



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

**Título:**

---

**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA  
REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN  
LA HACIENDA LYG FARM EN QUITO – ECUADOR.**

---

Proyecto de Investigación Presentado Previo a la obtención del Título de Médicos  
Veterinarios Zootecnistas.

**Autores:**

Mancheno Saavedra Rossana Carolina

Ponce Haro Dilan Rafael

**Tutor:**

Molina Cuasapaz Edie Gabriel

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Marzo 2022**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

ROSSANA CAROLINA MANCHENO SAAVEDRA con cedula de ciudadanía 172682441-8 y DILAN RAFAEL PONCE HARO con cedula de ciudadanía 235039504-8 declaramos ser autores del presente Proyecto de Investigación: “**Caracterización de la diversidad de resistencia antimicrobiana en los procesos de biodigestión para la reducción de *escherichia coli* BLEE de los residuos lecheros en la hacienda LYG FARM en Quito – Ecuador**”, siendo el médico veterinario y zootecnista 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, 23 de marzo de 2022

Rossana Carolina Mancheno Saavedra  
ESTUDIANTE  
C.C: 172682441-8

Dilan Rafael Ponce Haro  
ESTUDIANTE  
C.C: 235039504-8

Edie Gabriel Molina Cuasapaz  
DOCENTE TUTOR  
C.C: 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 de, **MANCHENO SAAVEDRA ROSSANA CAROLINA** identificada con **C.C. N° 172682441-8** de estado civil soltera a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. 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.** - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM EN QUITO – ECUADOR”** el 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 de Consejo Directivo: 07 de enero de 2022

Tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz.

Tema: **“CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM 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, **LA 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 **LA 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.
- f) 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 **LA 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 **LA 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 **LA CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuartas, 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 23 días del mes de marzo del 2022

Rossana Carolina Mancheno Saavedra  
**LA 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 de, **PONCE HARODILAN RAFAEL** identificada con C.C. N° **235039504-8** de estado civil soltero a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. 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 “**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM EN QUITO – ECUADOR**”, el 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 de Consejo Directivo: 07 de enero de 2022

Tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz.

Tema: “**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM 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.
- f) 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 las cláusulas cuartas, 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 23 días del mes de marzo del 2022

Dilan Rafael Ponce Haro  
**EL CEDENTE**

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez  
**LA CESIONARIA**

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

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

**“CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM EN QUITO – ECUADOR”** de Mancheno Saavedra Rossana Carolina y Ponce Haro Dilan Rafael 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 ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 23 de marzo de 2022

MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

DOCENTE TUTOR

C.C: 1722547278

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

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: Mancheno Saavedra Rossana Carolina y Ponce Haro Dilan Rafael, con el título del Proyecto de Investigación: **“CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM 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, 23 de marzo de 2022

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

MVZ. Mg. Cristian Beltrán Romero  
CC:050194294-0

### **Lector 2**

MVZ. Mtr. Vanessa del Rosario Herrera Yunga  
CC: 110375899-9

### **Lector 3**

MVZ. Mg. Byron Andrés Valencia Bustamante  
CC: 171962264-7

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, por su afecto, su complicidad y su esfuerzo en brindarme lo mejor, especialmente la educación. Sin sus enseñanzas, valores y apoyo, nada de esto sería posible.

Agradezco a la universidad que me permitió aprender, crecer, vivir; pero sobre todo que me cruzó en el camino con personas excepcionales que hoy en día son mis grandes amigos, esos locos hicieron de este largo camino universitario, uno lleno de emociones, sentimientos y momentos increíbles, sin ellos nada sería lo mismo.

Agradezco a todos quienes formaron parte de este logro de una u otra forma, con sus palabras, su apoyo y su confianza; a mi familia la que ha estado presente en todo este proceso y a todos mis amigos, Mil Gracias.

Finalmente, es importante agradecer a nuestro tutor y algunos docentes que nos han ayudado en esta recta final para culminar una de las etapas más importantes de mi vida, ellos han estado guiándonos y ayudándonos en la realización de este proyecto; de la misma forma a Dilan, más que mi compañero de tesis ha sido un amigo inigualable con el que he podido compartir conocimientos y grandes vivencias.

Al culminar esta etapa no puedo pensar en las complicaciones y malos momentos, al contrario, me siento totalmente agradecida por todo lo bueno que recibí en estos años de carrera universitaria que me hicieron lo que soy ahora.

*Rossana Carolina Mancheno Saavedra*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por siempre haber estado presente en mi vida y apoyarme en cada una de las metas que me he propuesto, a mis abuelos por su amor incondicional y todo su apoyo en mi para cumplir esta meta, también a mi hermano quien más de una vez me dijo que si podría lograrlo, y sí, lo logré.

A Carolina mi compañera de tesis y universidad, pero sobre una gran amiga que gane en mi vida, por haber estado presente desde el inicio de la carrera, sin duda cada semestre fue una gran aventura y esta ha sido la más grande que hemos cumplido juntos, y ojalá no sea la última.

A cada uno de mis amigos presentes en esta loca vida universitaria, sin duda ustedes le dieron mucho sentido a esta etapa de mi vida, y aunque ya culmino y cada uno tomara rumbos diferentes, espero siempre poder contar con ustedes y que nuestra amistad se mantenga intacta.

A mi mejor amiga, siempre creyó que podría lograrlo y siempre me dijo que vibrara alto, tu apoyo fue muy importante durante todo este tiempo para alcanzar mi meta, así como mis amigos Jefferson y Navarrete, sus palabras para continuar y culminar mi carrera ha sido muy importante para mí.

Por último, a nuestro tutor, quien con su paciencia y conocimientos me mostró un mundo que desconocía, y que gracias a sus aportes este trabajo ha culminado y una de las etapas más importantes en mi vida también llega a su final.

*Dilan Rafael Ponce Haro*

## **DEDICATORIA**

En primer lugar, este trabajo lo dedico a todas las personas que creyeron en mí y jamás dejaron de darme su apoyo y ánimo para terminar con este último escalón, especialmente a mis padres; ellos han sido mi soporte y mi guía.

Pero, sobre todo, me dedico este trabajo a mí misma como prueba de que soy capaz de lograr esta y muchas cosas más, siendo este solo el inicio de muchos sueños y metas más por cumplir en el ámbito profesional y personal.

Todo parece imposible, hasta que se hace; y el esfuerzo es la magia que transforma los éxitos en realidad.

Ser Médica Veterinaria, es solo el inicio de una cadena de anhelos que aún quedan por cumplir, porque los sueños ¡Sí! se cumplen.

*Rossana Carolina Mancheno*

## **DEDICATORIA**

Sin duda detrás de este logro, hay muchas personas que, con sus palabras, su apoyo y su confianza me han ayudado a cumplir una de mis metas más importantes, este trabajo es para cada una de ellas, que de alguna u otra manera estuvieron presentes en este largo camino.

Sobre todo, este trabajo y tiempo invertido, me lo dedico a mí mismo; ha sido una de las metas más ambiciosas que he tenido, así que me siento orgulloso y feliz de haberlo culminado, pues este será el inicio de muchos más retos en mi vida profesional y personal

*Dilan Rafael Ponce Haro*

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE *Escherichia coli* BLEE DE LOS RESIDUOS LECHEROS EN LA HACIENDA LYG FARM EN QUITO – ECUADOR”.**

**AUTORES:** Mancheno Saavedra Rossana Carolina  
Ponce Haro Dilan Rafael

### RESUMEN

Las producciones bovinas lecheras de nuestro país no llevan un correcto manejo de los residuos pues terminan en fosas de almacenamiento, en fuentes hídricas y usados con fines agrícolas. El problema del mal manejo de residuos radica en la contaminación ambiental y en la diseminación de agentes patógenos, como la *E. coli*, catalogada como multirresistente. El uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos a lo largo de los años, sobre todo, en producciones pecuarias ha provocado esto. Por lo cual, se realizó esta investigación con el objetivo de utilizar un biodigestor para reducir la cantidad de *E. coli* BLEE presente en los residuos lecheros. De modo que, se tomó 3 puntos de muestreo, al inicio (SP1), durante (SP2) y después (SP3) del proceso de biodigestión, y el recuento total de *E. coli* y *E. coli* BLEE se calculó mediante filtración en TBX y TBX combinado con 5 µl/ml cefotaxima, mientras que, la susceptibilidad a 21 antimicrobianos pertenecientes a 10 familias se evaluó mediante método Kirby-Bauer y los genes bla<sub>CTX-M</sub> grupos 1, 2, 8 y 9 se analizaron mediante PCR múltiple.

SP1 cuantificó 2833.3 UFC/ml de *E. coli* BLEE, mientras que SP3 presentó 0.75 UFC/ml, su reducción podría ser por factores como la temperatura mesófila y la sintrofia debido a los microorganismos presentes en el biodigestor. Se aislaron 16 muestras de *E. coli* BLEE para su análisis, donde mostró multirresistencia a 15 de los 21 antimicrobianos usados, en SP1 se reportó resistencia a 7, mientras que SP3 se reportaron 14, el aumento se indicó por las características evolutivas de *E. coli* y otros factores que inciden en el proceso de biodigestión. Por otro lado, el análisis del gen bla<sub>CTX-M</sub> los grupos 2 y 8 fueron los que obtuvieron mayor prevalencia, inclusive el proceso de biodigestión redujo en un 75% la presencia de *E. coli* con el gen bla<sub>CTX-M-2</sub> del SP1 al SP3.

La investigación determinó que se redujo la presencia de *E. coli* BLEE, lo que permitiría obtener fertilizantes con menor presencia de patógenos siendo un beneficio para la salud pública, pero no es el caso de la resistencia antimicrobiana, ya que los mecanismos genéticos de la *E. coli* no permitió la reducción de esta, por lo que se tendría que determinar otros métodos que permitan reducir la multirresistencia.

**Palabras Clave:** *Escherichia coli*, BLEE, biodigestor, antimicrobiano.

# TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

## FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

**THEME: “CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE DIVERSITY IN BIODIGESTION PROCESSES FOR THE REDUCTION OF ESCHERICHIA COLI BLEE FROM DAIRY WASTE AT THE LYG FARM IN QUITO - ECUADOR.”**

**AUTHORS:** Mancheno Saavedra Rossana Carolina  
Ponce Haro Dilan Rafael

### ABSTRACT

Dairy cattle production in our country does not have correct waste management since they end up in storage pits, in water sources, and used for agricultural purposes. The problem of poor waste management lies in environmental contamination and the dissemination of pathogenic agents, such as *E. coli*, classified as multi-resistant. The excessive and inadequate use of antimicrobials, especially in livestock production, has caused this. Therefore, this research was carried out to use a biodigester to reduce the amount of *E. coli* BLEE present in the dairy waste. So, three sampling points were taken, at the beginning (SP1), during (SP2), and after (SP3) the digestion process, and the total *E. coli* and *E. coli* BLEE counts were calculated. Coli BLEE counts were calculated by TBX filtration and TBX combined with 5 µl/ml cefotaxime, while susceptibility to 21 antimicrobials belonging to 10 families was evaluated by the Kirby-Bauer method and blaCTX-M genes groups 1, 2, 8 and 9 were analyzed by multiplex PCR. SP1 quantified 2833.3 CFU/ml of *E. coli* BLEE, while SP3 presented 0.75 CFU/ml. Its reduction could be due to mesophilic temperature and syntrophy due to the microorganisms present in the biodigester. Sixteen samples of *E. coli* BLEE were isolated for analysis, where it showed multi-resistance to 15 of the 21 antimicrobials used; SP1 reported resistance to 7, while SP3 reported 14. The increase was indicated by the evolutionary characteristics of *E. coli* and other factors that affect the digestion process. Then, in the blaCTX-M gene analysis, groups 2 and 8 obtained the highest prevalence, including the digestion process reduced by 75% the presence of *E. coli* with the blaCTX-M-2 gene from SP1 to SP3. The research determined that the presence of *E. coli* BLEE was reduced, which would allow obtaining fertilizers with less presence of pathogens being a benefit for public health. However, it is not the case of antimicrobial resistance since the genetic mechanisms of *E. coli* did not reduce this, so other methods that allow for reducing multi-resistance would have to be determined.

**Keywords:** Escherichia Coli, BLEE, Biodigester, Antimicrobial.

## ÍNDICE

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 DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	ix
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE TITULACIÓN .....	x
AGRADECIMIENTOS .....	xi
DEDICATORIA .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1
Título del Proyecto: .....	1
Fecha de inicio:.....	1
Fecha de finalización: .....	1
Lugar de ejecución:.....	1
Unidad Académica que auspicia: .....	1
Carrera que auspicia:.....	1
Proyecto de investigación vinculado: .....	1
Equipo de Trabajo:.....	1
Área de Conocimiento: .....	1
Línea de investigación: .....	1
Sub líneas de investigación de la Carrera: .....	1
2. RESUMEN DEL PROYECTO .....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	3
4. BENEFICIARIOS .....	5
4.1 Beneficiarios directos .....	5

4.2 Beneficiarios indirectos .....	6
5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN: .....	6
6. OBJETIVOS .....	8
6.1 General .....	8
6.2 Específicos.....	9
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	9
8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	10
8.1 Residuos Orgánicos.....	11
8.1.1 Estiércol .....	11
8.1.2 Composición del estiércol .....	11
8.1.2.1 Presencia de microorganismos .....	11
8.1.3 Situación actual del manejo de residuos orgánicos .....	12
8.1.3.1 Impacto del manejo actual de residuos orgánicos .....	12
8.1.4 Alternativas del manejo de residuos ganaderos.....	13
8.2 Biodigestor .....	13
8.2.1 Funcionamiento del Biodigestor .....	13
8.2.2 Digestión Anaerobia .....	14
8.2.2.1 Factores determinantes en la digestión anaerobia .....	15
8.2.2.2 Microorganismos involucrados en la biodigestión.....	16
8.2.3 Biodigestor Home Biogás 2.0.....	19
8.3 Biol .....	19
8.3.1 Elaboración de Biol.....	20
8.3.2 Beneficios del Biol.....	22
8.4 Resistencia Antimicrobiana .....	22
8.4.1 Historia y epidemiología de la resistencia antimicrobiana .....	23

8.4.2 Genoma Bacteriano.....	23
8.4.3 Tipos de resistencia antimicrobiana .....	24
8.4.4 Bases genéticas de adquisición de resistencia antimicrobiana. ....	25
8.4.5 Mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias .....	26
8.5 <i>E. coli</i> BLEE.....	27
8.5.1 Generalidades .....	27
8.5.2 Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).....	28
8.5.3 Hallazgos de <i>E. coli</i> BLEE en el Ecuador .....	29
9. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS .....	30
9.1 Hipótesis Nula .....	30
10. METODOLOGÍAS / DISEÑO EXPERIMENTAL .....	30
10.1 Lugar de experimentación.....	30
10.1.2 Ubicación Geográfica.....	30
10.3 Instrumentos .....	31
10.4 Trabajo de campo.....	31
10.5 Trabajo de laboratorio .....	32
10.5.1 Cuantificación.....	32
10.1.2 Antibiogramas .....	33
10.5.3 Extracción de ADN.....	35
10.5.4 Técnica de PCR múltiple para análisis <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	36
11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	37
11.1 Cuantificación.....	37
11.2 Antibiogramas.....	40
11.3 Análisis <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	44
12. IMPACTOS SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS .....	47
12.1 Impacto Ambiental: .....	47

12.2 Impacto Social: .....	47
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	48
13.1 Conclusiones .....	48
13.2 Recomendaciones.....	49
14. BIBLIOGRAFÍA.....	49
15. ANEXOS.....	61
Anexo N° 1.....	61
Anexo N° 2.....	62
Anexo N° 3.....	64
Anexo N° 4.....	65
Anexo N° 5.....	66
Anexo N° 6.....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Bacterias que participan en el proceso de fermentación durante las cuatro fases.....	17
<b>Tabla N° 2:</b> Familia de cada uno de los antibióticos usados y su respectiva abreviatura. ....	33
<b>Tabla N° 3:</b> Parámetros de susceptibilidad de los antibióticos utilizados. ....	34
<b>Tabla N° 4:</b> Protocolo m-PCR de identifican de la familia génica bla <sub>CTX-M</sub> .....	36
<b>Tabla N° 5:</b> Cuantificación de <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> BLEE en los puntos de muestreo. ....	39
<b>Tabla N° 6:</b> Comparación de la reducción de <i>E. coli</i> BLEE entre el SP1 y SP3. (Resultados expresados en porcentajes) .....	39
<b>Tabla N°7:</b> Prueba estadística de la resistencia y sensibilidad a los diferentes antimicrobianos. ....	42
<b>Tabla N°8:</b> Genotipificación de los genes bla <sub>CTX-M</sub> a partir de <i>E. coli</i> BLEE aislada de los residuos ganaderos del proceso de biodigestión.....	45
<b>Tabla N°9:</b> Comparación del gen bla <sub>CTX-M-2</sub> a la entrada (SP1) y salida (SP3) del biodigestor... ..	46
<b>Tabla N° 10:</b> Datos del conteo de unidades formadoras de colonias TBX por cada mililitro.....	66
<b>Tabla N° 11:</b> Datos del conteo de unidades formadoras de colonias TBX + Cefotaxima (CTX) por cada mililitro. ....	66

## ÍNDICE DE IMAGENES

<b>Imagen N° 1:</b> Cadena del biodigestor. ....	21
<b>Imagen N° 2:</b> Mapa genómico circular de <i>E. coli</i> . ....	24
<b>Imagen N° 3:</b> Ubicación geográfica por vista satelital. ....	30

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1.</b> Frecuencia de presentación de <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> BLEE, en los puntos de muestreo del paso de los residuos lecheros por el biodigestor. (La concentración de bacterias está expresada en UFC/ml).....	37
<b>Gráfico N° 2.</b> Perfil de susceptibilidad de las <i>E. coli</i> BLEE a ceftriaxona aisladas de la hacienda lechera LYG. ....	40
<b>Gráfico N° 3.</b> Comparación del perfil de susceptibilidad de las <i>E. coli</i> BLEE a ceftriaxona aisladas de la hacienda lechera LYG, del Punto 1 (SP1) y Punto 3 (SP3). (Valores expresados en unidades).....	41
<b>Gráfico N°4:</b> Comparación de la presencia de genes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> de los cultivos de <i>E. coli</i> BLEE obtenidos en la hacienda lechera LYG FARM. (Datos expresados en porcentaje).....	44

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

### **Título del Proyecto:**

Caracterización de la diversidad de resistencia antimicrobiana en los procesos de biodigestión para la reducción de *Escherichia coli* BLEE de los residuos lecheros en la hacienda LYG FARM en Quito – Ecuador.

**Fecha de inicio:** Octubre de 2021

**Fecha de finalización:** Febrero 2022

### **Lugar de ejecución:**

Santa Clara – La Ecuatoriana – Quito – Pichincha – Zona 2

### **Unidad Académica que auspicia:**

LSI-EC Life Science Initiative Ecuador

### **Carrera que auspicia:**

Medicina Veterinaria

### **Proyecto de investigación vinculado:**

Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana, con enfoque “Una sola salud”.

### **Equipo de Trabajo:**

- **Tutor:** Edie Gabriel Molina Cuasapaz. (Anexo N° 2)
- **Estudiantes:** Rossana Carolina Mancheno Saavedra (Anexo N° 3) – Dilan Rafael Ponce Haro (Anexo N°4).

### **Área de Conocimiento:**

2415.01 / Biología Molecular / Biología Molecular de Microorganismos

### **Línea de investigación:**

Desarrollo y Seguridad Alimentaria.

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

Microbiología, Parasitología, Inmunología y Sanidad Animal.

## 2. RESUMEN DEL PROYECTO

Las producciones bovinas lecheras de nuestro país no llevan un correcto manejo de los residuos pues terminan en fosas de almacenamiento, en fuentes hídricas y usados con fines agrícolas. El problema del mal manejo de residuos radica en la contaminación ambiental y en la diseminación de agentes patógenos, como la *E. coli*, catalogada como multirresistente. El uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos a lo largo de los años, sobre todo, en producciones pecuarias ha provocado esto. Por lo cual, se realizó esta investigación con el objetivo de utilizar un biodigestor para reducir la cantidad de *E. coli* BLEE presente en los residuos lecheros. De modo que, se tomó 3 puntos de muestreo, al inicio (SP1), durante (SP2) y después (SP3) del proceso de biodigestión, y el recuento total de *E. coli* y *E. coli* BLEE se calculó mediante filtración en TBX y TBX combinado con 5 µl/ml cefotaxima, mientras que, la susceptibilidad a 21 antimicrobianos pertenecientes a 10 familias se evaluó mediante método Kirby-Bauer y los genes bla<sub>CTX-M</sub> grupos 1, 2, 8 y 9 se analizaron mediante PCR múltiple.

