



Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16). Edición continua

INTERACCIÓN DE *E. Coli* RESISTENTE A LOS ANTIMICROBIANOS DE LOS RESIDUOS DE UNA GRANJA LECHERA DURANTE LOS PROCESOS DE BIODIGESTIÓN

Rossana Carolina Mancheno Saavedra¹, Dilan Rafael Ponce Haro¹, Gabriel Molina Cuasapaz^{1,2*}

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Carrera de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Cotopaxi, 050101, Ecuador.

² Research Unit, Life Science Initiative (LSI), Quito, 170102, Ecuador.

*Dirección para correspondencia: edie.molina7278@utc.edu.ec

Fecha de Recepción: 25-01-2022

Fecha de Aceptación: 18-03-2022

Fecha de Publicación: 31-07-2022

Resumen

La mayoría de las producciones lecheras en el Ecuador, desechan sin tratamiento los residuos orgánicos generados, causando contaminación ambiental y diseminación de agentes patógenos, entre ellos bacterias resistentes a antimicrobianos como la *E. coli*. La cual es el organismo modelo de enterobacterias, además causa la mayor parte de infecciones adquiridas en la comunidad, especialmente infecciones del tracto urinario. Una alternativa para limitar esta contaminación es la biodigestión, que permite obtener biol, el cual puede ser empleado como fertilizante, a partir de residuos orgánicos. Sin embargo, la interacción de *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación (C3G), en el proceso es incierta. Por lo tanto, se cuantificó la carga bacteriana, se testeó la resistencia a antimicrobianos y se genotipificó las bacterias *E. coli* C3G al inicio (SP1), durante (SP2) y después (SP3) del proceso de biodigestión. Los resultados indican que el proceso de biodigestión reduce alrededor del 99% de *E. coli* C3G, sin embargo, el 1% de las *E. coli* C3G que resistieron el proceso de biodigestión presentan también multiresistencia al 50% de antimicrobianos testeados. Además, el gen de resistencia a C3G de mayor prevalencia fue el blaCTX-M-2. En consecuencia, a pesar que el proceso de biodigestión reduce las *E. coli* C3G de los residuos orgánicos generados en una hacienda lechera, las que resisten, son un riesgo, ya que poseen componentes genéticos que les permiten resistir a otros antimicrobianos que se también se usan humanos, comprometiendo la salud pública.

Palabras Clave: *E. coli* C3G, biodigestor, resistencia antimicrobiana, residuos lecheros.

IDs Orcid:

Carolina Mancheno Saavedra: <https://orcid.org/0000-0002-9723-9813>

Dilan Ponce Haro: <https://orcid.org/0000-0002-2365-2322>

Gabriel Molina Cuasapaz: <https://orcid.org/0000-0002-1597-5957>

Artículo científico: Interacción de *E. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

INTERACTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANT *E. coli* RESISTANT TO ANTIMICROBIAN WASTE FROM A DAIRY FARM DURING BIODIGESTION PROCESSES.

Abstract

Most dairy farms in Ecuador dispose of the organic waste generated without treatment, causing environmental contamination and dissemination of pathogens, including bacteria resistant to antimicrobials such as *E. coli*. Which is the model organism of enterobacteria, also causes most community-acquired infections, especially urinary tract infections. An alternative to limit this contamination is biodigestion, which allows to obtain biol, which can be used as fertilizer, from organic waste. However, the interaction of *E. coli* resistant to third-generation cephalosporins (C3G), in the process is uncertain. Therefore, bacterial load was quantified, antimicrobial resistance was tested, and *E. coli* C3G bacteria were genotyped at the beginning (SP1), during (SP2) and then (SP3) of the biodigestion process. The results indicate that the biodigestion process reduces about 99% of *E. coli* C3G, however, 1% of *E. coli* C3G that resisted the biodigestion process also have multi-resistance to 50% of antimicrobials tested. In addition, the most prevalent C3G resistance gene was blaCTX-M-2. Consequently, although the biodigestion process reduces *E. coli* C3G from organic waste generated on a dairy farm, those that resist are a risk, since they have genetic components that allow them to resist other antimicrobials that are also used in humans, compromising public health.

Keywords: *E. coli* BLEE, biodigester, antimicrobial resistance, dairy organic waste.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha vuelto crítica alrededor del mundo. La humanidad se encuentra a las puertas de una era denominada post-antibiótica, en la cual los antibióticos, piedra angular de la medicina moderna, han perdido su efectividad y una pequeña herida podría ser causa de gangrena, las típicas infecciones del tracto urinario (ITU) podrían convertirse con facilidad en infecciones sistémicas y las cirugías más simples no serían posibles sin un alto riesgo de fallecer por una infección oportunista (O'Neill, 2016). Es alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes que se dan por un proceso natural, obteniendo la capacidad para neutralizar y/o resistir al efecto de uno o varios antimicrobianos (Ministerio de Salud Pública, 2018). Por otro lado, la creación de antimicrobianos nuevos lleva años sin resultados significativos (Blanco et al., 1996), en la década de 1980 se introdujeron las fluoroquinolonas, posteriormente solo se han desarrollado variantes de los antimicrobianos ya existentes (Jinks, 2017). En consecuencia, la OMS en el 2017 realizó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antimicrobianos, en la que se incluye precisamente a la *E. coli* C3G dentro de la categoría de prioridad crítica (OMS, 2017). No obstante, lo catastrófico de este problema, es que el mismo se encuentra relegado en la mayor parte del Ecuador y se lo considera un problema hospitalario o de las grandes ciudades.

