánchez Bonilla M, Murillo NPG, Almanza IJP. Prevalence of bovine mastitis in the Anaima canyon, a Colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. *Rev Investig Vet del Peru*. 2018;29(1):226-39.
  18. Braykov NP, Eisenberg JNS, Grossman M, Zhang L, Vasco K, Cevallos W, et al. Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in Northwestern Ecuador. *mSphere*. 2016;1(1):1-15.
  19. Congilosi JL, Aga DS. Review on the fate of antimicrobials, antimicrobial resistance genes, and other micropollutants in manure during enhanced anaerobic

- digestion and composting. *J Hazard Mater* [Internet]. 2021;405:123634. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123634>
20. Li H, Zheng X, Cao H, Tan L, Yang B, Cheng W, et al. Reduction of antibiotic resistance genes under different conditions during composting process of aerobic combined with anaerobic. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021;325(November 2020):124710. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124710>
  21. Belloso WH. Historia de los antibióticos, Reseña Histórica. *Rev Hosp Ital BAires* [Internet]. 2009;29(2):104-111. Disponible en: [https://www1.hospitalitaliano.org/multimedia/archivos/noticias\\_attachs/47/documentos/7482\\_102-111-belloso.pdf](https://www1.hospitalitaliano.org/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf)
  22. Sierra Benítez EM, León Pérez MQ. Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Rev Médica Electrónica*. 2019;41(5):1300-8.
  23. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex*. 2009;51(SUPPL.3):439-46.
  24. Facultad de Ciencias Médicas de Cienfuegos. Centro de Información. R, Pérez Ponce L, Castro Vega G, Pujol Pérez M, Barletta del Castillo J, Dueñas Pérez Y. *Medisur. MediSur* [Internet]. 2003;16(2):322-34. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2018000200015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2018000200015)
  25. García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA, et al. [Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights]. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2011;24(2):57-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666996>
  26. Dr. Tersilia García Castellanos, Dr. Arianna Castillo Marshal LDSR. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Rev Cuba Salud Pública* [Internet]. 2014;40. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662014000100013&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662014000100013&script=sci_arttext&tlng=pt)
  27. Casal M del M, Causse M, Rodríguez-López F, Casal M. Resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25(1):37-41.
  28. Merino LA. [ Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with

- high resistance to aminoglycosides in the cities of Resistencia and Corrientes , Republic of Argentina J. 2018;(April).
29. Rodríguez CA, Vesga O. Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. *Biomédica*. 2005;25(4):575.
  30. Trespacios AA, Regino WO, Reyes MM. Claritromicina Y Amoxicilina En Pacientes Colombianos. *Helicobacter*. 2010;31-8.
  31. Nancy Rivera F, Raúl Bustos B, Sonia Montenegro H, Marcelo Sandoval M, Juan Castillo N, Heriberto Fernández J, et al. Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Rev Chil Infectol*. 2011;28(6):555-62.
  32. (INFOSAN) RI de A de I de los A. Resistencia Antimicrobiana a Salmonella. 2005;
  33. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Soc Química México*. 2008;(May):13.
  34. González Alemán M. Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Rev Cubana Pediatr*. 2013;85(4):414-7.
  35. Infectol RC. *Neisseria gonorrhoeae*. 2017;34(3):47.
  36. Albelo AN, Tallet LAV, Tallet JIV, Álvarez LH. *Streptococcus pneumoniae*, mecanismos de resistencia antimicrobiana. *Rev Cubana Pediatr*. 2011;83(3):288-95.
  37. PALERMO FM. Secondary Bacterial Resistance. *Torax*. 1963;12:159-15962.
  38. Valdés MÁ. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev Habanera Ciencias Medicas*. 2017;16(3):402-19.
  39. Mamani ESC. Evaluación de la conciencia medio ambiental, en el manejo de desechos orgánicos en granjas pecuarias ubicadas en el cerro aruta, distrito gregorio albarracín, tacna-2015.
  40. Galarza JC, Ortiz HD, Toscano Morales CC. Manejo de desechos orgánicos y cumplimiento de la normativa legal ambiental en las avícolas de la provincia de Tungurahua. *Rev Digit Medio Ambient "Ojeando la agenda"*. 2016;44:13.
  41. Manna A La. Manejo de Residuos Orgánicos En Tambos [Internet]. INIA U de D e IT del, editor. Uruguay; 1992. 47 p. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2753/1/111219240807160023.pdf>
  42. Tobar X. Memroia De Sositenibilidad 2018. 2018;46. Disponible en:



- [https://www.pronaca.com/wp-content/uploads/2019/10/memoria\\_sostenibilidad\\_2018\\_cm.pdf](https://www.pronaca.com/wp-content/uploads/2019/10/memoria_sostenibilidad_2018_cm.pdf)
43. Ecoambiental. Eco ambiental Andina [Internet]. Disponible en: <https://ecoambiental.com.ec/>
  44. Luque A, Casares J, Masaquiza V. La gestión de residuos de las industrias lácteas: el caso de Ecuador. Univ Tecnológica Indoamérica Ambato. 2018;1-17.
  45. Pinos-Rodríguez JM, García-López JC, Peña-Avelino LY, Rendón-Huerta JA, González-González C, Tristán-Patiño F. Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de América. *Agrociencia*. 2012;46(4):359-70.
  46. Mesas JM, Alegre MT. El papel de los microorganismos en la elaboración del compostaje. *Jorn Técnica Fertil y Calid del Suelo*. 2011;2(38270):174-83.
  47. Agència de Residus de Catalunya. 4.4 Compostaje. Guía Los Trat Las Deyecciones Ganad [Internet]. 2004;1-4. Disponible en: <http://www.arc.cat/es/altres/purins/guia/pdf/ficha4.pdf>
  48. Román, Pilar; Martínez, María ;Pantoja A. Manual de compostaje del agricultor [Internet]. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 2015. 112 p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>
  49. Larrachea E. Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Rev Chil Neuropsiquiatr*. 1997;35(2):247-9.
  50. Angarita Merchán, Maritza; Torres Caicedo, María Inés; Díaz Torres K. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev Habanera Ciencias Medicas* [Internet]. 2017;16. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651/1867>
  51. Qian X, Sun W, Gu J, Wang XJ, Zhang YJ, Duan ML, et al. Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;220:425-32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.101>
  52. Sharma R, Larney FJ, Chen J, Yanke LJ, Morrison M, Topp E, et al. Selected Antimicrobial Resistance during Composting of Manure from Cattle Administered Sub- Therapeutic Antimicrobials. *J Environ Qual*. 2009;38(2):567-75.
  53. Wang C, Dong D, Strong PJ, Zhu W, Ma Z, Qin Y, et al. Microbial phylogeny determines transcriptional response of resistome to dynamic composting processes. *Microbiome*. 2017;5(1):103.

54. Lopez, O.; leon, J.; Jimenez, M.; Chaidez C, . Redalyc Cristóbal DETECCIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE Escherichia coli Y Salmonella EN AGUA Y SUELO AGRÍCOLA SUELO AGRÍCOLA DETECTION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF Escherichia coli AND Salmonella IN WATER AND AGRICULTURAL SOIL Osvaldo López Cuevas ,. Rev Fitotec Mex. 2009;32(2):119-26.
55. Qian X, Gu J, Sun W, Wang XJ, Su JQ, Stedfeld R. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. J Hazard Mater [Internet]. 2018;344:716-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020>
56. Orden Gutiérrez JA, De la Fuente López R. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. Rev Esp Salud Publica. 2001;75(4):313-20.
57. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? Evol Appl. 2015;8(3):240-7.
58. Heringa S, Kim J, Shepherd MW, Singh R, Jiang X. The presence of antibiotic resistance and integrons in escherichia coli isolated from compost. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(11):1297-304.
59. Suá NMA, Rez. Detección y caracterización de CTX-M en cepas de Enterobacterias recolectadas entre los años 1995 y 2007. 2011;27.
60. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type  $\beta$ -lactamasas: A successful story of antibiotic resistance. Int J Med Microbiol [Internet]. 2013;303(6-7):305-17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
61. García CS, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2010;28(SUPPL. 1):12-8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
62. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas in Italy: Molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(8):2700-6.
63. Hartmann A, Locatelli A, Amoureux L, Depret G, Jolivet C, Gueneau E, et al.

- Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Front Microbiol.* 2012;3(MAR):1-7.
64. Hossain MS, Ali S, Hossain M, Uddin SZ, Moniruzzaman M, Islam MR, et al. ESBL Producing *Escherichia coli* in Faecal Sludge Treatment Plants: An Invisible Threat to Public Health in Rohingya Camps, Cox's Bazar, Bangladesh. *Front Public Heal.* 2021;9(December).
65. Sukmawinata E, Uemura R, Sato W, Mitoma S, Kanda T, Sueyoshi M. IncI1 plasmid associated with bla<sub>CTX-M-2</sub> transmission in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy thoroughbred racehorse, Japan. *Antibiotics.* 2020;9(2):1-7.
66. Awasthi MK, Chen H, Awasthi SK, Duan Y, Liu T, Pandey A, et al. Application of metagenomic analysis for detection of the reduction in the antibiotic resistance genes (ARGs) by the addition of clay during poultry manure composting. *Chemosphere* [Internet]. 2019;220(2019):137-45. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.103>

## 16. ANEXOS

## Anexo N°1. Aval de Traducción



UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE  
COTOPAXI



CENTRO  
DE IDIOMAS

### *AVAL DE TRADUCCIÓN*

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: "ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ESCHERICHIA COLI BLEE EN EL PROCESO DE COMPOSTAJE DEL ESTIÉRCOL DE GANADO BOVINO COMPOSTADO EN UNA HACIENDA LECHERA EN QUITO – ECUADOR" presentado por: Jason Alexander Valencia Valarezo y Edwin Fernando Mesa Montalvo, egresados de la Carrera de: Medicina Veterinaria, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, 29 de marzo del 2022

Atentamente,



PATRICIA  
MARCELA CHACÓN  
PORRAS

Mg. Patricia Marcela Chacón Porras  
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC  
C.C: 0502211196



**Anexo N° 2 Hoja de vida Docente****1.- DATOS PERSONALES:**

**Nombre:** Molina Cuasapaz Edie Gabriel  
Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

**Lugar y fecha de Nacimiento:** Quito, 12 de julio 1990

**Edad:** 30 años **Género:** masculino

**Nacionalidad:** **Tiempo de Residencia en el Ecuador**  
**(Extranjeros):**

**Dirección Domiciliaria:** Pichincha Quito Solanda  
Provincia Cantón Parroquia  
 Av. Mariscal Sucre S25-225 y Alfredo Escudero  
Dirección

**Teléfono(s):** 022964757 0985728986  
Convencionales Celular o Móvil

**Correo electrónico:** 1722547278 **Cédula de Identidad:** 1722547278

**Tipo de sangre:** O positivo **Estado Civil:** soltero

**Personas con discapacidad:** N° de carné del CONADIS: NO POSEE

**2.- INSTRUCCIÓN FORMAL:**

Nivel de Instrucción	Nombre de la institución educativa	Título obtenido	Número de registro Senescyt	Lugar (país y ciudad)
Tercer nivel	Universidad Central del Ecuador	Médico Veterinario Zootecnista	1005-2016-1684132	Ecuador
Cuarto nivel	Universidad politécnica de Valencia Universidad Autónoma de Barcelona	Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción	7241137679	España

**DECLARACIÓN:** DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son verdaderos y no he ocultado ningún acto o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.

\_\_\_\_\_  
 Edie Gabriel Molina Cuasapaz

**Anexo N° 3. Hoja de Vida Estudiantes 1****1.- DATOS PERSONALES:**

**Nombre:** Mesa Montalvo Edwin Fernando

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombres

**Lugar y fecha de Nacimiento:** Atuntaqui, 12 de diciembre 1997

**Edad:** 24 años **Género:** masculino

**Nacionalidad:** **Tiempo de Residencia en el Ecuador**  
**(Extranjeros):**

**Dirección Domiciliaria:** Imbabura Antonio Ante San Francisco de Natabuela

Provincia

Cantón

Parroquia

Linea Ferrea, Calle 21 de noviembre

**Teléfono(s):** No Posee 0986387345

Convencionales

Celular o Móvil

**Correo electrónico:** [acaedwin95@hotmail.com](mailto:acaedwin95@hotmail.com) **Cédula de Identidad:** 1003293121

**Tipo de sangre:** O positivo **Estado Civil:** soltero

**Personas con discapacidad:** N° de carné del CONADIS: NO POSEE

**DECLARACIÓN:** DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son auténticos y no he encubierto ningún acto o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.