SP1 cuantificó 2833.3 UFC/ml de *E. coli* BLEE, mientras que SP3 presentó 0.75 UFC/ml, su reducción podría ser por factores como la temperatura mesófila y la sintrofia debido a los microorganismos presentes en el biodigestor. Se aislaron 16 muestras de *E. coli* BLEE para su análisis, donde mostró multirresistencia a 15 de los 21 antimicrobianos usados, en SP1 se reportó resistencia a 7, mientras que SP3 se reportaron 14, el aumento se indicó por las características evolutivas de *E. coli* y otros factores que inciden en el proceso de biodigestión. Por otro lado, el análisis del gen bla<sub>CTX-M</sub> los grupos 2 y 8 fueron los que obtuvieron mayor prevalencia, inclusive el proceso de biodigestión redujo en un 75% la presencia de *E. coli* con el gen bla<sub>CTX-M-2</sub> del SP1 al SP3.

La investigación determinó que se redujo la presencia de *E. coli* BLEE, lo que permitiría obtener fertilizantes con menor presencia de patógenos siendo un beneficio para la salud pública, pero no es el caso de la resistencia antimicrobiana, ya que los mecanismos genéticos de la *E. coli* no permitió la reducción de esta, por lo que se tendría que determinar otros métodos que permitan reducir la multirresistencia.

Palabras Clave: *Escherichia coli*, BLEE, biodigestor, antimicrobiano.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Es principalmente alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes que provocan infecciones que no pueden tratarse con los antimicrobianos. La línea de progreso clínico de nuevos antimicrobianos está agotada, en el 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó 32 antimicrobianos en fase de desarrollo clínico contra la lista de patógenos prioritarios, de los que solo seis clasificaron como innovadores dándonos menos probabilidades de manejar temas prioritarios de salud. (1) No obstante, a pesar del desarrollo tecnológico que tenemos en la actualidad, se podría pensar que debería ser mucho más posible desarrollar distintos tipos de antimicrobianos, pero la realidad es otra y el mejoramiento tecnológico no es suficiente. La creación de antimicrobianos nuevos lleva años sin resultados significativos, en la década de 1980 se introdujeron las fluoroquinolonas, siendo los últimos completamente nuevos, posteriormente solo se han desarrollado variantes de los antimicrobianos ya existentes. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos antimicrobianos requiere una fuerte inversión económica y teniendo en cuenta la crisis económica que se observa a nivel mundial, pues es muy complejo que las diferentes farmacéuticas internacionales inviertan en la investigación de nuevos antimicrobianos. (2)

En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) es la entidad gubernamental que se encarga de monitorear la resistencia antimicrobiana (RAM) hasta el año 2017, en donde participaron 44 hospitales centinelas de la Red Pública y complementaria de salud con vigilancia a la RAM recolectando datos que evidenciaron, por ejemplo que la *E. coli* presentó 33.554 casos alcanzando un porcentaje del 61% en relación con otros microorganismos, sumado a esto, presenta resistencia a las cefalosporinas mayores o iguales al 50% en comparación a otros antimicrobianos. (3) De todos modos, se supone que, a pesar de la falta de datos desde la última vigilancia, en los años siguientes esta tasa ha aumentado claramente debido a ciertos factores como el uso indebido y excesivo de antimicrobianos, la falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene, medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades en los centros de atención de salud y las explotaciones agropecuarias, la falta de sensibilización y conocimientos y el incumplimiento de la legislación; factores que necesitan ser manejados de otra manera para cambiar esta realidad en nuestro país.

A partir de los factores expuestos, el manejo de los residuos ganaderos en la producción lechera de bovinos es uno de los problemas más serios que ha tenido durante muchos años

debido a varios manejos inadecuados, destacándose principalmente la acumulación de excretas en contenedores o al aire libre, el arrojado de excretas a fuentes hídricas y la mala utilización de estas como fertilizantes orgánicos aplicándolas directamente al suelo. De hecho, actualmente se han reportado bacterias resistentes a los antimicrobianos en el Ecuador, entre ellas la *E. coli* BLEE (significado del inglés Extended-spectrum beta-lactamase), una bacteria con rápida diseminación, a través de las heces fecales, en las cuales se ha confirmado que entre un 30 y un 90 % de los antimicrobianos usados en animales aparecen en los residuos sólidos y líquidos. (4) Entonces, la diseminación de *E. coli* BLEE se ve favorecida en las ganaderías productoras de leche, especialmente cuando no se aplica un buen manejo de los residuos ganaderos, ya que tanto los productores grandes como pequeños no lo realizan y los pocos que tienen un plan de manejo, con suerte poseen un pozo donde se dirigen todos los desechos producto de la ganadería, pero no tiene un tratamiento de saneamiento como tal, otros utilizan las mismas heces para nutrir los suelos de los pastizales e incluso algunos cultivos de vegetales, y en el peor de los casos algunos las dirigen directamente hacia las vertientes hídricas, haciendo que la bacteria se pueda encontrar en cualquier medio posible.

Así es como lo reporta Ortega D. y otros, en su estudio realizado en el río Machángara del centro urbano de la ciudad de Quito, en el que se encontró la presencia de *E. coli* resistente a cefotaxima en una cuantificación de  $2.7 \times 10^3$  (SP4) y  $5.4 \times 10^5$  (SP9) UFC/100 ml, muy parecido a lo encontrado en aguas residuales de un hospital. (5) Mientras que, en otro estudio realizado con muestras de vegetales de un mercado municipal en la ciudad de Quito, se encontró en la lechuga, cilantro y alfalfa la presencia de CFU/g en un 5,4 y 15, respectivamente. (6)

Con lo mencionado anteriormente, el déficit de manejo de los residuos ganaderos de las producciones bovinas lecheras se pueden volver una fuente de diseminación de bacterias resistentes y las mismas podrían encontrarse fácilmente en el centro urbano de cualquier ciudad, lo que causaría mucha preocupación, ya que la misma bacteria puede entrar en contacto con las personas y con otras especies animales de una manera muy fácil, generando un problema en la salud pública, lo cual pone en alerta a médicos, médicos veterinarios y demás personal relacionado con la salud, no solo por la presencia de bacterias resistentes sino también por la contaminación ambiental que las producciones lecheras son capaces de generar. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en nuestro país, Pichincha lidera la lista con un

porcentaje de 33% de impacto ambiental en actividades ganaderas debido a las soluciones superficiales o escasas que se están llevando a cabo, esto también por el desconocimiento de las alternativas existentes y los beneficios que trae consigo un adecuado manejo de residuos ganaderos. (7)

Pero ¿Por qué la resistencia antimicrobiana representa un problema en el ámbito de salud pública en la actualidad y a futuro? La resistencia antimicrobiana a nivel mundial y nacional tiene fuertes impactos en términos de morbilidad, mortalidad y costos, convirtiéndolo así en un problema multicausal de enorme complejidad. A partir de esto, podemos fijarnos en datos de la OMS donde estima que 700.000 personas mueren cada año debido a infecciones resistentes a los antimicrobianos, así mismo otros informes revelan que en el 2050 la resistencia antimicrobiana será la principal causa de defunción a nivel global. (8) Además, debemos tener en cuenta que las opciones de tratamiento a causa de infecciones por bacterias resistentes son totalmente limitadas, pues estos han desarrollado mecanismos para resistir ante antimicrobianos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, penicilinas de amplio espectro y aztreonam. (9)

Por lo tanto, se considera que los productores pecuarios son un punto clave para que la propagación de este tipo de bacterias comience a disminuir, además la población en general debe ser consciente de que las bacterias resistentes existen y el paso del tiempo ocasionará que no exista antimicrobiano alguno que logre contrarrestar su efecto, lo cual con mayor razón nos lleva a que busquemos otros tipos de métodos relacionados con el tratamiento de residuos ganaderos de origen animal y residuos orgánicos de origen humano para que al momento de ser procesados sean devueltos al medio ambiente libre de microorganismos altamente patógenos.

Desde el enfoque de una sola salud, es como esta investigación pretende dar lugar a nuevas alternativas para intentar entender y solucionar uno de los inconvenientes más controversiales actualmente, cuidando no solo el bienestar animal, sino también el impacto ambiental, la seguridad e inocuidad alimentaria y por ende la salud humana añadiendo los beneficios productivos que brinda a la explotación lechera como tal.

## **4. BENEFICIARIOS**

### **4.1 Beneficiarios directos**

Estudiantes de Medicina Veterinario previo a obtener el título universitario.

Personal que trabaja en la Hacienda LYG Farm.

#### **4.2 Beneficiarios indirectos**

Pobladores del sector rio abajo de la hacienda que utilizan el agua del río.

Pequeños y medianos ganaderos y agricultores del sector y de la región.

### **5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:**

La producción bovina es una de las actividades más antiguas y tradicionales, en cualquier medio, debido a que su principal propósito es la obtención de alimentos. A nivel mundial en el año 2013 se produjo alrededor de 770.000 millones de litros, estos logran representar el 14% del comercio agrícola mundial, se estima que existen alrededor de 133 millones de establecimientos que poseen ganado lechero, pero para que esto suceda el ganado lechero depende de los recursos naturales como son la tierra y el agua, por lo cual, se calcula que solo el ganado lechero ocupa alrededor de 150 millones de hectáreas de tierra cultivable. (10)

En lo que se refiere a América Latina, la Federación Panamericana de la Lechería (FEPALE) en un informe sobre el estado de la cadena láctea en 2018, aseveró que la producción de leche en los países de esta región se deriva casi exclusivamente de las vacas, con datos que muestran que al menos 3,3 millones fabricantes dedicados a esta actividad. (11)

Ahora bien, en el Ecuador existen 300 mil Unidades Productivas Agropecuarias y mediante la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria realizada en el 2019 se refleja la existencia de 4,31 millones de cabezas de ganado a nivel nacional, de los cuales 996.503 corresponde al número de vacas ordeñadas evidenciando una producción diaria de leche de 6,65 millones de litros. (12) De esta cifra el 20% se queda en las fincas para el autoconsumo, el 30% se mueve en el mercado informal y el 50% restante va a la industria de lácteos, así lo detallo Rodrigo Gallegos, director ejecutivo del Centro de la Industria Láctea del Ecuador (CIL). (13)

Teniendo en cuenta estos datos, uno de los principales problemas y de los más criticados en las producciones bovinas de leche, es la cantidad de residuos sólidos y líquidos que estos son capaces de generar, ya que un solo bovino adulto es capaz de producir de 20 a 30 e incluso más kg de heces totales en un solo día, mientras que en lo que respecta al volumen de orina son capaces de producir de 6 a 12 litros al día. Considerando que, la

cantidad de residuos totales de la producción lechera dependerá de la cantidad de horas en que los animales permanezcan en el establo o sala de ordeño, pues estos serán los residuos que se podrán manejar.

Comúnmente estos desechos sólidos y líquidos no son manejados de manera adecuada y se supone que las entidades gubernamentales establecen protocolos para el manejo de estos, sin embargo, en nuestro país tal parece que estos protocolos solo están dirigidos a las producciones bovinas intensivas por la cantidad de animales que poseen y a pesar de esto no se cumplen en su totalidad. Es así como la mayoría de los establecimientos bovinos independientemente del tipo de sistema de producción que tengan generan una acumulación de residuos ganaderos, los cuales en su gran mayoría son enviados a fosas de almacenamiento ubicadas al aire libre, otros son arrojados directamente a fuentes hídricas y los demás incorporados a terrenos con fines agrícolas. Resultado de esto, el sector agrícola hasta el 2012 contribuyó con el 18,17% del total de emisiones de gases de efecto invernadero, dentro de este, el 43,43 % y el 2,34 % correspondían a la fermentación entérica y manejo del estiércol respectivamente conforme lo dice el Ministerio de Ambiente en 2017, y el porcentaje restante incluye a otras problemáticas como los riesgos de desertificación y proliferación de microorganismos patógenos altamente resistentes. (14)

Así es como llegamos hasta la resistencia bacteriana, concepto bastante escuchado en la actualidad, especialmente por el uso indiscriminado de antimicrobianos que han ocasionado una variación en la funcionalidad de varios microorganismos a través de mutaciones al azar dando lugar a las también denominadas superbacterias, estas actúan creando mecanismos de resistencia y de adaptación en contra de este tipo de medicamentos, haciendo que el tratamiento para eliminar dichas bacterias del organismo sea más difícil. (1) Pero no solo la mala suministración de antimicrobianos ha sido causal para la evolución de estas superbacterias, sino también el mal manejo de desechos sólidos y líquidos que justamente discutimos con anterioridad.

Como efecto de esto, una de las bacterias que tiene mayores estudios debido a su capacidad de resistencia que ha aumentado en los últimos años, es la *E. coli* BLEE, la cual, debido al uso de los antimicrobianos en la terapéutica ambulatoria, ha aumentado su resistencia de 7% en el año 2001 hasta el 25.5% en el año 2010, de acuerdo con un estudio de monitoreo de la resistencia de *E. coli* BLEE en la región Asia-Pacífico es del 34.9 y 42.2%. (15) Esta bacteria se ha diseminado demasiado rápido y extensivamente

sobre cualquier comunidad, lo lamentable es que aún no se ha justificado cuál o cuáles son los factores de diseminación, pero las principales sospechas están encaminadas a la transmisión de portadores fecales de persona a persona y la diseminación de microorganismo en el ambiente por medio de los animales domésticos y animales salvajes. En nuestro país, en una investigación realizada durante el período septiembre 2014 al 2015 en el Hospital Eugenio Espejo en la ciudad de Quito, se encontró que 8 de los 17 casos por *E. coli* BLEE murieron en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) debido a la septicemia ocasionada por las mismas. (16)

Entonces, como podemos evidenciar, la *E. coli* BLEE presenta una mayor resistencia a los betalactámicos y a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, los cuales son fármacos que se utilizan como última medida ante una septicemia en los pacientes que ingresan a una UCI en un hospital, esto debido a que las bacterias han generado un mecanismo que son las betalactamasas las cuales son unas enzimas bacterianas que inactivan a los antimicrobianos antes mencionados, ya que tienen la habilidad de hidrolizar y causar la resistencia. (15) La diseminación de las betalactamasas ha ocurrido por la presencia de plásmidos que las codifican y son auto transferibles, puesto que los genes en algunos casos se encuentran formando parte de transposones, estos se caracterizan porque su estructura genética tiene la capacidad de pasar una molécula de ADN a otra, y en caso de tener genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos, esto tiende a diseminarse conforme el transposón se disemina. (17)

A partir de lo expuesto anteriormente, resulta necesario decir que los residuos ganaderos que desprenden las explotaciones lecheras acarrearán una serie de problemas que inciden de manera directa en la preservación de los recursos naturales, el bienestar animal y por supuesto, la salud pública.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Caracterizar la diversidad de resistencia antimicrobiana en los procesos de biodigestión para la reducción de *E. coli* BLEE de los residuos lecheros en la hacienda LYG FARM en Quito – Ecuador.

## 6.2 Específicos

- Cuantificar la carga bacteriana de *E. coli* BLEE durante la producción de Biol a partir de la materia fecal humana y animal subproducto de una hacienda lechera.
- Establecer los patrones de resistencia de las *E. coli* BLEE aisladas de los residuos ganaderos en el proceso de biodigestión.
- Genotipificar en las *E. coli* BLEE aisladas de los residuos ganaderos del proceso de biodigestión los genes bla<sub>CTX-M</sub>.

## 7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Objetivo 1	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
Cuantificar la carga bacteriana de <i>E. coli</i> BLEE durante la producción de Biol a partir de la materia fecal humana y animal subproducto de una hacienda lechera.	Muestreo y análisis de los afluentes y efluentes del biodigestor durante un día con 3 repeticiones.	Cantidad de <i>Escherichia coli</i> resistente y no resistente en las muestras tomadas antes y después del biodigestor.	Técnica de filtración con nanopore de 0,45µm en método m-colibblue más CRO el laboratorio.
Objetivo 2	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
Establecer los patrones de resistencia de las <i>E. coli</i> BLEE aisladas de los residuos ganaderos en el proceso de biodigestión.	Antibiogramas	Determinación de los diversos antimicrobianos que presentan resistencia en la <i>E. coli</i> BLEE.	Antibiograma
Objetivo 3	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)

Genotipificar en las <i>E. coli</i> BLEE aisladas de los residuos ganaderos del proceso de biodigestión empleando los genes <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Análisis molecular m-PCR.	Cuantificación de las bacterias que contengan genes <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Técnica de m-PCR.
--	---------------------------	--	-------------------

## 8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

La producción bovina en el Ecuador es una de las principales actividades económicas, con una cantidad de 4,31 millones de cabezas de ganado a nivel nacional, teniendo un mayor asentamiento en la región Sierra, con un 51.69% del total de bovinos a nivel nacional. Además del porcentaje total de animales, se estima que alrededor del 69.24% se encuentra conformado por hembras y el 30.76% por machos, debido a la alta tenencia de hembras y el gran asentamiento de ganado en la región Sierra, se puede determinar que predomina la crianza de ganado lechero, ya que en nuestro país la producción diaria de leche está por alrededor de 6.65 millones de litros, siendo Pichincha la mayor provincia de producción de leche a nivel nacional. (12)

En el Ecuador predomina la crianza de ganado bovino por medio de sistemas de producción extensiva, donde el pastoreo es la principal actividad como fuente de alimentación del ganado, también podemos encontrar sistemas de producción intensivos o semi intensivos donde la industrialización para la crianza de bovinos es mucho más especializada. (18)

Por ejemplo, en el valle de Quijos en Napo, se determinó que la producción extensiva es predominante en esta zona, alcanzando un porcentaje de 82,85%, así mismo en Yacuambi en Zamora Chinchipe, este mismo sistema de producción alcanza el 100%. A pesar de esto, la realidad varía en cada una de las provincias, puesto que hay sectores donde la producción lechera es más exitosa y se están empezando a implementar otros tipos de sistemas productivos. (19)

## 8.1 Residuos Orgánicos

### 8.1.1 Estiércol

El ganado bovino es un herbívoro que consume diferentes clases de hierbas, la característica de este tipo de alimentación es que tiene un alto contenido de agua generando un estiércol acuoso, un bovino adulto defeca de 10 a 15 veces al día, lo cual en promedio representa unos 20 a 30 kg de heces al día, en algunos casos se puede llegar a 45 kg al día. Por tal motivo, se lo considera como un abono fresco, el cual posee un alto contenido de microorganismos. (18,19)

### 8.1.2 Composición del estiércol

En la porción fecal existen un gran número de productos alimenticios que en mayor medida se encuentran en su forma original. Las excretas contienen sustancias que son transformadas metabólicamente por bacterias en el tracto digestivo, así como por jugos digestivos enzimáticos. Los componentes principales del estiércol son: Materia Orgánica, el cual incluye varios microorganismos, (M.O), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Cobre (Cu) y otros. (20)

#### 8.1.2.1 Presencia de microorganismos

La mayor parte de la microbiota del estiércol es inocua, pero puede contener especies peligrosas como *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Yersinia spp.*, más aún sin son cepas multirresistentes. (21)

El estiércol de vaca lechera, comúnmente utilizado como fertilizante para tierras de cultivo, contiene una cantidad sorprendente de genes de resistencia a los antimicrobianos recientemente identificados. Los resultados sugieren que el estiércol de vaca es una fuente potencial de nuevos genes de resistencia a los antibióticos que las bacterias transfieren al suelo alimentario. (22)

El equipo de Handelsman utilizó un criterio de selección más secuenciación de gran alcance para identificar 80 genes únicos y funcionales, de la misma forma en 2013 junto a colaboradores de la Universidad de Yale hicieron un estudio en una granja cerca de Connecticut, un estado de EE. UU., donde fertilizaron el suelo con estiércol de vacas que no recibieron antimicrobianos, para su sorpresa comprobaron que el suelo abonado contenía más bacterias portadoras de genes de resistencia que el enriquecido con un

fertilizante nitrogenado sintético lo que significaría que algo del propio estiércol tiene que estimular la proliferación de las bacterias dotadas de resistencia natural. (23)

### 8.1.3 Situación actual del manejo de residuos orgánicos

La mayoría de las haciendas lecheras poseen algunos planes de manejo de residuos orgánicos, entre los más comunes tenemos:

- Acumulación de excretas en contenedores o al aire libre.
- Esparcimiento de excretas frescas o secas directamente a los suelos con fines agrícolas.
- Excretas arrojadas directa o indirectamente a distintas fuentes hídricas.

#### 8.1.3.1 Impacto del manejo actual de residuos orgánicos

El tratamiento de los residuos cada día tiene más importancia dada la dimensión del problema que representa, no solamente por el aumento de los volúmenes producidos, generados por el aumento de la producción, pero también por la aparición de nuevos productos y principalmente por enfermedades que afectan a la salud humana y animal directamente relacionadas con el manejo del estiércol animal.

El estiércol animal en los agroecosistemas es el mayor desecho generado, su uso inadecuado puede generar problemas como malos olores, producción de nitratos y otros contaminantes en los cuerpos de agua; y entre los principales impactos que presentan las acciones antes mencionadas, (24,25) podemos acotar lo siguiente:

- La acumulación de excretas en contenedores o al aire libre provocan la emisión de gases contaminantes hacia la atmósfera, destacándose el amoníaco, así como otros gases de efecto invernadero (GEI) que incluyen metano y óxido nitroso. Al acumularlo directamente en el suelo se puede filtrar a aguas subterráneas, produciendo contaminación debido a la presencia de nitrógeno y otros componentes de este.
- La aplicación de estiércol fresco o seco directamente sobre el suelo con fines agrícolas sobrecarga los nutrientes del mismo, además provoca cambios bruscos de pH, alterando el crecimiento de la vegetación y especialmente la transmisión de bacterias causantes de enfermedades a la misma.
- Finalmente, las excretas arrojadas directa o indirectamente a distintas fuentes hídricas provocan dosis excesivas de fósforo en el agua, las mismas que estimulan el proceso

de eutrofización, el cual aumenta las plantas acuáticas, disminuye el oxígeno disuelto y varía el pH, afectando así la calidad de esta. Sin mencionar la presencia de microorganismos altamente patógenos que se diseminan al largo de todo el afluyente hídrico. (25) En cuanto a la materia orgánica, su efecto sobre la variabilidad del agua subterránea es relativamente débil. El nitrógeno juega un papel diferente, el nitrógeno amoniacal (nitritos y nitratos), al ser muy solubles, se incorporan a las aguas de precipitación o riego, acompañándolas en su recorrido a través del suelo, alcanzando finalmente a las masas de agua subterráneas. (24)

#### 8.1.4 Alternativas del manejo de residuos ganaderos

El incremento de residuos ganaderos y las acciones insuficientes que se han estado llevando a cabo han generado el deseo de implementar estrategias o alternativas que permitan corregir o minimizar este problema con la finalidad de aprovechar estos residuos y reducir su efecto contaminante en varios aspectos.

Es así como entre una de las alternativas podemos encontrar al biodigestor.

### **8.2 Biodigestor**

El biodigestor es un sistema hermético de forma cilíndrica o esférica, posee un ducto de entrada a través del cual se suministra la materia orgánica (por ejemplo, estiércol animal, heces humanas, residuos de matadero, aguas residuales, etc.) en forma conjunta con agua, y un ducto de salida en el cual el material ya digerido por acción bacteriana (digestión anaeróbica) abandona el biodigestor. (26)

#### 8.2.1 Funcionamiento del Biodigestor

Es un recipiente hermético (llamado reactor) que en su interior contiene materia orgánica como estiércol y residuos vegetales (excepto los cítricos, porque se acidifican). El material de cultivo se fermenta con cierta cantidad de agua, produciendo gas y abono orgánico rico en fósforo, nitrógeno y potasio. El sistema también puede incluir una cámara de carga y nivelación de aguas residuales aguas arriba del reactor, un dispositivo de captura y almacenamiento de biogás y cámaras de postratamiento y presurización a la salida del reactor. (27)

El proceso de biodigestión se da porque existe un grupo de microorganismos bacterianos anaeróbicos en los excrementos que, al actuar en el material orgánico, producen una mezcla de gases llamado biogás. (27)

Además, como resultado de este proceso se generan residuos con un alto grado de concentración de nutrientes y materia orgánica (excelentes como fertilizantes) que pueden ser aplicados frescos, ya que, el tratamiento anaeróbico elimina los malos olores y la proliferación de insectos. (20) Al digerir con bacterias anaerobias, destruyen los 19 microorganismos, huevos de parásitos y semillas de malas hierbas presentes en el estiércol fresco, dejando las heces libres de estos patógenos y plantas no deseadas. (20)

### 8.2.2 Digestión Anaerobia

Es un proceso biológico en cadena que degrada la materia orgánica paulatinamente sin presencia de oxígeno, convirtiendo los residuos ganaderos de animales y vegetales en biogás y biol (fertilizante). Inicialmente, se produce una hidrólisis que da paso a las siguientes fases como la acidogénesis, acetogénesis y finalmente metanogénesis. En cada una de estas etapas participan distintas poblaciones de bacterias, las mismas que se encuentran en el estiércol fresco de cualquier animal. (28)

- a) Etapa de Hidrólisis o solubilización: En esta primera etapa, las bacterias absorben materia orgánica con largas cadenas de estructuras carbonadas (proteínas, carbohidratos y lípidos) disueltas por exoenzimas secretadas por bacterias hidrolíticas que actúan fuera de la célula y las descomponen para producir ácidos orgánicos más cortos y formas más simples. cadena liberando hidrógeno y dióxido de carbono; en este proceso participan principalmente *Clostridium* y *Bacteroides*. (29) El material orgánico soluble resultante puede ser asimilado por la célula, por lo tanto, sirve como sustrato para las bacterias de la segunda etapa. (20)
- b) Etapa Acidogénica: En esta etapa las bacterias acidogénicas, producen acetato e hidrógeno, al igual que orgánicos solubles y ácidos orgánicos simples. Los ácidos grasos son convertidos en ácidos orgánicos volátiles como el acético siendo el principal producto y puede llegar a representar el 70%, también se encuentran el ácido propiónico, compuestos hidrogenados ( $H_2$ ) y carbodióxidos ( $CO_2$ ). (20)
- c) Etapa Acetogénica: Esta es una etapa en la que se acelera el metabolismo bacteriano con la transformación enzimática o hidrólisis de polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en otros componentes que serán utilizados como fuente de energía y metabolismo en carbono celular a través de bacterias acetogénicas. de  $H_2$  con otras bacterias consumidoras. (29)
- d) Etapa Metanogénica: En esta etapa, un gran grupo de bacterias estrictamente anaerobias actúan sobre productos de etapas anteriores, que son las responsables de

la producción de metano y dióxido de carbono. Se pueden formar dos grupos importantes de bacterias metanogénicas dependiendo de los sustratos que metabolizan: Los más importantes son los acetoclásticos que convierten acetato, metanol y algunas aminas. El otro grupo son las bacterias hidrogenotróficas que consumen hidrógeno. En estas condiciones, el nitrato se convierte en amonio y el fósforo en fosfato. (30)

#### 8.2.2.1 Factores determinantes en la digestión anaerobia

Los microorganismos de la biodigestión son altamente susceptibles a los cambios en las condiciones ambientales, en especial los metanogénicos. (26) Por ende, es importante considerar los siguientes factores como: temperatura, pH, concentración de AGV, disponibilidad de nutrientes y también algunos factores operacionales como: el porcentaje de sólidos presentes, naturaleza del sustrato, mezcla presente, tiempo de retención, efecto del diseño y calentamiento. (26,28)

- **Temperatura:** La digestión anaeróbica ocurre en un rango de temperatura que va desde 5°C hasta 55°C. La temperatura que tenga el digester lo determina las distintas especies bacterianas que pueden vivir en esos ambientes. Se han reportado tres clases diferentes de bacterias: criofílicas, aquellas que viven en temperaturas menores de 20°C, mesofílicas viven en rangos de 20°C a 45°C y por último, las termofílicas en rangos mayores de 45°C. Se ha demostrado que la temperatura óptima para la digestión es de 30°C a 35°C, pues se combinan las mejores condiciones para el crecimiento de las bacterias y la producción de metano, con un corto tiempo de retención de los desechos en el biodigestor. (28)
- **Humedad:** El contenido de humedad óptimo para la máxima eficiencia de la fermentación es entre 50% y 60% en masa. La humedad por debajo del 40% es un indicador de descomposición muy lenta de la materia orgánica, en cambio, cuando la humedad está por encima del 60%, el número de poros libres en el agua es muy bajo, lo que dificulta la oxigenación de la fermentación. (30)
- **pH:** Este obedece a la función del sistema alcalino de bicarbonato, del CO<sub>2</sub> y de la concentración de AGV. La alcalinidad protege de fluctuaciones al pH y éste se mantiene por el CO<sub>2</sub>. (24) Se ha encontrado que el pH óptimo es de 7 a 8 o sea, neutro o ligeramente alcalino. Al comenzar la proliferación de las bacterias, se forman ácidos, por lo que el pH puede llegar acidificarse, pero luego que se estabiliza la producción, tiende a normalizarse. (28) El pH de las deyecciones bovinas oscila, como

valor medio, entre el 6,7 del bovino de ordeño al 7, 0 y el 8,0 en los residuos de bovino de engorde o cebo. El efecto de su aporte sobre el pH de los suelos es algo acidificante. (24)

- Concentración de AGV: El momento en que las bacterias degradan el material orgánico, se forman los ácidos grasos volátiles (AGV). En ese momento puede fluctuar el pH, de manera que en un biodigestor habrá complicaciones cuando la acumulación de AGV sea alta. Este es punto controversial en los estudios, unos dicen que la concentración tóxica es alrededor de 2000 mg, AGV/l, otros señalan, que la acidez que se asocia a ello es la procedencia de la toxicidad. (28)
- Disponibilidad de nutrientes: En cuanto a los nutrientes propiamente dichos, es de gran importancia la razón C: N (relación carbono - nitrógeno) con un valor óptimo de 25:1. Si existe mucha cantidad de carbono y pequeña de nitrógeno, la bacteria no puede utilizar todo el carbono presente y la degradación de la materia orgánica será ineficiente. Si la presencia de nitrógeno es alta, no habrá en qué emplearlo y se acumulará principalmente en forma de amoníaco (NH<sub>3</sub>) pudiendo inhibir el crecimiento de las bacterias o produciendo su muerte, especialmente aquellas que producen metano. (28)

También se necesitan los siguientes elementos, en pequeñas concentraciones: zinc, potasio, calcio, magnesio y hierro. El monóxido de carbono es necesario para la metanogénesis. Las bacterias necesitan vitaminas para crecer, pero ellas mismas sintetizan las vitaminas necesarias. Si las bacterias no las tienen, habrá quien en la población las proporcione. (28)

#### 8.2.2.2 Microorganismos involucrados en la biodigestión

Las especies de microorganismos involucrados en el proceso puede variar dependiendo de los materiales que serán degradados. Los ácidos grasos, los alcoholes y los enlaces aromáticos pueden ser degradados por la respiración anaerobia de los microorganismos. (31)

Estos utilizan, entre otros nutrientes, el sulfato (*Desulfonema limícola*, *Desulfovibrio desulfuricans*), carbonato (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Acetobacterium woodi*, *Clostridium aceticum*), nitrato (*Pseudomonas stutzerii*, *Paracoccus denitrificans*), azufre (*Pyrodictium occultum*, *Desulfuromonas acetoxidans*), fumarato (*Wolinella succinogenes*, *Escherichia coli*) o Fe(III) (*Alteromonas putrefaciens*) como

aceptores de electrones, por lo que pueden denominarse reductores de nitrato, reductores de sulfato, etc. (31)

En la primera y segunda fase de la degradación, participan bacterias de al menos 128 órdenes de 58 especies y 18 géneros. Las especies que se presentan principalmente son *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* y *Clostridium*. (31)

En la tercera y cuarta fase de la degradación, se encuentran principalmente bacterias metanogénicas. En la actualidad, se han identificado 81 especies, de 23 géneros, 10 familias y 4 órdenes. Además, existen diversos microorganismos que pertenecen al sistema ecológico de un biorreactor y que participan indirectamente en la degradación. Por ejemplo, *Staphylococcus*, especie se desarrolla con frecuencia en los digestores, puede provocar riesgos para la salud del personal que opera el digestor si no se toman las medidas sanitarias necesarias. (31)

En las cuatro fases de la degradación, las especies *Acetobacter* y *Eubacterium* tienen una participación similar en el proceso. (31)

**Tabla N° 1:** Bacterias que participan en el proceso de fermentación durante las cuatro fases.

<b>Taxonomía</b>	<b>Especies</b>	<b>Descripción</b>	<b>Metabolismo</b>
Género: <i>Acetobacterium</i>	<i>A. paludosum</i> <i>A. woodii</i>	El género <i>Acetobacter</i> es un grupo de bacilos Gram negativos móviles que realizan una oxidación incompleta de alcoholes, y producen una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales.	Reducen autotróficamente compuestos oligómeros, poliméricos, monómeros y CO <sub>2</sub> , utilizando el hidrógeno como fuente de electrones. Estos microorganismos hacen viable la descomposición de los ácidos grasos y compuestos aromáticos.

<p>Género: <i>Eubacterium</i></p>	<p><i>E. brachy</i> <i>E. limosum</i> <i>E. rectale</i> <i>E. cylindroides</i> <i>E. siraeum</i> <i>E. plautii</i> <i>E. desmolans</i> <i>E. callandrei</i></p>	<p>El género <i>Eubacterium</i> consiste en un grupo de bacterias anaeróbicas obligadas Gram positivas.</p>	<p>La mayoría de las <i>Eubacterias</i> producen butirato como el principal producto de su metabolismo. Algunas especies se desarrollan autotróficamente, por lo tanto, son capaces de cumplir funciones específicas en la descomposición anaeróbica.</p>
---------------------------------------	---	---	---

Fuente: FAO, 2011.

- Bacterias que participan de la hidrólisis: Entre estos destacan: *Sphingomonas*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Sporobacterium*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium*. (31)
- Bacterias que participan de la acidogénesis: La mayoría de los microorganismos acidogénicos también participan de la hidrólisis, entre estos el género *Paenibacillus*, *Clostridium* y *Ruminococcus* que se encuentran presentes en todas las fases del proceso de fermentación, pero dominan más en la fase acidogénica.  
El grupo *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroides* representan el segundo grupo más grande de microorganismos en las dos primeras etapas de descomposición. Sin embargo, en la fase metanogénica representan menos de 5 % del total de microorganismos. Esto indica que estos grupos son la causa principal de la descomposición de los compuestos monoméricos. (31)
- Bacterias que participan de la acetogénesis: Estas bacterias únicamente pueden sobrevivir en simbiosis con el género que consume hidrógeno y otras bacterias consumidoras de este como *Syntrophobacter wolinii* especializada en la oxidación de propionato y *Syntrophomonas wolfei* que oxida ácidos grasos de 4 a 8 átomos de carbono, convierten el propiónico, butírico y algunos alcoholes en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, el cual se utiliza en la metanogénesis. (29)

- Bacterias que participan de la metanogénesis: La última fase se encuentra dominada por un grupo especial de microorganismos, las Arqueas metanogénicas. Estas se caracterizan a través del cofactor F420, el cual opera en presencia de hidrogenasas como transportador de H<sub>2</sub>. Puede detectarse por su autofluorescencia en un microscopio óptico. Las principales especies están representadas por *Methanobacterium*, *Methanospirillum hungatii*, y *Methanosarcina*. (31)

### 8.2.3 Biodigestor Home Biogás 2.0

Home Biogás es una empresa israelí, que se han dedicado al diseño y fabricación sencillos biodigestores que tienen el aspecto de una tienda de acampar. El Home Biogás 2.0 es un biodigestor de fácil uso, ya que en su interior contiene bacterias anaeróbicas que se encargan de transformar todos los desechos orgánicos de origen humano y animal, en fertilizante líquido (Biol) y gas para ser utilizado de manera doméstica.

El biodigestor cuenta con un sistema para que el gas producido se concentre en la parte superior del sistema, el cual mediante ductos puede ser llevado a otro establecimiento para ser usado, lo mismo sucede con la producción de biol, el cual se puede almacenar para diferentes usos. La vida útil es del Home Biogás 2.0 es de 15 años y pesa alrededor de 22 kilos. (32)

Las dimensiones del sistema son de 210 x 115 x 130 cm, teniendo un volumen del tanque de gas de 700 litros, la capacidad del tanque del biodigestor es de 1200 litros, mientras que la cantidad máxima diaria de residuos de cocina (frutas, verduras o carnes) es de 6 litros, por otro lado, la cantidad máxima diaria de estiércol animal es de 45 litros, pudiéndose repartir 15 litros de estiércol + 30 litros de agua. (33)

Este tipo de biodigestor logra generar una cantidad de gas que puede ser utilizado hasta 2 horas diarias para cocinar o para ser utilizado en un calefón, produce decenas de litros de biol cada mes, logrando desviar alrededor de 1 tonelada de residuos orgánicos cada año y ahorrando hasta 6 toneladas de emisiones de CO<sub>2</sub> al año. (33)

### 8.3 Biol

El biol es el resultado de la fermentación de estiércol y agua a través de la descomposición y transformaciones químicas de residuos ganaderos en un ambiente anaerobio. Contiene nutrientes que son asimilados buenamente por las plantas, haciéndolas más vigorosas y resistentes. La técnica empleada para obtener biol es a través de biodigestores, el material

al salir del mismo ya no tiene malos olores y no atrae insectos una vez utilizado en los suelos. (34)

El biol contiene bastante materia orgánica, en el caso del de bovino podemos encontrar hasta 40.48%. El biol agregado al suelo provee material orgánico que resulta fundamental en la génesis y evolución de los suelos, constituye una reserva de nitrógeno y ayuda a su conformación, particularmente la de textura fina.

La cantidad y calidad influirá en los procesos físicos, químicos y biológicos del sistema, convirtiéndose en un factor esencialísimo de la fertilidad de estos. (35)

Composición del biol bovino: K (0.06%) Mg (0.032%) Cu (01 mg.kg-1) Co (01 mg.kg-1) Fe (3.9 mg.kg-1) Mn (0.5 mg.kg-1) Zn (0.5 mg.kg-1). (34)

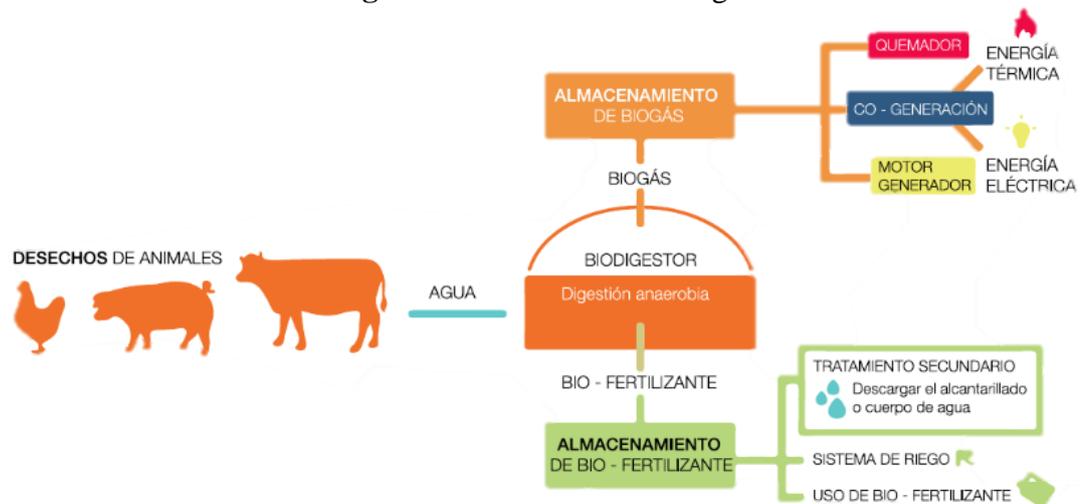
### 8.3.1 Elaboración de Biol

La elaboración de biol se puede entender como un proceso de fermentación en la cual interfieren una fase sólida que es el biosol y una fase líquida conocida como biol, ambas fases poseen excelentes cualidades para los cultivos. (35)

El proceso físico por el que pasan los residuos ganaderos ante el biodigestor son los siguientes: (36)

1. Se recibe la materia orgánica.
2. Toda la materia orgánica ingresa a biodigestor.
3. Se debe agregar agua a una temperatura de 25 a 35°C.
4. Se debe esperar a que se realice el proceso de fermentación, el cual puede tardar de 5 hasta 20 días.
5. En el biodigestor hay una válvula que controla la presión de salida del biogás.
6. El filtro del biodigestor se encarga de eliminar el sulfuro de hidrógeno, el cual es un gas corrosivo.
7. En uno lado del biodigestor se ubica un recipiente el cual se encarga de recibir el biol y otros residuos del proceso.
8. El biogás sale por un tubo de plástico o cobre, el cual puede tener diferentes usos de acuerdo con las necesidades de cada persona.