\_\_\_\_\_  
Edwin Fernando Mesa Montalvo

**Anexo N°4. Hoja de Vida Estudiante 2****Hoja de Vida****1.- DATOS PERSONALES:**

**Nombre:** Valencia Valarezo Jason Alexander  
Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

**Lugar y fecha de Nacimiento:**

**Edad:** 23 **Género:** masculino

**Nacionalidad:** **Tiempo de Residencia en el Ecuador**  
**(Extranjeros):**

**Dirección Domiciliaria:** Cotopaxi Latacunga Las fuentes  
Provincia Cantón Parroquia  
Calle Manabí  
Dirección

**Teléfono(s):** 0986196795  
Convencionales Celular o Móvil

**Correo electrónico:** jason.valencia7861@utc.edu.ec **Cédula de Identidad:** 1805737861

**Tipo de sangre:** O positivo **Estado Civil:** soltero

**Personas con discapacidad:** N° de carné del CONADIS: NO POSEE

**DECLARACIÓN:** DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son verídicos y no he reservado ningún suceso o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.

\_\_\_\_\_  
Jason Alexander Valencia Valarezo

### Anexo N° 5 Tabla de Cuantificación

Tabla 8: Cuantificación de Bacterias con TBX y TBX +CRO

Muestra	TBX			dilución	UFC E. coli/ml
	R1	R2	R3		
1	100000	100000	100000	-4	10000000,0
2	31	5	15	-3	170,0
3	100000	19	500	-6	335063,3

Muestra	TBX+CRO			dilución	UFC E. coli BLEE/ml
	R1	R2	R3		
1	0	6	0	-4	200,0
2	0	0	0	-3	0,0
3	10	0	12	-3	73,3

### Anexo N° 6 Trabajo de Campo y Laboratorio

Figura 3: Recolección de Muestras





Figura 4: Preparación del Agar TBX para cultivos



Figura 5: Dilución de Muestras



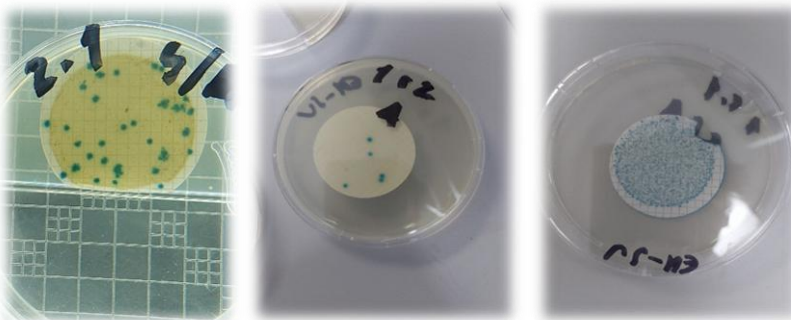
Figura 6: Cultivos Bacterianos en Agar TBX con y sin antibiótico.



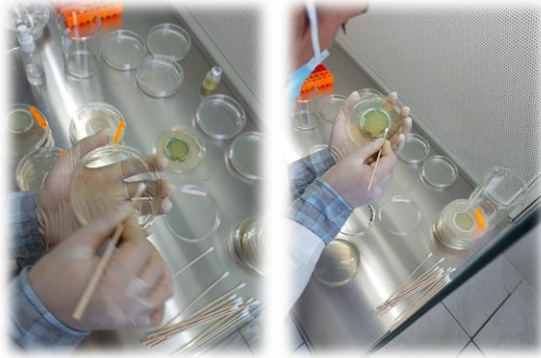
Figura 7: Filtración de diluciones en filtro nanopore



Figura 8: Crecimiento de las bacterias Escherichia coli.



**Figura 9: Repique de Colonias y sembrado en nuevas placas**



**Figura 10: Cultivos puros**



**Figura 11: Raspado de colonias y cultivado a tubos eppendorf con TE y Soja Tríplica.**



Figura 12: Tubos eppendorf con colonias y extracción de ADN