**Imagen N° 1:** Cadena del biodigestor.



Fuente: Ministerio de Ambiente, 2015.

El agua dentro de la elaboración del Biol tiene la función de homogeneización de los elementos y brinda condiciones óptimas para impulsar el desarrollo y reproducción de los microorganismos, y muchos de estos que están presentes en la fermentación se desenvuelven mejor en un medio líquido, transforman más fácilmente productos como vitaminas, enzimas y péptidos en promotores de crecimiento trasladándose a las plantas. Ahora bien, la cantidad de materia orgánica con respecto al agua varía de acuerdo con su origen, pero se puede trabajar con concentraciones de 50:50 o 25:75 respectivamente, dependiendo de la cantidad de materia prima de la que se disponga, pero lo más recomendable es utilizar 1/3 de materia orgánica y 2/3 de agua. (30)

Existen otras elaboraciones de Biol en donde se añaden diferentes tipos de sustancias como es el caso de la melaza que se encarga de aportar la energía necesaria para que los microorganismos puedan cumplir con el trabajo de descomposición de la materia, hace que la materia orgánica se convierta en nutrientes digeribles para las plantas. Es rico en potasio, calcio, fósforo, magnesio y micronutrientes tales como boro, zinc y hierro. (30)

El biol se puede utilizar como fertilizante líquido para aplicarlo por rociado o se lo puede aplicar junto con el agua de riego en sistemas automatizados. La dosis biol agua debe estar en una relación de 1/100. La aplicación foliar podría llegar hasta una dilución de máximo el 75% y un mínimo de 25%. Lo ideal es conocer los requerimientos de las plantas o del suelo. (30)

### 8.3.2 Beneficios del Biol

La aplicación de residuos ganaderos en forma de biol constituye al suelo uno de los mejores ejemplos de reciclaje de nutrientes, en el sistema del suelo y cadena trófica. Bien utilizados, pueden sustituir o reducir el uso de importantes cantidades de fertilizantes sintéticos, y dándole un valor agregado a su producción por ser un manejo orgánico. De esta manera, el empleo de biol a muchos productores les ha permitido aproximarse a una práctica agroecológica de producción, haciéndose más sostenibles y resilientes, ayudando a resolver el problema del ganadero y también supone un ahorro para el agricultor. (37,38)

El biol es un mejorador de la disponibilidad de nutrientes del suelo, aumenta su disponibilidad hídrica, y crea un microclima apropiado para las plantas. Debido a su contenido de fitorreguladores, promueve actividades fisiológicas y estimula el desarrollo de las plantas, beneficia su enraizamiento, alarga la fase de crecimiento de hojas (serán las encargadas de la fotosíntesis), mejora la floración, activa el vigor y poder germinativo de las semillas. Todos estos factores repercutirán en mayor productividad de los cultivos y generación de material vegetal. El biol puede aumentar la producción de un 30 hasta un 50%, además, protege de insectos y recupera los cultivos afectados por heladas. (35)

La capacidad de fertilización del biol es mayor a la del estiércol fresco y del estiércol compostado. Puesto que, el nitrógeno es convertido en amonio ( $\text{NH}_4$ ), y luego a nitratos. Adicionalmente, acarrea una alta carga de microorganismos benéficos y fitohormonas. (28)

Además de los beneficios antes mencionados, también podemos encontrar: reducción significativa de malos olores, mineralización, producción de energía renovable si sustituye a una fuente de energía fósil, disminución de emisiones de gases de efecto invernadero y también la reducción significativa de microorganismos altamente patógenos. (39)

### 8.4 Resistencia Antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un proceso natural, se define como la capacidad de un microorganismo (bacterias, virus, parásitos, hongos) para neutralizar y/o resistir el efecto del antimicrobiano (antibiótico, antiviral, antiparasitario, antifúngico). (3)

#### 8.4.1 Historia y epidemiología de la resistencia antimicrobiana

Los primeros reportes de bacterias resistentes a los antimicrobianos fueron en el año 1944, poco después de la aparición de la penicilina, en ese año se descubrieron cepas de *Staphylococcus aureus* que producía betalactamasas que hidrolizaban la penicilina y la hacían ineficaz. Los reportes siguieron aumentando, ya que en 1946 un estudio demostró que el 14% de *Staphylococcus aureus* nosocomiales producían betalactamasas, para el año 1950 ascendió al 59% y en la actualidad se ha reportado que el 95% de cepas de *S. aureus* son productoras de betalactamasas. (40)

Debido a la problemática de esa época, la industria farmacéutica comenzó con el desarrollo de nuevos antimicrobianos como: nuevas penicilinas, cefalosporinas, combinaciones con inhibidores de betalactamasas y carbapenems, sin embargo, esto solo desencadenó que se desarrollen nuevas cepas de diferentes bacterias resistentes a cada uno de ellos. (40)

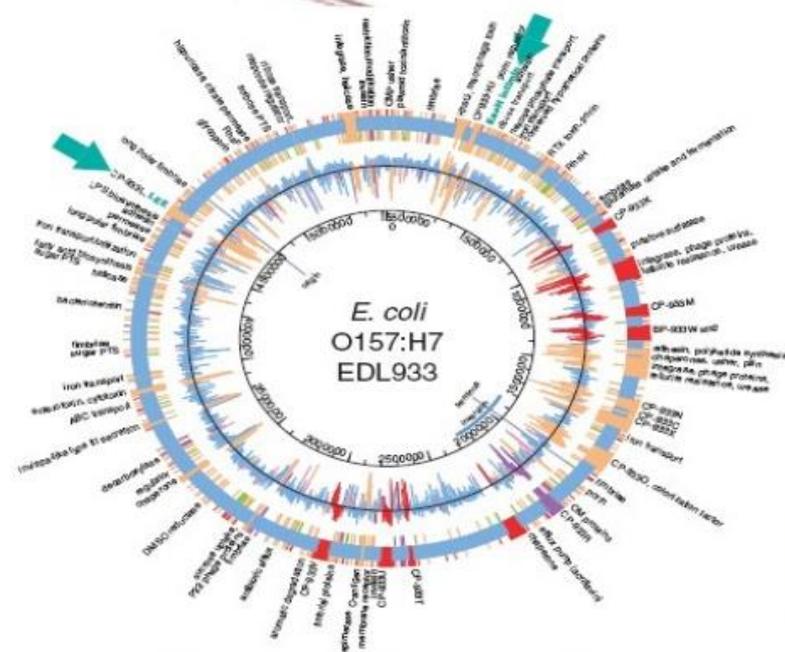
En el caso de las bacterias gram negativas, se reportó que las Enterobacterias desarrollaron mecanismos de resistencia antimicrobiana al aztreonam y a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación mediante la producción de betalactamasas de espectro extendido, siendo su primer caso reportado en Alemania en el año de 1983. (40)

#### 8.4.2 Genoma Bacteriano

El estudio del genoma bacteriano es una de las bases para comprender la capacidad de las bacterias para transferir y propagar la resistencia a los antimicrobianos. El término genoma fue introducido por Hans Winkler, profesor de botánica de la Universidad de Hamburgo en 1920, refiriéndose a la totalidad de ADN contenido en una sola célula. (41)

Las primeras descripciones de la estructura del ADN bacteriano lo hicieron Worcel y Burgi cuando lo aislaron de *E. coli*. En una gran cantidad de bacterias se puede encontrar el ADN en una sola molécula denominado cromosoma bacteriano, el cual se encuentra en forma de círculo cerrado que se enrolla para contenerse en el nucleoide de la bacteria, salvo el caso de *Streptomyces* y *Borrelia*, las cuales tienen un ADN lineal. Uno de los nucleoides más completos es el de la *E. coli*, la cual tiene un peso de  $3 \times 10^9$  daltons aproximadamente, con 4.2 millones de pares de bases y alrededor de 1 mm de longitud. (41)

**Imagen N° 2:** Mapa genómico circular de *E. coli*.



**Fuente:** es.slideshare.net

En el nucleóide no solo se va a encontrar ADN condensado, sino también ARN, como es el caso de enzimas de ARN polimerasa, las topoisomerasas y proteínas básicas. Para que el ADN pueda encontrar dentro de la bacteria, este enrolla a sí mismo mediante la utilización de topoisomerasas. (41)

Pero a más del ADN, dentro del nucleóide también podemos encontrar otras moléculas de ADN adicionales denominadas plásmidos, los cuales son pequeñas moléculas de ADN circular, el mismo que se está replicando independientemente de la bacteria, una de las características más fundamentales que tiene es que debido a su tamaño tienen la facilidad de agregar y suprimir fragmentos de ADN y reintroducirlos en el ADN original de la bacteria, esta es una de las características fundamentales que está asociada a la resistencia de antimicrobianos, ya que el mismo se puede transmitir entre distintas células bacterianas. (41)

#### 8.4.3 Tipos de resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana puede ser natural o intrínseca y adquirida, y debe ser analizada desde varios puntos de vista (clínico, poblacional, molecular, farmacocinético y farmacodinámico).

1. Resistencia natural o intrínseca: Es una propiedad determinada de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antimicrobianos y tiene la característica de ser

inherente a una especie en particular. El conocimiento de este tipo de resistencia es útil en la práctica, tanto para el microbiólogo como para el médico, pues se evita la utilización de antimicrobianos que presenten este tipo de resistencia ante ciertas bacterias o grupos de bacterias. (41)

2. Resistencia adquirida: Es un verdadero cambio en la estructura genética de la bacteria y compone un verdadero problema en la clínica. Dicho de manera sencilla, esto significa que, si algún antimicrobiano alguna vez fue eficaz para combatir diversas bacterias, al adquirir la resistencia dicho fármaco deja de ser eficaz. Puede ser también un fenómeno temporal cuando está establecida por factores de su medio, o puede ser de carácter permanente en el caso de existir mutaciones o cuando se debe a la adquisición de material genético externo a través de transposones, integrones, plásmidos u otros. Existe un fenómeno conocido como tolerancia, es considerado como un tipo de resistencia adquirida, aun cuando el microorganismo siga siendo sensible al medicamento. (41)

#### 8.4.4 Bases genéticas de adquisición de resistencia antimicrobiana.

La resistencia antimicrobiana está dada por cambios estructurales y fisiológicos que neutralizan a los medicamentos, estos cambios ocurren por dos cambios genéticos:

- a) Mutación en un gen cromosómico.

Los cambios cromosómicos pueden darse al azar o por influencia de agentes físicos o químicos, no necesariamente se requiere la presencia de un antimicrobiano, en algunos casos la mutación cromosómica se da en una sola fase ocasionando alto grado de resistencia, pero en otros, se puede requerir varias fases o pasos generando mínimas alteraciones de sensibilidad. Una vez que la mutación tuvo su lugar, la información se transfiere en sentido vertical a las células hijas de generación en generación. (40)

- b) Introducción de un plásmido R de resistencia.

Este mecanismo es mucho más rápido porque puede conferir resistencia a varios antimicrobianos a la vez y se da lugar cuando la bacteria adquiere genes de resistencia transportados en plásmidos extracromosomales, (40) mediante procesos como:

1. Transformación: Transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias. (42)

2. Transducción: Transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias). (42)
3. Transposición: Movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes de resistencia a diferentes antimicrobianos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular. (42)
4. Conjugación: Intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas. (42)

#### 8.4.5 Mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para intercambiar genes de resistencia; estos ocurren no solo entre poblaciones bacterianas de la misma especie, sino también se han identificado diferentes especies, lo que explica parcialmente el aumento de la resistencia a los antimicrobianos. El intercambio de genes implica la participación de elementos genéticos de transferencia o unidades de captura de genes, entre los que se incluyen los plásmidos, las secuencias de inserción (IS), los integrones, los transposones (Tn) y los bacteriófagos. (41) Los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias son los siguientes:

- a) **Bombas de eflujo o expulsión del antimicrobiano del interior de la célula bacteriana:** Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin transformaciones, pero sin acción antimicrobiana. La bacteria acomoda bombas de expulsión dependientes de energía, que pueden comportarse como sistemas de eliminación de uno o varios antimicrobianos. (42)
- b) **Modificación o inactivación del antimicrobiano mediante enzimas hidrolíticas:** Es el mecanismo más común de resistencia adquirida y está determinado en gran medida por la producción de enzimas que hidrolizan al antimicrobiano. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, las enzimas inactivan el antimicrobiano al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Los aminoglucósidos son otra clase importante de antimicrobianos que son destruidos por enzimas. (42)
- c) **Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo:** La alteración o modificación del sitio de unión del antimicrobiano se traduce en una pérdida de la afinidad y por ende le impide ejercer su acción. La modificación de un aminoácido crea un blanco diferente y así reduce la afinidad de unión por el antimicrobiano. Hay dos tipos de modificación del sitio activo: la modificación de PBP (penicilin-bindingprotein) que es un complejo enzimático que permite la síntesis

del peptidoglicano y en caso de producirse una mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, estos no pueden actuar y se genera resistencia, por otro lado, tenemos la modificación ribosomal donde los genes *erm A* y *erm B* modifican el sitio activo del ribosoma mediante metilación, mecanismo importante en la resistencia a macrólidos (*S. pneumoniae* y *S. pyogenes*). (42)

- d) **Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana:** Cambios en el diámetro o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, de esta manera el antimicrobiano no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, esta es la forma más frecuente de resistencia natural. Es un mecanismo importante en las bacterias gramnegativas, poseen canales proteicos nombrados porinas que admiten o impiden el paso de moléculas hidrofóbicas. (42)
- e) **Biofilms:** Las bacterias que forman biofilm están protegidas de la luz ultravioleta, la deshidratación, la acción de los antimicrobianos, los mecanismos de defensa del organismo como la fagocitosis y otras amenazas ambientales. La resistencia antimicrobiana a los antimicrobianos dentro del biofilm se debe a múltiples mecanismos, que pueden incluso actuar de manera sinérgica. (42)
- f) **Sobreexpresión del sitio blanco:** Este mecanismo solamente se ha descrito en aislados clínicos de micobacterias, la duplicación génica de los promotores implicados en la transcripción de estos genes, son probablemente el mecanismo responsable. (42)

## 8.5 *E. coli* BLEE

### 8.5.1 Generalidades

El género *Escherichia* es nombrado en honor a Theodor Escherich, quien aisló este tipo de especie del género en 1885. La *Escherichia* son bacilos Gram negativos que existen solos o en pares, es un anaerobio facultativo con un tipo de metabolismo fermentador, además pueden ser bacilos móviles o inmóviles debido a los flagelos peritricos distribuidos en la superficie bacteriana. (15)

La *E. coli* es uno de los agentes causales más frecuentes de procesos infecciosos, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad debido a los diferentes patrones que les confieren resistencia a los antimicrobianos, siendo un problema reconocido a nivel mundial. A finales de los años noventa se reconoció la multidrogorresistencia

condicionada por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), como las enzimas CTX-M. (15)

#### 8.5.2 Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

A diferencia de los mecanismos de resistencia encontrados en organismos Gram positivos como el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), los cambios que se han suscitado en las bacterias Gram negativas han empeorado desde hace más de una década, al grado logrando un ratio de aproximadamente de 2:1 sobre las Gram positivas. Las betalactamasas son enzimas bacterianas que inactivan a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos por hidrólisis, los cuales resultan ser poco efectivos. Un grupo de betalactamasas, las BLEE, tienen la habilidad de hidrolizar y causar resistencia a varios tipos de los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas de amplio espectro como la cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y monobactámicos como el aztreonam, pero no en las cefamicinas, ni carbapenémicos. La mayoría de los microorganismos BLEE se dividen en tres grupos: TEM, SHV y CTX-M. (15)

El tipo TEM en referencia a Temoniera, nombre de la paciente en cuyo hemocultivo se aisló por primera vez una cepa *E. coli* productora de esta enzima, este tipo confiere resistencia a ampicilina, penicilina y a cefalosporinas de primera generación y se localizan generalmente en cepas de *E. coli* y *K. Pneumoniae* y en menor medida en otros géneros de la familia Enterobacteriaceae y en otros microorganismos como *Pseudomonas Aeruginosa*. (43)

El tipo SHV que significa “variable sulfhidrilo” describe las propiedades bioquímicas de la enzima. (44) Confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación, se localizan usualmente en *K. Pneumoniae*, pero también se han descrito en otras especies de Enterobacterias como *P. Aeruginosa*, *E. coli*, y *Acinetobacter spp.* (43)

Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV. Hasta la fecha se describen más de cien variantes distintas procedentes de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de SHV-1 lo que da una pequeña idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo debido esencialmente a la presión selectiva de los antimicrobianos. (45)

En 1989 se descubrió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M convirtiéndose en el tipo más prevalente de BLEE durante los últimos 10 años, en especial países de

Sudamérica y Europa debido al impacto epidemiológico tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad, englobando así más de 70 enzimas que se clasifican filogenéticamente en cinco grupos según su secuencia de aminoácidos. (46)

En la actualidad, CTX-M-15 es la BLEE más identificada en el mundo, para que su diseminación haya sido muy exitosa podría deberse a su asociación con clones internacionales con gran capacidad de diseminación, como el ST131, ST405 y ST617. (47)

Para reconocer cada uno de los tipos enzimáticos de BLEE se requieren estudios genotípicos, estos generalmente se realizan en laboratorios especializados, quienes bajo estudios moleculares han logrado diferenciar y agrupar todas las diversidades de cepas de *E. coli* (y otras enterobacterias) y con esto tener un panorama más amplio del comportamiento del microorganismo. Unos años atrás hablar de *E. coli* BLEE era hablar de un tipo de microorganismo intrahospitalario y que hoy en día sabemos que ya es parte del microambiente comunitario.

### 8.5.3 Hallazgos de *E. coli* BLEE en el Ecuador

En el Ecuador, mediante varios estudios, también se ha podido determinar la presencia de *E. coli* BLEE no solo a nivel intrahospitalario, sino en diferentes fuentes, como son:

- Fuentes Hídricas: En el río Machángara, ubicado en la ciudad de Quito, un grupo de investigadores hallaron la presencia de *E. coli* resistente a cefotaxima con una cuantificación de  $2.7 \cdot 10^3$  (SP4) y  $5.4 \cdot 10^5$  (SP9) UFC/100 ml, los cuales lograron concluir que la cantidad encontrada es muy similar a lo que se puede encontrar en muestras de aguas residuales provenientes de un hospital. (5)
- Mercados: En un mercado municipal, ubicado en la ciudad de Quito, se halló *E. coli* ST410, un gen que se aisló de verduras como lechuga. Cilantro y alfalfa especialmente, por lo que se presume de una contaminación ocasionada por uso de estiércol como abono en los cultivos, sobre todo en sistemas intensivos donde incluso utilizan aguas residuales, a pesar de ser un gen nuevo mostró resistencia a la ciprofloxacina, el cual se le debe prestar atención porque puede ocasionar una amenaza a la salud pública a futuro. (6)
- Comida callejera: Este estudio se basó en la recolección de 150 muestras de puestos de comida concurrecidos en la ciudad de Quito, en lo que se pudo encontrar: 20 muestras de alimentos con *E. coli* con el gen ESBL bla<sub>CTX-M-15</sub> en seis cepas, bla<sub>CTX-M-14</sub> en dos

cepas y una aislada de albergada blaCTX-M-24, blaCTX-M-65, blaCTX-M-55 y blaCTX-M-8, además se encontró grupos clonales epidémicos reconocidos como el ST410, ST131 y ST744, concluyendo que el consumo de comida callejera es una fuente de propagación de *E. coli* BLEE en la ciudad. (48)

- Parques lineales: este estudio se basó en obtener 50 muestras de heces fecales de caninos encontradas en un parque, 20 de las 50 muestras obtenidas presentaron *E. coli* resistente a la ceftriaxona, además se lograron aislar 23 muestras de *E. coli* las cuales presentaron un fenotipo multirresistente (MDR) a tres o más familias de antimicrobianos. (49)

## 9. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

### 9.1 Hipótesis Nula

**HO;** El proceso de biodigestión no elimina las bacterias resistentes a los antimicrobianos presentes en los residuos orgánicos producidos en la hacienda lechera.

**H1;** El proceso de biodigestión elimina las bacterias resistentes a los antimicrobianos presentes en los residuos orgánicos producidos en la hacienda lechera.

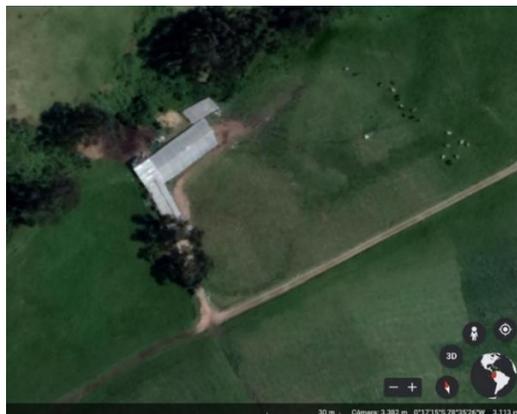
## 10. METODOLOGÍAS / DISEÑO EXPERIMENTAL

### 10.1 Lugar de experimentación

El presente proyecto se realizó en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia La Ecuatoriana, barrio Santa Clara.

#### 10.1.2 Ubicación Geográfica

**Imagen N° 3:** Ubicación geográfica por vista satelital.



Fuente: Google Maps.

- Latitud: 0°17'S
- Longitud: 78°35'O
- Altitud: 3050 msnm
- Clima: Templado
- Temperatura promedio: 15 %
- Movimientos eólicos: Noroeste- Sureste • Humedad promedio: 66% – 67%

### **10.3 Instrumentos**

Autoclave, Modelo 25X-1 Serie 021042, UL

Balanza electrónica, Modelo EHA351

Cámara de flujo.

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

Centrifuga jouan. Modelo winchester. Serie. 00550119

Vortex LB Scientific. Modelo TM-1000. Serie 0407179

Cámara de Flujo Laminar, Modelo BBS-H1100 Serie DBS-11H1408011D/,  
Marca BIOBASE.

Autoclave Portable, Modelo LS-1, Marca HANDYCLAVE

Incubadora, Modelo Basic SNB400, Marca Memmert

Balanza Digital de precisión, Modelo CQT 601, Marca Adam Equipment Inc

Cocineta Eléctrica, Modelo 3411Y Serie A1411BW, Marca Proctor Silex.

Dry Block Heaters, Modelo 1457512 DBI-100, Serie AS20130259623, Marca  
BOECO.

Centrifuga para tubos de alta resolución, Modelo HERMLEZ 160 M, Serie  
82155027, Marca HERMLE.

### **10.4 Trabajo de campo**

1. El muestreo tuvo lugar en el sistema de colecta de residuos y el biodigestor de la hacienda LYG – FARM. (Anexo 6, Imagen 4)

2. Las muestras fueron recolectadas en 3 puntos diferentes. (Anexo 6, Imagen 5)  
Punto 1: Tubo colector de residuos orgánicos, este es la unión de los residuos lecheros que se producen de la sala de ordeño de la hacienda y de los residuos orgánicos de la casa donde habitan los empleados de la hacienda. Se puede encontrar agua residual, restos de heces humanas y animales, desechos de lavandería y cocina (excepto detergentes), teniendo una consistencia semisólida. (Anexo 6, Imagen 6)  
Punto 2: Dentro del biodigestor, aquí se encuentran todos los residuos orgánicos mezclados con la población bacteriana propia del biodigestor en un proceso anaeróbico, teniendo un aspecto de líquido amarillo con muchas partículas sólidas. (Anexo 6, Imagen 7)  
Punto 3: Salida del biodigestor, el producto final es el biol obtenido del mismo proceso mencionado anteriormente, siendo un líquido amarillo con pocos residuos sólidos.
3. Se realizaron 3 repeticiones en cada uno de los puntos mencionados, se recolectó 100 ml. Asegurando primero de obtener una mezcla homogénea en cada uno de los puntos y siempre vertiendo la muestra de manera directa en el vaso de recolección.
4. Se obtuvieron un total de 9 muestras que se conservaron en Mini Fridge a 9°C durante 24 horas. (Anexo 6, Imagen 8)

## **10.5 Trabajo de laboratorio**

### **10.5.1 Cuantificación**

5. Se preparó el medio de cultivo selectivo para *E. coli*, Tryptone Bile Glucoronic Agar (TBX Agar), siguiendo las recomendaciones del fabricante.
6. Se mezcló una cantidad total de 270 ml de agua destilada con 9.88 g de Agar TBX, esta mezcla la repartimos en 2 porciones iguales de 135 ml en cada una, en una de ellas se colocó 5 µl/ml de cefotaxima, mientras que en la otra mitad no se colocó ningún compuesto adicional. (Anexo 6, Imagen 9)
7. Colocamos el agar en las placas petri previamente identificadas, 9 con cefotaxima y 9 sin cefotaxima, teniendo un total de 18 placas, posteriormente dejamos reposar para que solidifique.
8. Las muestras obtenidas se diluyeron de la siguiente forma: (Anexo 6, Imagen 10)  
Punto 1:  $10^{-5}$   
Punto 2:  $10^{-1}$   
Punto 3:  $10^{-1}$

9. Una vez obtenidas las diluciones, 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). (Anexo 6, Imagen 11)
10. El filtro se colocó inmediatamente sobre las placas con el medio de cultivo selectivo.
11. Una vez colocado el nanopore sobre las placas respectivas se dejó cultivar durante 18 horas a una temperatura de  $37 \pm 1$  °C.
12. Pasada las 18 horas, se realizó el conteo de UFC/ml de cada placa para estimar la dinámica de carga bacteriana a través de los tres puntos antes mencionados en el transcurso de los residuos lecheros en el biodigestor.

### 10.1.2 Antibiogramas

13. Pasadas las 18 horas seleccionamos las placas más apropiadas para extracción de colonias para su replique. (Anexo 6, Imagen 12)
14. Se seleccionó 10 placas teniendo en cuenta la morfología y color de las colonias, las mismas fueron sembradas en nuevas placas, preparadas de la misma forma utilizando 150 ml de agua destilada y 5.49 g de agar con una adición de 6  $\mu\text{l}$  de ceftriaxona (CRO).
15. Se realizó una suspensión de cada una de las colonias de un cultivo puro, en 10 mililitros (ml) de suero fisiológico estéril, a una concentración de 0.5 MacFarland.
16. Posteriormente, se sembró homogéneamente esta suspensión en cajas petri con agar Mueller Hinton. Se dispuso sobre el agar, discos de inhibición que se indican en la siguiente tabla: (Anexo 6, Imagen 13)

**Tabla N° 2:** Familia de cada uno de los antibióticos usados y su respectiva abreviatura.

<b>Familia</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>Abreviatura</b>
<b>Aminoglucósidos</b>	<i>Amikacina</i>	AK
	<i>Gentamicina</i>	CN
	<i>Netilmicina</i>	NET
<b>Quinolonas</b>	<i>Ácido nalidíxico</i>	NA
	<i>Ciprofloxacina</i>	CIP
	<i>Levofloxacina</i>	LEV
	<i>Norfloxacino</i>	NOR

<b>Beta-lactámicos</b>	<i>Aztreonam</i>	ATM
	<i>Cefoxitina</i>	FOX
	<i>Cefepima</i>	FEP
	<i>Cefotaxima</i>	CTX
	<i>Ceftazidima</i>	CAZ
	<i>Imipenem</i>	IMP
<b>Tetraciclinas</b>	<i>Doxiciclina</i>	DO
	<i>Tetraciclina</i>	TE
<b>Fosfonatos</b>	<i>Fosfomicina</i>	FF
<b>Macrólidos</b>	<i>Azitromicina</i>	AZM
<b>Anfenicoles</b>	<i>Cloranfenicol</i>	C
<b>Nitrofuranos</b>	<i>Nitrofurantoína</i>	F
<b>Antagonistas del folato</b>	<i>Sulfametoxazol/trimetoprima</i>	STX
<b>Glicilciclinas</b>	<i>Tigeciclinas</i>	TGC

17. Se incubó a 37°C por 24 horas.

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

**Tabla N° 3:** Parámetros de susceptibilidad de los antibióticos utilizados.

	<b>Antimicrobianos</b>		<b>≥S</b>	<b>SDD</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
1	Aztreonam	30µg	21	-	18-20 <sup>^</sup>	17
2	Ácido nalidíxico	30µg	19	-	14-18	13
3	Amikacina	30µg	17	-	15-16 <sup>^</sup>	14
4	Azitromicina	15µg	13	-	-	12
5	Cefotaxima	30µg	26	-	23-25 <sup>^</sup>	22
6	Ceftazidima	30µg	21	-	18-20 <sup>^</sup>	17
7	Cefepima	30µg	25	19-24	-	18
8	Cefoxitina	30µg	18	-	15-17 <sup>^</sup>	14
9	Ciprofloxacina	5µg	26	-	22-25 <sup>^</sup>	21

10	Cloranfenicol	30µg	18	-	13-17	12
11	Doxiciclina	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	Netilmicina	30µg	15	-	13-14 <sup>^</sup>	12
17	Nitrofurantoína	300µg	17	-	15-16	14
18	Norfloxacino	10µg	17	-	13-16	12
19	Sulfametoxazol/ trimetoprima	5µg	16	-	11-15	10
20	Tigeciclina	15µg				
21	Tetraciclina	30µg	15	-	12-14	11

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

### 10.5.3 Extracción de ADN.

19. En 10 tubos eppendorf se colocó 300 µl de TE buffer (1N TRIS, 05M EDPA, pH 8,0) por cada uno de estos, adicionalmente en la misma cantidad de tubos eppendorf se colocó 1000 µl de Caldo de soja tréptica (TSB), Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA. La cual se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante, dándonos un total de 0.3 g de TSB en 10 ml de agua destilada. (Anexo 6, Imagen 14)
20. Se identificaron con códigos a cada una de las colonias que fueron tomadas para la muestra, al igual que los tubos eppendorf con cada uno de los medios. (Anexo 6, Imagen 14)
21. Se realizó un raspado en cada una de las colonias seleccionadas con un asa estéril, la misma que se introdujo primero en el tubo eppendorf que contenían medio TE, y posteriormente la misma asa se introdujo en los tubos eppendorf que contenían el caldo TSB. (Anexo 6, Imagen 14)
22. Al finalizar el procedimiento antes mencionado, los 10 tubos eppendorf con caldo TSB se llevaron a incubar durante 24 h, para posterior agregar 500 µl de glicerol para su almacenamiento como ADN de respaldo. (Anexo 6, Imagen 14)
23. Por otro lado, los 10 tubos eppendorf con medio TE buffer se llevaron al termo bloque durante 10 minutos a una temperatura de 90 °C, para luego ser centrifugados durante

3 minutos a 12400 rpm. Finalmente, se extrajeron 150  $\mu$ l del sobrenadante (ADN), los cuales fueron depositados en nuevos tubos eppendorf previamente identificados de acuerdo con las colonias tomadas. (Anexo 6, Imagen 15)

#### 10.5.4 Técnica de PCR múltiple para análisis *bla*<sub>CTX-M</sub>

24. Se seleccionó el m-PCR Master Mix Hot Start Taq (GOLDBIO) 12.5  $\mu$ l (2x), iniciador derecho 1  $\mu$ l (10mM), iniciador izquierdo 1  $\mu$ l (10mM) (Eurofins Genomics 8785689) ADN 3.5  $\mu$ l (~200 nmol) y agua libre de nucleasas hasta completar 25  $\mu$ l. (Anexo 6, Imagen 16)
25. Se colocó los tubos eppendorf para m-PCR en el termociclador según los protocolos correspondientes a cada familia génica *bla*<sub>CTX-M</sub>. (Anexo 6, Imagen 16)

**Tabla N° 4:** Protocolo m-PCR 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>Foward</b>	CCC ATG GTT AAA TCA CTG C		TGG TGA CAA AGA GAG TGC AAC G		ATG ACT CAG AGC ATT CG		TGA GAC ATC GCG TTA AG	
<b>Reverse</b>	CAG CGC TTT TGC CGT CTA AG		TCA CAG CCC TTC GGC GAT		TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC		TAA CCG TCG GTG ACG ATT TT	

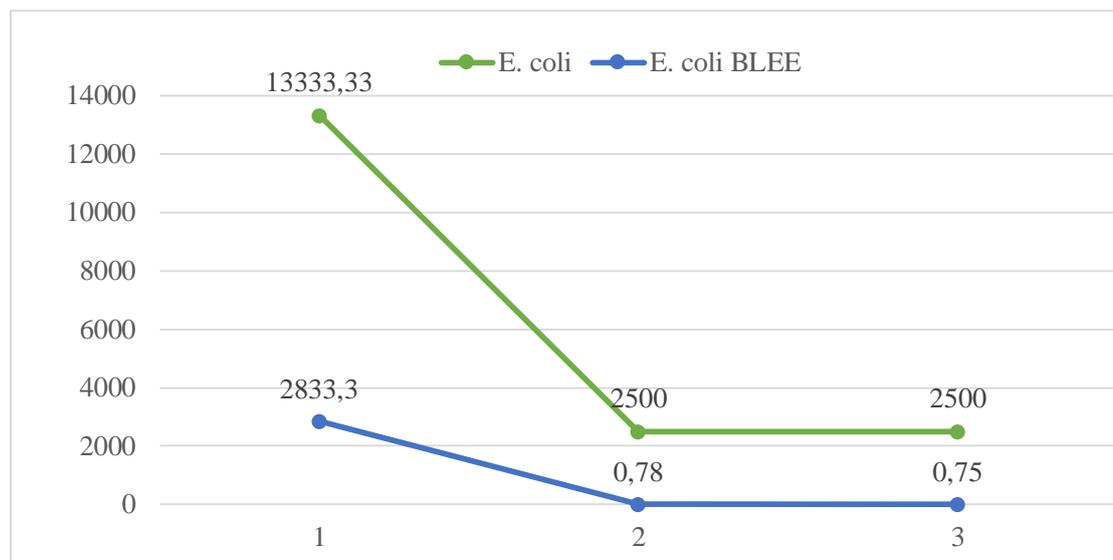
26. Se preparó el gel de agarosa con 80 ml de TBE 5x, 1.5 g de Agarosa y Sybr gold (1  $\mu$ l), el cual se colocó en la cámara de solidificación con un peine que enmarca los espacios donde posteriormente introduciremos el resultado m-PCR (5  $\mu$ l). (Anexo 6, Imagen 16)
27. Una vez completado este proceso colocamos el gel en la cámara de electroforesis a 150 V- 400 mAh durante 45 minutos. (Anexo 6, Imagen 17)
28. Transcurrido los 45 minutos llevamos el gel al transiluminador, para observar las bandas de acuerdo con el peso molecular del gen, que son los siguientes: *CTX-M1* (150 – 200 pb); *CTX-M2* (250 – 300 pb); *CTX-M8* (300 – 350 pb); *CTX-M9* (200 – 250 pb).

## 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 11.1 Cuantificación

Las bacterias resistentes a los antimicrobianos o superbacterias están tomando cada vez más relevancia debido a la rapidez con la que las mismas se propagan, esta propagación se debe principalmente a la liberación de dosis subterapéuticas de antimicrobianos en las excretas de los animales (4,23), por lo tanto, es necesario probar alternativas que mitiguen este problema bajo concepto de “Una sola salud”. Por ejemplo, la digestión anaeróbica podría controlar la población de patógenos a un nivel aceptable para la seguridad de la salud pública (50).

**Gráfico N° 1.** Frecuencia de presentación de *E. coli* y *E. coli* BLEE, en los puntos de muestreo del paso de los residuos lecheros por el biodigestor. (La concentración de bacterias está expresada en UFC/ml)



En consecuencia, se cuantificó la *E. coli* BLEE en el proceso de biodigestión de los residuos lecheros. En el primer punto de muestreo (SP1), entrada de los residuos lecheros al biodigestor (Gráfico 1), se encontró alrededor de 2833,33 UFC/ml, mientras que *E. coli* cuantificó, 13333,3 UFC/ml. La elevada presencia de *E. coli* BLEE en el SP1 podría explicarse por la excreción de los residuos de fármacos en las heces (4), Molina G et al., 2020 realizaron un proyecto piloto instalando también un biodigestor en una unidad productiva agropecuaria (UPA) con el fin de evaluar el efecto de la biodigestión en el conteo de *E. coli* BLEE a partir de los desechos fecales donde obtuvieron una carga promedio de *E. coli* BLEE de 1120 UFC/ml en la entrada del biodigestor (51), aproximadamente el 50% menos que el resultado obtenido en esta investigación.

De la misma forma no hay que pasar por alto la cantidad de *E. coli* encontrada, aunque forme parte de la flora bacteriana normal, también es un indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos (52). En un estudio llevado a cabo a partir de muestras fecales de bovinos se cuantificó concentraciones mínimas y máximas de *E. coli* fueron  $2,5 \times 10^1$  UFC/ml y  $2,3 \times 10^5$  UFC/ml, respectivamente (53), mostrando que los resultados son superiores a los obtenidos. (Gráfico 1)

En cambio, dentro del biodigestor en el segundo punto de muestreo (SP2) (Gráfico 1), se evidenció un descenso de la cantidad de *E. coli* BLEE a 0,78 UFC/ml, así también bajó la cantidad total de *E. coli* a 2500 UFC/ml, lo cual podría indicar que, en el proceso de digestión anaerobia, dentro del biodigestor, existen varios factores que disminuyen la cantidad de *E. coli* BLEE y *E. coli*, uno de estos factores podría ser la temperatura que juega un rol importante en el proceso, ya que, como señalan varios autores, la digestión anaerobia puede ocurrir tanto en rangos de temperatura mesófila (20 a 37 °C) como termófila (55 a 65 °C) siendo una de las condiciones primordiales dentro de cualquier biodigestor según la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos (USEPA) (50) el biodigestor utilizado funciona a una temperatura mayor a 20 °C (33). En este mismo aspecto, Berggren et al., 2005, confirmó que temperaturas de 15 °C a 25 °C eran suficientes para la reducción de *E. coli* debido a que es un microorganismo mesófilo, así mismo, también afirmó que temperaturas termófilas son mucho más eficientes en la digestión anaerobia porque no solo influye directamente en el proceso de reducción de *E. coli* acelerándolo, sino también la producción de biogás y biol (31,50,54), confirmando que la temperatura podría ser uno de los factores responsables de la reducción de este microorganismo.

Conjuntamente, otro factor que podría influir en la reducción de *E. coli* BLEE es la sintrofia, una forma de simbiosis de dos o más grupos de bacterias metabólicamente diferentes que combinan sus capacidades obteniendo el poder para degradar o catabolizar diversos sustratos Amani et al., 2010 (55,56), varios estudios demostraron que en la digestión anaerobia se puede encontrar varios grupos de bacterias con características sintróficas (*Clostridium*, *Lactobacillus*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei* y *Smithella sp.*) (29,57,58) responsables de las etapas acetogénicas y metanogénicas dentro del biodigestor, en donde más radica la importancia de esta simbiosis debido a que son las principales etapas encargadas de la producción de biol (59), ya que, están logrando una alta tasa de degradación de diferentes sustratos debido a que actúan sobre los

productos resultantes de las etapas anteriores (55). Por ejemplo, se ha demostrado que los grupos de bacterias con características sintróficas que se encuentran en el proceso de digestión anaerobia de los desechos y que cumplen varias funciones durante el mismo, tienen la capacidad de remoción del 99,99% en coliformes totales como *Salmonella spp.* y *E. coli*, pero en este último, tienen mayor cantidad de remoción con un 99,10% (56).

**Tabla N° 5:** Cuantificación de *E. coli* y *E. coli* BLEE en los puntos de muestreo.

	SP1	SP2	SP3
<b><i>E. coli</i> /100ml</b>	13333,3	2500	2500
<b><i>E. coli</i> resistente a CTX/100ml</b>	2833,3	0,78	0,75
<b>Ratio <i>E. coli</i> resistente a CTX/ <i>E. coli</i> total</b>	1/4	1/3205	1/3333

En el SP3 se contabilizó una disminución significativa de *E. coli* BLEE a 0,75 UFC/ml (Tabla 5), resultados similares a los obtenidos por Molina G et al., 2020 en el mismo biodigestor (51), es necesario más réplicas de este hallazgo, sin embargo, es evidente que el biodigestor reduce la cantidad de *E. coli* BLEE en el tratamiento de los residuos lecheros. Así mismo, aunque disminuye en menor cantidad, también mantiene la presencia de *E. coli*, justamente la cuantificación en el SP3 da una cantidad de 2500 UFC/ml, que representa el 18% del total de *E. coli* que ingreso en el SP1 y según un ensayo realizado en Galicia-España a partir de heces de bovinos y humanos para determinar la prevalencia y características de cepas de *E. coli* obtuvieron que el predominio de este microorganismo en animales sanos oscila entre el 7 y 30 % (60).

**Tabla N° 6:** Comparación de la reducción de *E. coli* BLEE entre el SP1 y SP3. (Resultados expresados en porcentajes)

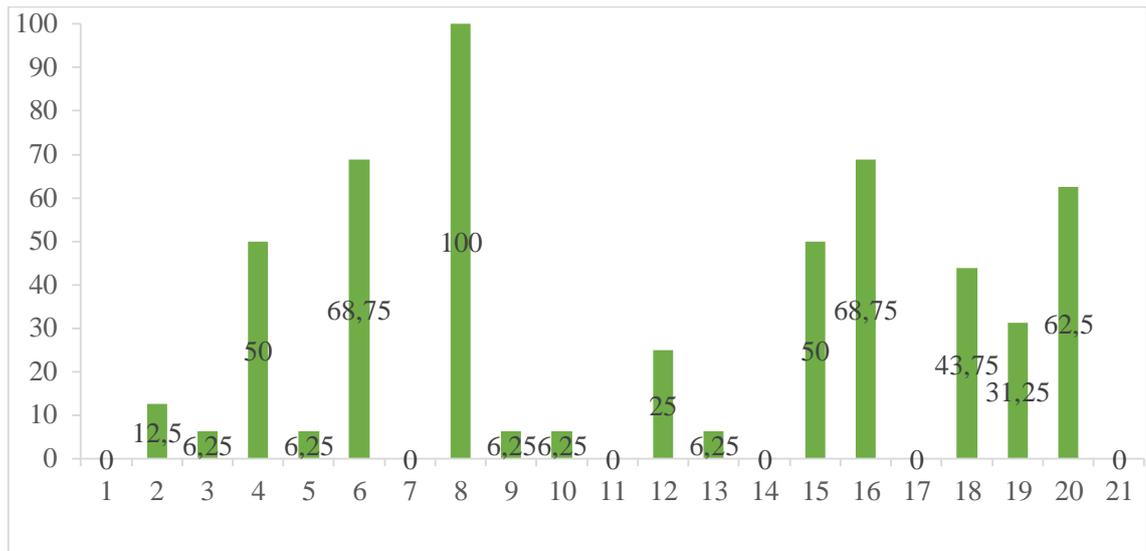
	SP1	SP3
<b><i>E. coli</i> resistente a CTX/100ml (UFC)</b>	2833,3	0,75
<b><i>E. coli</i> resistente a CTX / %</b>	100%	0,026%
<b>% de reducción de <i>E. coli</i> resistente a CTX</b>	99,97%	

En la Tabla 6, podemos observar la diferencia significativa en cuanto al porcentaje obtenido en el SP1 y SP3, donde el biodigestor redujo en un 99,97% la *E. coli* BLEE, estos resultados nos confirman la eficacia del uso del biodigestor como medida para combatir la resistencia a los antimicrobianos (RAM) o al menos limitar de alguna forma su diseminación.

## 11.2 Antibiogramas

La presencia de *E. coli* BLEE aisladas en la hacienda lechera LYG FARM presentaron multiresistencia (Gráfico 1), a 15 de los 21 antimicrobianos testeados y 8 de las 10 familias de antimicrobianos. (Grafico 2)

**Gráfico N° 2.** Perfil de susceptibilidad de las *E. coli* BLEE a ceftriaxona aisladas de la hacienda lechera LYG.



Nota: Las barras indican el valor en porcentaje de la presencia de resistencia antimicrobiana, donde 1, amikacina; 2, aztreonam; 3, azitromicina; 4, cloranfenicol; 5, ceftazidima; 6, ciprofloxacina; 7, gentamicina; 8, cefotaxima; 9, doxiciclina; 10, nitrofurantoína; 11, cefepima; 12, fosfomicina; 13, cefoxitina; 14, imipenem; 15, levofloxacina; 16, ácido nalidíxico; 17, netilmicina; 18, norfloxacina; 19, trimetoprima / sulfametoxazol; 20, tetraciclina; 21, tigeciclina.

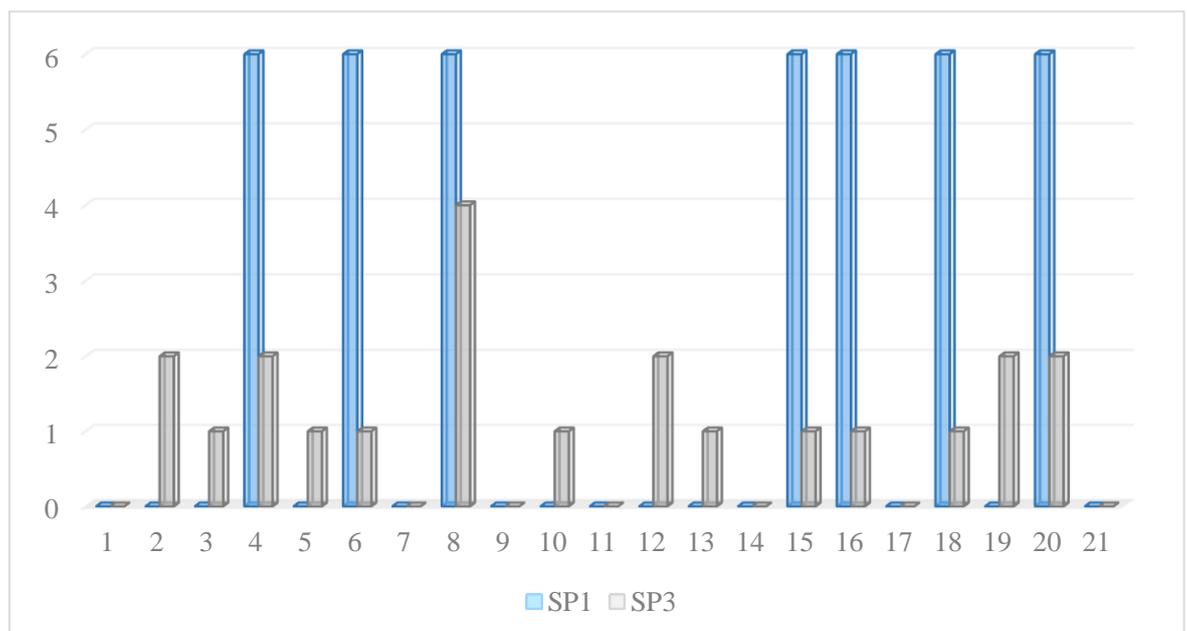
Entre los antimicrobianos con mayor presencia de resistencia, se encuentra el cloranfenicol, la ciprofloxacina, la cefotaxima, la fosmocina, la levofloxacina, el ácido nalidíxico, la norfloxacina, el sulfametoxazol-trimetoprima y la tetraciclina, de la misma manera, en un estudio realizado con hisopado de canales bovinos y de contenido cecal mostro resistencia a 9 de 25 antimicrobianos utilizados, en donde, todos los aislados presentaron resistencia a antimicrobianos como cloranfenicol, la ceftriaxona, el sulfametoxazol-trimetoprima, la tetraciclina, mientras que la amikacina, la estreptomina y la cefalotina mostraron resistencia en un 28, 24 y 20% respectivamente (61). A la vez, un estudio efectuado en provincias de Lamphun en Tailandia, donde cultivaron *E. coli* BLEE de muestras fecales de terneros y vacas lecheras encontraron resistencia en antimicrobianos como: amoxicilina, ceftiofur, cefalexina, cefalotina, cloxacilina, estreptomina, oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima y enrofloxacin (62). Lo que muestra una similitud con los datos obtenidos en la hacienda lechera LYG FARM en los resultados de resistencia antimicrobiana, debido a que este grupo de antimicrobianos,

han sido los más usados en la práctica diaria, debido a la importancia que logran tener dentro del tratamiento de enfermedades o a la vez como promotores de crecimiento (63).

La multirresistencia indica que, a pesar de que en la hacienda lechera se tiene un correcto manejo de los diferentes antimicrobianos y la idea principal es la prevención de enfermedades para reducir el uso de estos, se puede encontrar altos rastros de resistencia en un elevado número de antimicrobianos, esto se puede dar debido a que por mucho tiempo las principales familias de antimicrobianos que se usan en ganado bovino han sido las tetraciclinas, quínoles, anfenicoles y beta-lactámicos, la mayoría de estos usados debido al efecto de larga acción que tienen sobre el individuo y en caso de las cefalosporinas de tercera generación al poco o nulo tiempo de retiro que tienen (64).

Por otro lado, revisando de manera individual en el SP1, se encontró que la resistencia a los antimicrobianos se presentó en 7 de los 21 antimicrobianos usados, (Gráfico 3). Mientras que el SP3, que ya es la salida de todos los desechos orgánicos transformados en biol, encontramos la presencia de resistencia en 14 de los 21 antimicrobianos probados (Gráfico 4).

**Gráfico N° 3.** Comparación del perfil de susceptibilidad de las *E. coli* BLEE a ceftriaxona aisladas de la hacienda lechera LYG, del Punto 1 (SP1) y Punto 3 (SP3). (Valores expresados en unidades)



Nota: las barras indican el valor en unidades de la presencia de resistencia antimicrobiana, donde 1, amikacina; 2, aztreonam; 3, azitromicina; 4, cloranfenicol; 5, ceftazidima; 6, ciprofloxacina; 7, gentamicina; 8, cefotaxima; 9, doxiciclina; 10, nitrofurantoína; 11, cefepima; 12, fosfomicina; 13, cefoxitina; 14, imipenem; 15, levofloxacina; 16, ácido nalidíxico; 17, netilmicina; 18, norfloxacina; 19, trimetoprima / sulfametoxazol; 20, tetraciclina; 21, tigeciclina.

De manera estadística (Tabla 7), es posible describir que en 7 de los antimicrobianos probados no hubo ninguna representación estadística debido a que la cefotaxima, por ejemplo, presentó resistencia total en los 3 puntos de muestreo, por otro lado, antimicrobianos como la amikacina, cefepima, tigeciclina, gentamicina, netilmicina e imipenem no presentaron sensibilidad en los 3 puntos de muestreo, mientras que en 8 antimicrobianos probados, el p-value fue superior a 0.05, así es el caso de la azitromicina, ácido nalidíxico, cefoxitina, doxiciclina, nitrofurantoína, ceftazidima, fosfomicina y sulfametoxazol-trimetoprima, los mismos que presentaron un incremento en la resistencia antimicrobiana en el SP3. Por último, el p-value mostro diferencia significativa ( $< 0.05$ ) en 6 antimicrobianos de los 21 probados como son: ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, aztreonam, norfloxacina y levofloxacina, debido a que su reducción se evidencia desde el SP1 al SP3.

**Tabla N°7:** Prueba estadística de la resistencia y sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

<b>Antibióticos</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>P-value</b>
<i>Amikacina</i>	AK	-
<i>Gentamicina</i>	CN	-
<i>Netilmicina</i>	NET	-
<i>Ácido nalidíxico</i>	NA	0,09
<i>Ciprofloxacina</i>	CIP	0,04
<i>Levofloxacina</i>	LEV	0,02
<i>Norfloxacina</i>	NOR	0,01
<i>Aztreonam</i>	ATM	0,002
<i>Cefoxitina</i>	FOX	0,20
<i>Cefepima</i>	FEP	-
<i>Cefotaxima</i>	CTX	-
<i>Ceftazidima</i>	CAZ	0,19
<i>Imipenem</i>	IMP	-
<i>Doxiciclina</i>	DO	0,57
<i>Tetraciclina</i>	TE	0,04
<i>Fosfomicina</i>	FF	0,15
<i>Azitromicina</i>	AZM	0,20

<i>Cloranfenicol</i>	C	0,007
<i>Nitrofurantoína</i>	F	0,20
<i>Sulfametoxazol/trimetoprima</i>	STX	0,11
<i>Tigeciclina</i>	TGC	-

Nota: P-value  $\leq 0,05$  es significativo.

La *E. coli* es el organismo con una naturaleza tan versátil, debido a que tiene una alta habilidad para sobrevivir en muchos ambientes, para tomar partes de código genético de otras fuentes y para replicarse rápidamente (65). Por ejemplo, en un estudio de antagonismo entre *P. aeruginosa* y *E. coli*, la *E. coli*, tras estar en exposición contra las toxinas de *P. aeruginosa*, mostraron una evolución molecular paralela y una convergencia adaptativa en cuanto a genes (66). Basándose en esto, podemos considerar que la exposición de *E. coli* a diferentes microorganismos dentro de un sistema anaeróbico provocaría que este comience a adaptarse a nivel genético, incluso para movilizar genes de resistencia a sus futuras generaciones.

De igual manera, los rasgos de resistencia a múltiples antimicrobianos puede transferirse por conjugación de la bacteria resistente a la sensible por medio de plásmidos, dando lugar a nuevas especies o cepas resistentes (67). Entonces, este es uno de los métodos más importantes para la movilización de genes de resistencia, debido a que los plásmidos son quienes replican y codifican proteínas para nuevos genes y que pueden ser heredables de manera estable, especialmente los asociados a resistencia antimicrobiana, muchos de estos plásmidos son capaces de ser transferidos a un amplio rango de huéspedes a tal punto de pasar límites de género y especie (68). Mientras que otro método utilizado y que va asociado a los genes que codifican las BLEE son los integrones, que son secuencias de ADN lineales capaces de captar genes de resistencia, que en su mayoría son genes de resistencia a antimicrobianos, mediante una secuencia integrasa (*intl*) y se logra expresar el gen gracias a una secuencia promotora ( $P_{ant}$ ) (69), lo que prácticamente hacen es captar genes de resistencia antimicrobiana que pueden ser expresados después, ahora, la diseminación que más se asocia con el uso del biodigestor es la horizontal, ya que en esta, existe una recombinación homóloga entre cepas o especies cercanamente relacionadas, integrando nueva información genética permitiendo una adaptación rápida a nuevos ambientes o a condiciones ambientales desfavorables y la participación en el

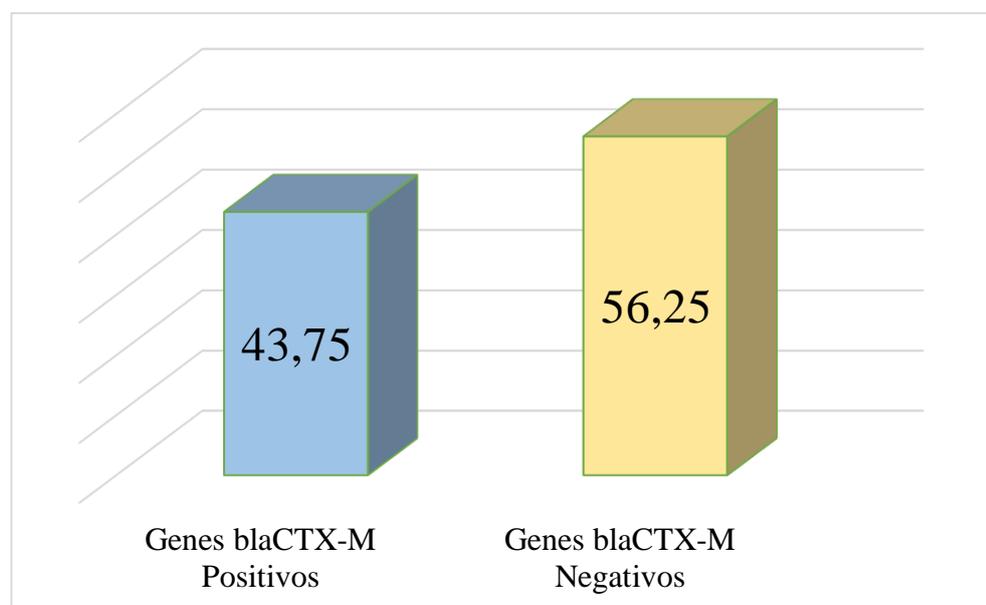
establecimiento de procesos de cooperación microbiana, ya sea por medio de los plásmidos o de los integrones que logran esta diseminación horizontal (70).

En consecuencia, las características físicas que ocurren dentro del biodigestor: la temperatura, la sintrófia y la transmisión horizontal que ocurre por medio de los plásmidos dentro del biodigestor podrían ser los responsables del incremento de antimicrobianos utilizados en el SP3 a diferencia del SP1, que presenta un número menor de resistencia a los antimicrobianos probados, aunque estadísticamente los valores totales son mucho más bajos que al inicio (Gráfico 3).

### 11.3 Análisis *bla*<sub>CTX-M</sub>

Los primeros reportes del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> se dieron a fines de la década de 1980 en Japón, Europa y Argentina, pero para 1990 se produjo la propagación masiva de cepas productoras de este gen en Argentina y países vecinos, especialmente alotipos del grupo *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. Durante los últimos 15 años, las BLEE tipo CTX-M ha experimentado una expansión rápida y global, las cepas de enterobacterias que producen estas enzimas ahora se han informado en casi todas partes y, en la actualidad, se conocen más de 50 variantes alélicas. De esta forma, las enzimas de tipo CTX-M superan en número a las BLEE clásicas de tipo TEM y SHV. (71)

**Gráfico N°4:** Comparación de la presencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> de los cultivos de *E. coli* BLEE obtenidos en la hacienda lechera LYG FARM. (Datos expresados en porcentaje)



Así mismo, los resultados muestran que el 43.75% de las *E. coli* resistentes a BLEE contienen genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, los cuales son dominantes sobre otros tipos de genes de resistencia, como lo mencionamos anteriormente.

**Tabla N°8:** Genotipificación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> a partir de *E. coli* BLEE aislada de los residuos ganaderos del proceso de biodigestión.

<b><i>bla</i><sub>CTX-M</sub></b>				
<i>Gen</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
<i>Cuantificación</i>	0	0	12	2

Incluso existen algunas variantes que pueden ser dominantes sobre otras dentro de la misma familia *bla*<sub>CTX-M</sub> debido a su presencia natural en los diferentes medios. En la cuantificación, el primer gen evaluado fue el *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, mismo que se describió por primera vez en *E. coli* BLEE humana en 1989 en Alemania (72) y del cual se evidenció una nula presencia dentro del ensayo (Tabla 7). Lo cual coincide con una investigación realizada a partir de las heces de varios animales (42 de perros, 22 de cerdos, 66 de bovinos, 32 de pollos y 11 de caballos) en Canadá para identificar la diversidad de *E. coli* *bla*<sub>CTX-M</sub> reportó que el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> fue la variante dominante encontrada en aislamientos de pollos (91%) y caballos (100%), mientras que en bovinos solo alcanzó una presencia del 5% (73), esto explicaría su ausencia en los aislamientos realizados dentro de esta investigación (Tabla 7). Del mismo modo, puede sugerir que los elementos genéticos que llevan esta variante dan como resultado una ventaja selectiva particular en estas especies animales, ya sea a través de la colonización, la adaptación metabólica al tracto digestivo del huésped o una mayor estabilidad ambiental. (73)

Por otra parte, el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> tampoco se presentó dentro de la cuantificación (Tabla 7), y justamente se ha informado que en este grupo la frecuencia de presentación es hospitalaria y es la más predominante, sobre todo en regiones de Europa y Asia (74). Por ejemplo, en Japón, en una investigación realizada en todos los hospitales del seguro social, encontraron que 127 de 165 aislados de *E. coli* BLEE pertenecían al grupo *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (75), igualmente, en otra investigación realizada en España, a partir de heces fecales de humanos en un hospital, este mismo gen fue el más prevalente con un 81, 54% (76). De esta forma, podemos justificar la ausencia del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> dentro de la investigación debido a su prevalencia en el ámbito hospitalario.

Mientras tanto, el gen *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, también ha sido reportado en múltiples especies, especialmente en aves y bovinos que son destinados para la faena y el consumo para humanos (77,78), lo que ha generado un problema de salud pública a nivel mundial, ya que la diseminación de los genes se está provocando de manera directa por el consumo de alimentos de origen animal que tienen los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> dentro de sus tejidos (79,80).

De manera simultánea, se evidenció que el gen más prevalente es el *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (Tabla 7), este se detectó en Japón como primera descripción de *E. coli* BLEE en heces bovinas (72), el mismo que se logró aislar en pacientes del Hospital Vicente Corral Moscoso en Cuenca-Ecuador, donde 9 de 45 resultaron positivos para este tipo de gen de *E. coli* BLEE (81). Mientras que en especies animales el gen se ha podido encontrar en el intestino sano de especies de consumo humano, como son bovinos y aves de engorde. (79,80)

**Tabla N°9:** Comparación del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> a la entrada (SP1) y salida (SP3) del biodigestor.

	# de aislamientos	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	% total en cada punto	% de reducción de <i>E. coli bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
SP1	6	6	100%	75%
SP3	4	1	25%	

Con los datos obtenidos (Tabla 8), se puede reportar que la *E. coli* BLEE se puede hallar de manera natural en las producciones bovinas lecheras. Así mismo, este gen ha sido reportado en especies de consumo humano como son aves y porcinos, aisladas de muestras que han sido tomadas directamente de la carne a consumir (82). Es aquí donde el manejo de los residuos lecheros son un punto clave para lograr reducir la diseminación hacia el medio, ya que con la ayuda del biodigestor se logró reducir la presencia de *E. coli* BLEE con genes de resistencia, especialmente del grupo *bla*<sub>CTX-M-2</sub> alcanzando un 75%, resultado bastante significativo.

Finalmente, se puede reportar que el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-8</sub> son los que se presentaron dentro de la investigación, así nos confirma también un estudio realizado apenas en 2020 en ganado brasileño que reportó que el gen *bla*<sub>CTX-M-8</sub> fue el más frecuente seguido del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (78).

## 12. IMPACTOS SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS

### 12.1 Impacto Ambiental:

La contaminación por residuos lecheros bovinos y haciendo más hincapié en el estiércol, es uno de los temas más notables actualmente debido al casi nulo o mal manejo y tratamiento de estas. La mayoría de las producciones bovinas en el Ecuador generan acumulación de estiércol, el mismo que es capaz de alcanzar diferentes ambientes como el agua, suelo, aire y también seres vivos afectándolos de diferentes maneras y ocasionando problemas medioambientales bastante graves. De hecho, en un informe realizado por la FAO se señala que la producción pecuaria es precisamente una de las causas principales de los problemas ambientales más apremiantes del mundo (83) teniendo en cuenta el calentamiento global, cambio climático, la degradación de las tierras, la contaminación atmosférica y del agua, y la pérdida de biodiversidad.

Resultado de todo esto, en el Ecuador, el sector agrícola hasta el 2012 contribuyó con el 18,17% del total de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) dentro de este el 43,43 % y el 2,34 % correspondían a la fermentación entérica y manejo del estiércol respectivamente conforme lo dice el Ministerio de Ambiente en 2017, y el porcentaje restante incluye a otras problemáticas como los riesgos de desertificación y proliferación de microorganismos patógenos altamente resistentes a antimicrobianos. (14)

### 12.2 Impacto Social:

Las consecuencias para el mundo y sus habitantes no se alejan de la ficción de las películas, pues los elementos vitales están siendo afectados cada vez más por acciones indebidas que en algunos años nos impedirán tener un ambiente adecuado para poder vivir. El tema de la Salud Pública es un impacto social bastante fuerte debido a que involucra tanto a personas como animales, es así que, a inicios del año 2000 fue introducido el concepto “Una Sola Salud” (en inglés, *One health*) en donde varias áreas de trabajo como la seguridad alimentaria, el control de zoonosis y el control de resistencias a los antimicrobianos (84) interactúan entre sí para lograr contralar enfermedades que afectan terriblemente a la sociedad como sucede actualmente con el COVID-19.

Así pues, el mundo necesita urgente de medidas de control y prevención para tener una intersección humano-ambiente-animal apropiada sabiendo que están interconectadas, pero son interdependientes.

Pero, en Ecuador el uso de biodigestores aun no es tan común como debería y eso se debe a varios factores como el subsidio al gas que existe en el país que, como en Bolivia, lo hace muy accesible a los productores y, por otro lado, la alta cobertura de la red eléctrica (37). Y aunque las políticas nacionales de Ecuador han intentado la democratización de los biodigestores desde varios ministerios (37), aún hace falta difusión de información acerca de las ventajas del uso de esta herramienta, especialmente como medida para restringir la propagación de la RAM, además de ser una fuerte arma de mitigación del cambio climático por el que actualmente atraviesa el mundo.

### 13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 13.1 Conclusiones

- En las producciones bovinas lecheras se puede llegar a cuantificar altos números de bacterias nocivas, especialmente *E. coli* y *E. coli* BLEE, el manejo y uso adecuado de antimicrobianos no es suficiente para detener la diseminación de estas bacterias. Por lo que al implementar el uso de un biodigestor para el manejo de residuos lecheros se logró reducir a niveles muy bajos la presencia de *E. coli* BLEE, lo que influiría directamente en el ámbito de la salud pública y por consiguiente en el concepto de “Una sola salud”, ya que devolveríamos residuos con bajos niveles de *E. coli* y *E. coli* BLEE al ambiente, incluso podemos obtener fertilizante libre de estas bacterias para utilizarlo de manera segura en los diferentes cultivos agrícolas.
- Aunque el biodigestor es capaz de reducir la presencia de *E. coli* BLEE, al mismo tiempo, debido a las condiciones físicas, la adaptabilidad y la evolución de la *E. coli* también puede llegar a presentar una variabilidad en la multirresistencia de determinados antimicrobianos en los productos obtenidos del biodigestor.
- Por otro lado, los genes tipo bla<sub>CTX-M</sub> están teniendo cambios muy rápidos e impredecibles en cuanto a su adaptabilidad y diseminación, especialmente el gen bla<sub>CTX-M-2</sub> por su alta cuantificación en la investigación; además, su presencia se encuentra especialmente en especies de producción que están destinadas para el consumo por lo que es de suma importancia dentro de la seguridad alimentaria.

### 13.2 Recomendaciones

- Son necesarios más estudios dentro de nuestro país, ya que son muy limitados los que existen y esta información es relevante para establecer medidas para ayudar a la vigilancia y control de la propagación de la *E. coli* BLEE.
- En el plano investigativo, específicamente en la metodología existen algunas acciones importantes que se recomiendan para posteriores investigaciones, como: el control y vigilancia de la temperatura del biodigestor, el tiempo de retención de los residuos que ingresan en el mismo, el estudio más minucioso de los microorganismos que se encuentran en la digestión anaerobia y sustancias o componentes que se puedan añadir a la elaboración de biol para tener un porcentaje de reducción mucho más alto e incluso eliminar las bacterias resistentes a antimicrobianos sin alterar los componentes nutricionales del biol.
- Es fundamental reforzar políticas y reglamentos desde los entes reguladores para tener un mayor control de la venta y uso de estos fármacos, en la práctica diaria veterinaria es esencial la prevención de enfermedades mediante el mejoramiento y la implementación de planes de bioseguridad e higiene para evitar el uso de antimicrobianos, de la misma forma erradicar su uso como estimulador de crecimiento en los animales además se debe suministrar de forma adecuada estos fármacos teniendo en cuenta la dosificación y uso específico, es importante denunciar a personas que ejerzan la medicina veterinaria sin poseer título universitario.
- Es indispensable la aplicación de pruebas de laboratorio y complementarias para un buen diagnóstico de enfermedades y evitar emplear antimicrobianos inadecuados.

### 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2020 [citado 18 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Por qué es tan difícil desarrollar nuevos antibióticos. BBC News Mundo [Internet]. [citado 14 de julio de 2021]; Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-41776539>

3. MSP. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2018. 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)
4. Calvo ML, López UP. ¿Qué papel tiene la agricultura en la transmisión de la resistencia a antibióticos? [Internet]. The Conversation. [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: <http://theconversation.com/que-papel-tiene-la-agricultura-en-la-transmision-de-la-resistencia-a-antibioticos-126369>
5. Ortega-Paredes D, Barba P, Mena-López S, Espinel N, Crespo-Pérez V, Zurita J. High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. *J Water Health*. 31 de diciembre de 2019;18.
6. Ortega-Paredes D, Barba P, Mena-López S, Espinel N, Zurita J. *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring bla CTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *Int J Food Microbiol*. 1 de mayo de 2018;280.
7. Bernal JLC, Cuenca LAB, Ortega YBS. Producción ganadera: la deforestación y degradación del suelo, una estrategia para el desarrollo sostenible. *Rev Científica Agroecosistemas*. 12 de mayo de 2020;8(1):77-82.
8. @NatGeoES. La resistencia a los antibióticos mata a 700.000 personas cada año [Internet]. National Geographic. 2018 [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.es/ciencia/2018/11/la-resistencia-los-antibioticos-mata-700000-personas-cada-ano>
9. Hernández AMG, Vázquez EG, Torres AH, Gómez JR, Yagüe G, Martínez JAH, et al. Bacteremias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*. 2011;24(2):57-66.
10. FAO. El sector lechero mundial: Datos [Internet]. 2016. Disponible en: <http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1>

11. Galetto A. Situación de la cadena láctea en América Latina en el 2018 [Internet]. FEPALE; 2019. Disponible en: [https://fepale.org/site/wp-content/uploads/2021/04/Informe\\_Observatorio\\_Cadena\\_Lactea\\_ALC\\_2018.pdf](https://fepale.org/site/wp-content/uploads/2021/04/Informe_Observatorio_Cadena_Lactea_ALC_2018.pdf)
12. INEC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019 [Internet]. 2020. Disponible en: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion%20de%20los%20principales%20resultados%20ESPAC%202019.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion%20de%20los%20principales%20resultados%20ESPAC%202019.pdf)
13. Telégrafo E. Sector ganadero nacional produce 5'000.000 de litros de leche al día [Internet]. El Telégrafo. 2019 [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/sector-ganadero-nacional-produccion-litros-leche>
14. Ganadería, Cambio Climático y Degradación [Internet]. Ganadería Climáticamente Inteligente. [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: <http://www.ganaderiaclimaticamenteinteligente.com/informacion.php>
15. Aguilar Zapata D. *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*. 15 de agosto de 2015;22(2):57-63.
16. Parra Chamba LF, Riera Romo C del R. Morbimortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella Pneumoniae* productoras de betalactamasas en relación a la antibioticoterapia temprana versus tardía en pacientes de la UCI Hospital Eugenio Espejo, periodo Septiembre 2014-Septiembre 2015. 2016 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/12368>
17. Osorio M del CG, Medellín AM, Romero SP, Plata RB, Quiroz AV. Resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales y caracterización preliminar de los plásmidos involucrados. *Cienc -Sum Rev Científica Multidiscip Prospect*. 2008;15(1):83-90.
18. ESPAE Graduate School of Management. Orientación estratégica para la toma de decisiones – Industria de Ganadería de Carne. 2016;35.

19. Garzón Guzmán AJ, Suquitana Calderón M del C. Análisis de los sistemas productivos bovinos del cantón Cuenca. 2016 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24077/1/tesis%20biblio.pdf>
20. Acuña Rubio JP. Diseño e implementación de un biodigestor para el tratamiento de excretas de ganado bovino CADET-Tumbaco 2015. 2015 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6441/3/T-UC-0004-18.pdf>
21. ¿Qué sistema de tratamiento del estiércol de vaca es más eficaz para eliminar las bacterias resistentes que contiene? [Internet]. PortalVeterinaria. 2016 [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/actualidad/12684/que-sistema-de-tratamiento-del-estiercol-de-vaca-es-mas-eficaz-para-eliminar-las-bacterias-resistentes-que-contiene.html>
22. Europa Press. El estiércol de vaca ¿fuente de resistencia a los antibióticos? [Internet]. Revista Médica de la Junta de Beneficencia de Guayaquil. 2014 [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://revistamedica.org.ec/noticias/6704-el-estiercol-de-vaca-ifuente-de-resistencia-a-los-antibioticos>
23. Smith PA. Estiércol y resistencia a los antibióticos [Internet]. Investigación y Ciencia. 2015 [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/neurociencia-de-la-meditacin-618/estiercol-y-resistencia-a-los-antibioticos-12716>
24. Rodríguez C. Residuos Ganaderos [Internet]. Sitio Argentino de Producción Animal. 2002. Disponible en: [https://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/05-residuos\\_ganaderos.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/05-residuos_ganaderos.pdf)
25. 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*. junio de 2012;46(4):359-70.

26. Villafuerte López MI, Razo Achig ER. Diseño, construcción y pruebas de un biodigestor experimental para fines didácticos. marzo de 2007 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/306/1/CD-0712.pdf>
27. Erazo Loor JA. Biodigestores: estudio de caso de la hacienda San Francisco y perspectivas para el sector rural ecuatoriano. Pontif Univ Católica Ecuad [Internet]. diciembre de 2011 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4896/Tesis%20Biodigestores.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
28. Martí Herrero J, Andrade De Santiago E, Hidalgo Medina E, Parra Barrionuevo G. Introducción de Biodigestores en Sistemas Agropecuarios en el Ecuador [Internet]. 2015. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/336923423\\_Introduccion\\_de\\_Biodigestores\\_en\\_Sistemas\\_Agropecuarios\\_en\\_el\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/336923423_Introduccion_de_Biodigestores_en_Sistemas_Agropecuarios_en_el_Ecuador)
29. Corrales L, Romero DMA, Macías JAB, Vargas AMC. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. NOVA [Internet]. 30 de diciembre de 2015 [citado 14 de julio de 2021];13(24). Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/flip/index.php?pdf=https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/download/309/566>
30. Taipicaña Proaño DM. Obtención de biol a partir de desechos orgánicos generados por el ganado bovino del Camal Municipal del Cantón Latacunga. diciembre de 2015 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4869/1/236T0171.pdf>
31. FAO. Manual de Biogás [Internet]. Chile; 2011. 119 p. Disponible en: <https://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf>
32. Minaya DC. Homebiogas transforma sus residuos en gas limpio para cocinar [Internet]. Cinco Días. 2019 [citado 9 de diciembre de 2021]. Disponible en: [https://cincodias.elpais.com/cincodias/2019/01/30/companias/1548849026\\_594957.html](https://cincodias.elpais.com/cincodias/2019/01/30/companias/1548849026_594957.html)

33. HomeBiogas 2 [Internet]. HomeBiogas. [citado 9 de diciembre de 2021]. Disponible en: [https://www.homebiogas.com/wp-content/uploads/2021/03/HB2GF\\_0321\\_print\\_v2.pdf](https://www.homebiogas.com/wp-content/uploads/2021/03/HB2GF_0321_print_v2.pdf)
34. Manual de Biol [Internet]. Sistema Biobolsa. 2011 [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: [https://sswm.info/sites/default/files/reference\\_attachments/SISTEMA%20BIOBOLSA%20s.f.%20Manual%20del%20BIOL.pdf](https://sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/SISTEMA%20BIOBOLSA%20s.f.%20Manual%20del%20BIOL.pdf)
35. ¿Qué es el Biol? [Internet]. [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: [http://universoporcino.com/articulos/creando\\_conciencia\\_04-10-2019\\_que\\_es\\_el\\_biol.html](http://universoporcino.com/articulos/creando_conciencia_04-10-2019_que_es_el_biol.html)
36. ¿Cómo funciona un biodigestor? [Internet]. Proyecto FSE. 2018 [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <http://www.proyectofse.mx/2018/08/06/como-funciona-un-biodigestor/>
37. Martí Herrero J, Cuji P, Ramírez V, Rodríguez L, López Domínguez D, Cipriano J. Hacia un sector de biodigestores sostenible en Ecuador: Insumos para un componente de biodigestores de PNABE [Internet]. 2019. Disponible en: [https://www.ctc-n.org/system/files/dossier/3b/r4.1-20191210\\_programa\\_nacional\\_de\\_biodigestores\\_en\\_ecuador-ctcn.pdf](https://www.ctc-n.org/system/files/dossier/3b/r4.1-20191210_programa_nacional_de_biodigestores_en_ecuador-ctcn.pdf)
38. AGENEX. Los residuos ganaderos [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.agenex.net/images/stories/deptos/los-residuos-ganaderos.pdf>
39. IDEA. Biomasa: Digestores anaerobios [Internet]. Madrid, España: BESEL, S.A.; 2007 [citado 14 de julio de 2021]. 48 p. Disponible en: [https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos\\_10737\\_Biomasa\\_Digestores\\_Anaerobios\\_A2007\\_0d62926d.pdf](https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10737_Biomasa_Digestores_Anaerobios_A2007_0d62926d.pdf)
40. Avellaneda Mariscal JM, Pecho Galarza E. Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el Centro Médico Naval de enero a diciembre del 2000. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2002 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: [https://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Salud/Avellaneda\\_M\\_J/Generalidades.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Salud/Avellaneda_M_J/Generalidades.pdf)

41. Sánchez-B P, Muñoz-M R, Gutiérrez-M NP. Resistencia bacteriana a los antibióticos: Spei Domus [Internet]. 2012 [citado 16 de diciembre de 2021];8(17). Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/94/95>
42. Calderón Rojas GC, Aguilar Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Médica Costa Rica Centroamérica*. 15 de enero de 2017;73(621):757-63.
43. Usoz EO. Caracterización de enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas en muestras alimentarias, ambientales y clínicas [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Navarra; 2015 [citado 16 de diciembre de 2021]. Disponible en: [https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/58506/1/Tesis\\_Ojer15.pdf](https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/58506/1/Tesis_Ojer15.pdf)
44. García M, C M. Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: Resistencia. *Sanid Mil*. diciembre de 2013;69(4):244-8.
45. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido [Internet]. SEIMC; Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
46. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop*. diciembre de 2017;69(3):1-17.
47. Romero Borja EW. Caracterización de la resistencia antimicrobiana en Escherichia coli productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aislada de aguas residuales descargadas en el río Chimbo del cantón San Miguel-provincia Bolívar-Ecuador. 2020 [citado 16 de diciembre de 2021]; Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22406/1/T-UCE-0016-CBI-070.pdf>
48. Zurita J, Yáñez F, Sevillano G, Ortega-Paredes D, Paz y Miño A. Ready-to-eat street food: a potential source for dissemination of multidrug-resistant Escherichia coli epidemic clones in Quito, Ecuador. *Lett Appl Microbiol*. 2020;70(3):203-9.

49. Ortega-Paredes D, Haro M, Leoro-Garzón P, Barba P, Loaiza K, Mora F, et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist*. 1 de septiembre de 2019;18:263-8.
50. Manyi-Loh CE, Mamphweli SN, Meyer EL, Makaka G, Simon M, Okoh AI. An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure. *Int J Environ Res Public Health*. septiembre de 2016;13(9):843.
51. Cuasapaz GM, Garzón PL, Borja ER, Cevallos F. BIODIGESTORES EN UNIDADES PRODUCTIVAS AGROPECUARIAS (UPAs): UN PROCESO PARA COMBATIR LA RAM, PRODUCIR ENERGÍA RENOVABLE Y FERTILIZANTE DE ALTA CALIDAD. PROYECTO PILOTO INVENTAGRI. *Ecuad ES Calid - Rev Científica Ecuat* [Internet]. 25 de abril de 2020 [citado 23 de febrero de 2022];7(1). Disponible en: <https://revistaecuadrescoalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadrescoalidad/index.php/revista/article/view/89>
52. Heras-Sierra T, Enríquez-Verdugo I, Gaxiola-Camacho S, Romo-Rubio J, Anne-Marie P, Barajas-Cruz R, et al. Comportamiento de *Escherichia coli* en heces de vacas adicionadas con taninos hidrolizables. *Abanico Vet*. diciembre de 2016;6(3):47-54.
53. Fox JT, Renter DG, Sanderson MW, Thomson DU, Lechtenberg KF, Nagaraja TG. Evaluation of Culture Methods To Identify Bovine Feces with High Concentrations of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. agosto de 2007 [citado 8 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.00554-07>
54. Hilbert J. Manual para la producción de biogas [Internet]. Argentina; [citado 28 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/manual-para-la-produccion-de-biogas>
55. Amani T, Nosrati M, Sreekrishnan TR. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - A review. *Environ Rev*. 1 de febrero de 2010;18:255-78.

56. Morán Parrales RG. Investigación de la microbiología en lodos anaerobios provenientes de un biodigestor de alta tasa de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas tipo Tratamiento Primario Químicamente Mejorado (CEPT). 10 de septiembre de 2019 [citado 1 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/13826>
57. Manyi-Loh CE, Mamphweli SN, Meyer EL, Okoh AI, Makaka G, Simon M. Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. *Int J Environ Res Public Health*. septiembre de 2013;10(9):4390-417.
58. Ahlberg-Eliasson K, Westerholm M, Isaksson S, Schnürer A. Anaerobic Digestion of Animal Manure and Influence of Organic Loading Rate and Temperature on Process Performance, Microbiology, and Methane Emission From Digestates. *Front Energy Res [Internet]*. 2021 [citado 8 de marzo de 2022];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2021.740314>
59. Parra Huertas RA. Digestión anaeróbica: mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Prod Limpia*. julio de 2015;10(2):142-59.
60. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Alonso MP, Maas H, et al. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol*. febrero de 1996;12(1):13-9.
61. Haile AF, Kebede D, Wubshet AK. Prevalence and antibiogram of *Escherichia coli* O157 isolated from bovine in Jimma, Ethiopia: abattoirbased survey. *Ethiop Vet J*. 11 de septiembre de 2017;21(2):109-20.
62. Vannakovidha C, Lampang KN, Chuammitri P, Punyapornwithaya V, Kreausukon K, Mekrirat R. Comparative occurrence and antibiogram of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among post-weaned calves and lactating cows from smallholder dairy farms in a parallel animal husbandry area. *Vet World*. mayo de 2021;14(5):1311-8.

63. Lista de los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria [Internet]. OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal. [citado 10 de marzo de 2022]. Disponible en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/E\\_OIE\\_Lista\\_antimicrobianos\\_Mayo2018.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Mayo2018.pdf)
64. Jaramillo Benítez AI. Uso de antibióticos en la industria ganadera y los riesgos que presenta para la Salud Humana. 9 de enero de 2019 [citado 23 de febrero de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/16030>
65. *E. coli*: ¿bacteria amiga o enemiga? [Internet]. BBC News Mundo. 2011 [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: [https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/06/110604\\_ecoli\\_buena\\_o\\_mala\\_sao](https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/06/110604_ecoli_buena_o_mala_sao)
66. Khare A, Tavazoie S. Multifactorial Competition and Resistance in a Two-Species Bacterial System. PLOS Genet. 8 de diciembre de 2015;11(12):e1005715.
67. Buxton A, Fraser G. Escherichia Coli, In: Animal Microbiology. [Internet]. Vol. 1. Oxford, London: Blackwell Scientific Publication; 1977. 94-102 p. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/232660045\\_Antibiogram\\_and\\_plasmid\\_profile\\_of\\_Ecoli\\_isolates](https://www.researchgate.net/publication/232660045_Antibiogram_and_plasmid_profile_of_Ecoli_isolates)
68. Di Conza JA, Power P, Gutkind GO. Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas. diciembre de 2013 [citado 3 de marzo de 2022]; Disponible en: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/1729/RFR\\_2013\\_57.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Los%20integrones%20no%20son%20elementos,entre%20especies%20del%20material%20gen%C3%A9tico](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/1729/RFR_2013_57.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Los%20integrones%20no%20son%20elementos,entre%20especies%20del%20material%20gen%C3%A9tico)
69. Pérez Heras Í. Infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad en niños menores de 14 años producidas por *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el periodo de 2015 a 2018: prevalencia, evolución, factores de riesgo. 2020 [citado 3 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/26803/TESIS%20P%C3%A9rez%20Heras.pdf?sequence=1>

70. Vignoli R. *Escherichia coli* patógeno extra intestinal (ExPEC): atributos de virulencia, epidemiología molecular y resistencia a antibióticos. 2017 [citado 3 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/10229>
71. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 1 de enero de 2008;14:33-41.
72. Palmeira JD, Ferreira HMN. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. *Heliyon* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 2 de marzo de 2022];6(1). Disponible en: [https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(20\)30051-7](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(20)30051-7)
73. Cormier A, Zhang PLC, Chalmers G, Weese JS, Deckert A, Mulvey M, et al. Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet Microbiol*. 1 de abril de 2019;231:71-5.
74. Merida-Vieyra J, De Colsa A, Calderon Castañeda Y, Arzate Barbosa P, Aquino Andrade A. First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. *PLoS ONE*. 19 de diciembre de 2016;11(12):e0168608.
75. Shibasaki M, Komatsu M, Sueyoshi N, Maeda M, Uchida T, Yonezawa H, et al. Community spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria detected in social insurance hospitals throughout Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. junio de 2016;22(6):395-9.
76. Garrido A, Seral C, Gude MJ, Casado C, González-Domínguez M, Sáenz Y, et al. Characterization of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain. *Microb Drug Resist Larchmt N*. agosto de 2014;20(4):301-4.
77. Nahar A, Awasthi S, Hatanaka N, OKUNO K, hoai phuong H, Hassan J, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *J Vet Med Sci*. 12 de febrero de 2018;80.

78. Palmeira JD, Haenni M, Metayer V, Madec J-Y, Ferreira HMN. Epidemic spread of IncII/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) blaCTX-M-8 gene in Escherichia coli of Brazilian cattle. *Vet Microbiol.* 1 de abril de 2020;243:108629.
79. Ferreira JC, Filho RACP, Andrade LN, Berchieri A, Darini ALC. Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse Escherichia coli isolates from healthy broiler chickens. *Clin Microbiol Infect.* 1 de octubre de 2014;20(10):O623-6.
80. Sartori L. Caracterização molecular de Escherichia coli produtora de  $\hat{I}^2$ -lactamases de amplo espectro em bovinocultura leiteira [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2018 [citado 2 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-10102018-153547/>
81. Pérez Mesa HJ. Detección del gen CTX-M 2 en cepas de Escherichia Coli productoras de Beta-Lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas del Hospital Vicente Corral Moscoso; Cuenca-Ecuador. 2015 [citado 2 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58079>
82. Casella T [UNESP. Detecção e identificação de genes de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em Salmonella spp. e Escherichia coli isoladas de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano. *Aleph.* 18 de junio de 2012;118 f. : il.
83. Enfoques: Las repercusiones del ganado en el medio ambiente [Internet]. [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm>
84. One Health (una sola salud) o cómo lograr a la vez una salud óptima para las personas, los animales y nuestro planeta - Blog [Internet]. ISGlobal. [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.isglobal.org/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/one-health-una-sola-salud-o-como-lograr-a-la-vez-una-salud-optima-para-las-personas-los-animales-y-nuestro-planeta/90586/0>

## **15. ANEXOS**

### **Anexo N° 1: Aval de traducción**

## Anexo N° 2

Hoja De Vida**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:** Ecuatoriano                      **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:** edie.molina7278@utc.edu.ec **Cédula de Identidad:** 1722547278

---

**Tipo de sangre:** ORH +                      **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

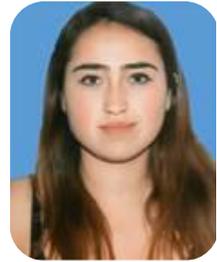
Cuarto nivel	Universidad politécnica de Valencia  Universidad Autónoma de Barcelona	Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción	7241137679	España
--------------	--	--	------------	--------

**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 Vida1.- DATOS PERSONALES:

**Nombre:** Mancheno Saavedra Rossana Carolina

---

Apellido Paterno                      Apellido Materno                      Nombres

**Lugar y fecha de Nacimiento:** Quito, 22 de Agosto de 1998

---

**Edad:** 23 años                      **Género:** Femenino

---

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

---

**Dirección Domiciliaria:** Pichincha                      Mejía                      Machachi

---

Provincia                      Cantón                      Parroquia

Cantón Mejía, Nueva España y José Ignacio Albuja.

---

Dirección

**Teléfono(s):** 02 310190                      0995516011

---

Convencionales                      Celular o Móvil

**Correo electrónico:** rossana.mancheno4418@utc.edu.ec                      **Cédula de Identidad o Pasaporte:** 172682441-8

---

**Tipo de sangre:** A+                      **Estado Civil:** Soltera

---

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

---

**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.

---

**Rossana Carolina Mancheno Saavedra.**

Anexo N° 4

**Hoja De Vida**



**1.- DATOS PERSONALES:**

<b>Nombre:</b>	Ponce	Haro	Dilan Rafael
	<small>Apellido Paterno</small>	<small>Apellido Materno</small>	<small>Nombres</small>
<b>Lugar y fecha de Nacimiento:</b>	Santo Domingo, 31 de Mayo de 1998		
<b>Edad:</b>	23 años	<b>Género:</b>	Masculino
<b>Nacionalidad:</b>	Ecuatoriana	<b>Tiempo de Residencia en el Ecuador (Extranjeros):</b>	
<b>Dirección Domiciliaria:</b>	Sto. Dgo de los Tsáchilas	Santo Domingo	Luz de América
	<small>Provincia</small>	<small>Cantón</small>	<small>Parroquia</small>
	Cantón Sto. Dgo, Vía a Quevedo Km 18 margen derecho.		
	<small>Dirección</small>		
<b>Teléfono(s):</b>	Ninguno	0996423345	
	<small>Convencionales</small>	<small>Celular o Móvil</small>	
<b>Correo electrónico:</b>	dilan.ponce5048@utc.edu.ec		<b>Cédula de Identidad o Pasaporte:</b> 235039504-8
<b>Tipo de sangre:</b>	ORH+	<b>Estado Civil:</b> Soltero	

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

**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.

**Dilan Rafael Ponce Haro.**

## Anexo N° 5

Tablas de conteo de colonias

**Tabla N° 10:** Datos del conteo de unidades formadoras de colonias TBX por cada mililitro.

<i>Muestra</i>	<b>Dilución</b>	<b>TBX</b>			<b>UFC <i>E. coli</i> /ml</b>
		<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	
1	10 <sup>-5</sup>	29	24	27	13333,3
2	1	50000	50000	50000	2500,0
3	1	50000	50000	50000	2500,0

**Tabla N° 11:** Datos del conteo de unidades formadoras de colonias TBX + Cefotaxima (CTX) por cada mililitro.

<i>Muestra</i>	<b>Dilución</b>	<b>TBX+CTX</b>			<b>UFC <i>E. coli</i> /ml</b>
		<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	
1	10 <sup>-5</sup>	0	0	17	2833,3
2	1	18	29	0	0,78
3	1	22	11	12	0,75

## Anexo N° 6

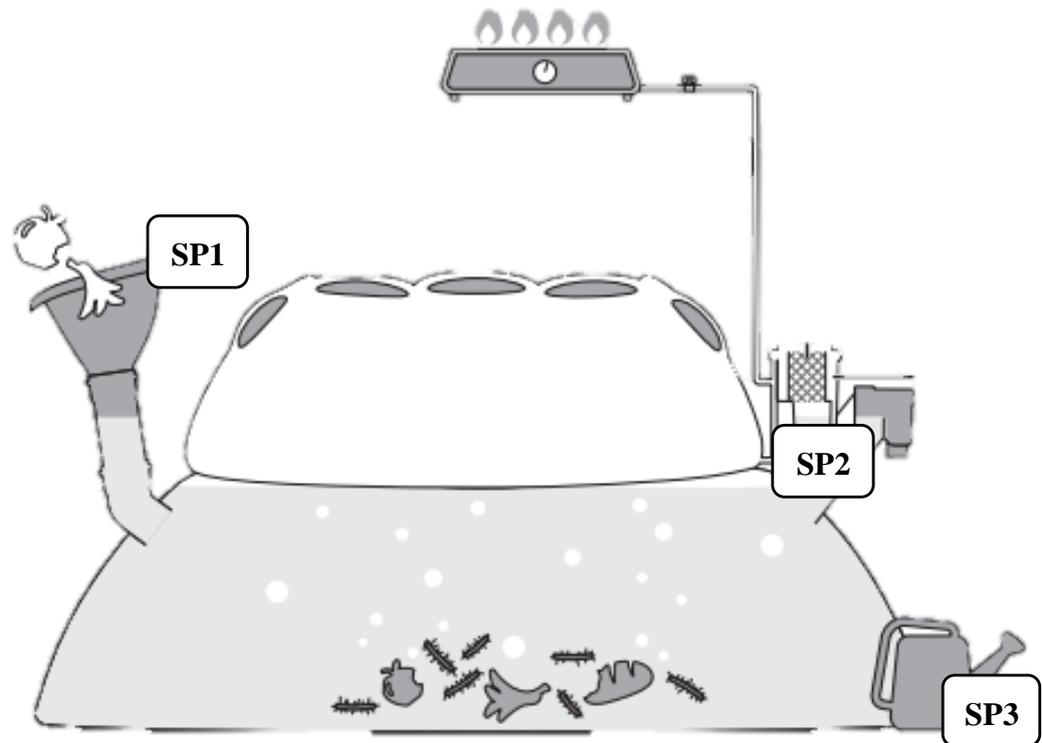
### Imagen N° 4

*Biodigestor utilizado para el muestreo.*



**Imagen N° 5.**

*Puntos de muestreo del biodigestor.*



Fuente: Home-Biogás, 2021.

**Imagen N° 6.**

*Recolección de muestras SP1.*



**Imagen N° 7.**

*Recolección de muestras SP2.*

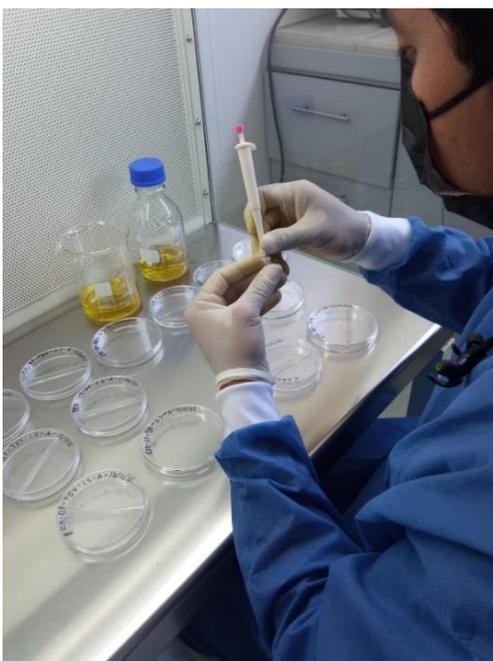
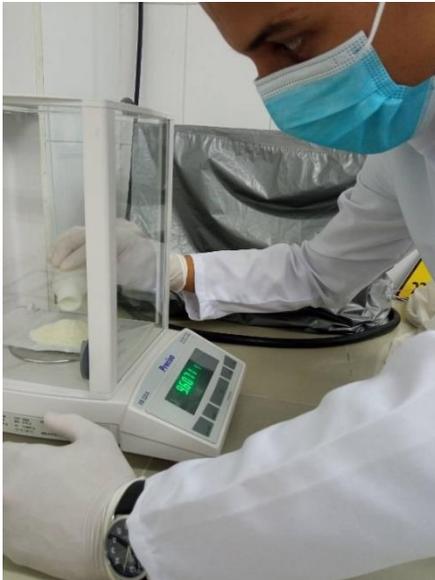


**Imagen N° 8.**

*Muestras obtenidas.*

**Imagen N° 9.**

*Preparación de medios de cultivos con y sin antibiótico*



**Imagen N° 10**

*Diluciones de muestras.*

**Imagen N° 11.**

*Filtración de muestras.*

**Imagen N° 12**

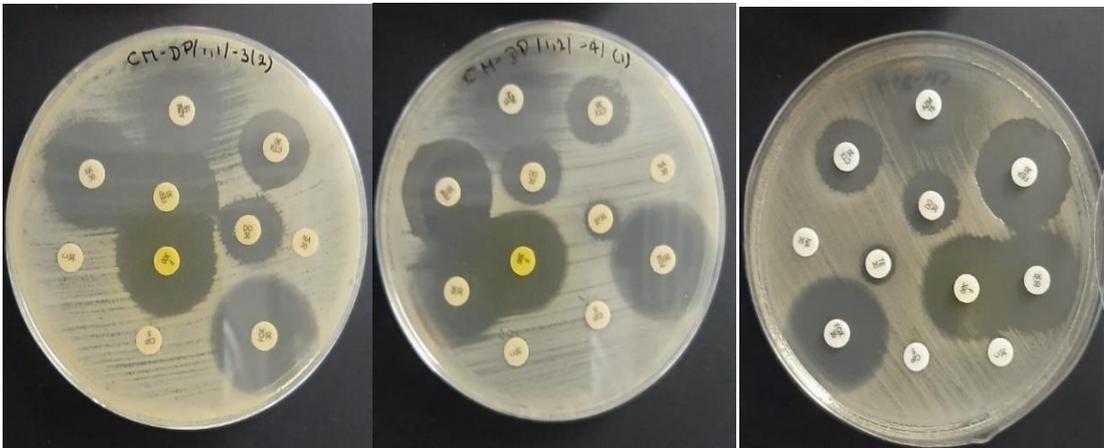
*Replique de colonias en medio de cultivo.*





**Imagen N° 13**

*Resultados del antibiograma.*



**Imagen N° 14**

*Preparación y etiquetado de tubos eppendorf.*



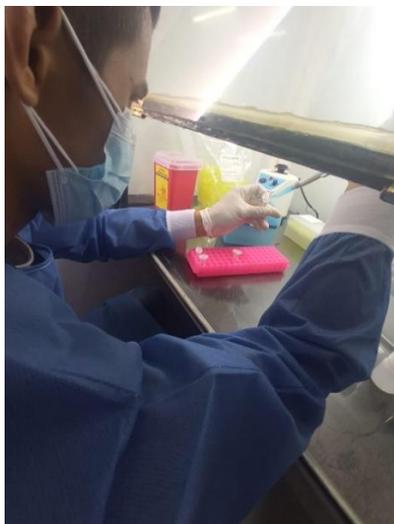
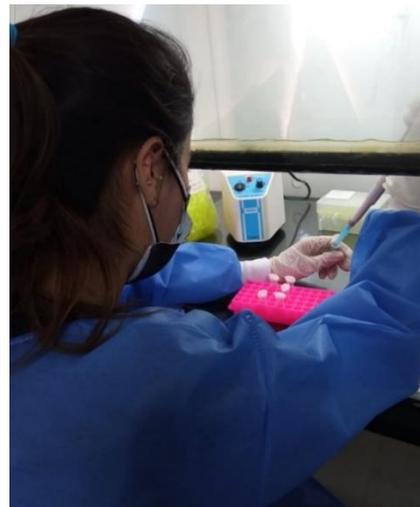
### Imagen N° 15

*Proceso de extracción de ADN.*



### Imagen N°16

*Técnica de m-PCR.*





### Imagen N°17

*Preparación de muestras para electroforesis.*