En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) es la entidad gubernamental que se encarga de monitorear la resistencia antimicrobiana (RAM) y hasta el año 2017, donde participaron 44 hospitales, evidenciaron que la *E. coli* alcanzó un porcentaje del 61% en relación a otros microorganismos, sumado a esto, presenta resistencia a las cefalosporinas mayores o iguales al 50% en comparación a otros antimicrobianos (MSP, 2018). A pesar de la falta de datos desde la última vigilancia, se presumen que en los años siguientes esta tasa ha aumentado debido a múltiples factores, es así que, la OMS estima que en el 2050 la resistencia antimicrobiana será la principal causa de defunción a nivel global (Crespo Garay, 2018). De hecho, en el río Machángara del centro urbano de la ciudad de Quito, se encontró la presencia de *E. coli* resistente a cefotaxima en concentraciones entre 2 700 y 540 000 UFC/100 ml (Ortega-Paredes et al., 2019). De ahí que, se presume contaminación río arriba. En el transcurso de los ríos, en el Ecuador, es común que se encuentren explotaciones agropecuarias, quienes en su mayoría desechan los desperdicios orgánicos directamente en los cuerpos de agua. Por lo tanto, se considera que una de las fuentes de diseminación de la RAM es el

Artículo científico: Interacción de *e. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

deficiente manejo de los residuos ganaderos en la producción lechera de bovinos (Molina Cuasapaz et al., 2020), provocando que estas bacterias resistentes alcancen incluso otros ambientes de manera indirecta (Calvo & López, 2019). Por ejemplo, legumbres y vegetales que se rieguen con esas aguas contaminadas, y se expenden en mercados de Quito (Ortega-Paredes et al., 2018). De tal forma, que el déficit de manejo de los residuos de las explotaciones pecuarias podría generar un problema en la salud pública. Por lo tanto, se considera que los productores pecuarios son un punto clave para que la propagación de este tipo de bacterias disminuya, a partir del tratamiento de los residuos orgánicos, por ejemplo, el uso de biodigestores. Los cuales, podrían transformar dichos residuos en fertilizantes y energía en forma de gas. Sin embargo, es necesario caracterizar la interacción de las *E. coli*, como modelo de enterobacterias y la resistencia a cefalosporinas de tercera generación como modelo de resistencia antimicrobiana en lo biodigestión de residuos orgánicos de en una explotación pecuaria productora de leche de vacas.

2. METODOLOGÍA

2.1 Fase de campo

La investigación se realizó en los meses de octubre 2021 a marzo 2022 en la hacienda LYG FARM (Figura 1) ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia La Ecuatoriana, barrio Santa Clara. Ubicada geográficamente a 3050 msnm, a $0^{\circ} 17' S$ y $78^{\circ} 35' O$, la temperatura promedio presentada, en la hacienda, en esa época fue $15 \pm 5^{\circ} C$, mientras que la precipitación promedio fue 275 mm.

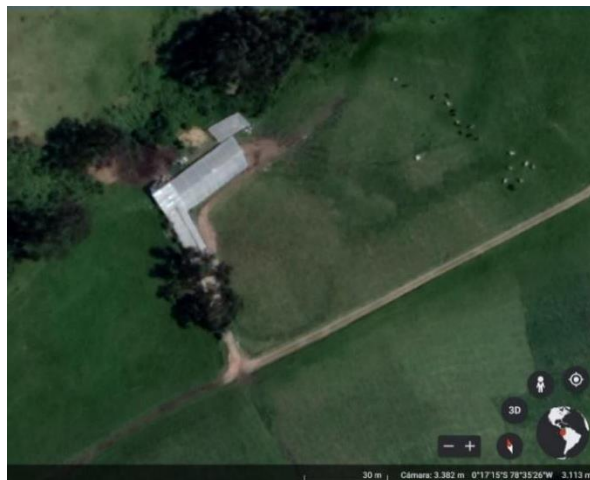


Figura 1. Ubicación geográfica por vista satelital de la hacienda LYG FARM

Las muestras fueron recolectadas en los 3 puntos del biodigestor (Figura 2) de la hacienda LYG FARM: SP1, SP2 y SP3.

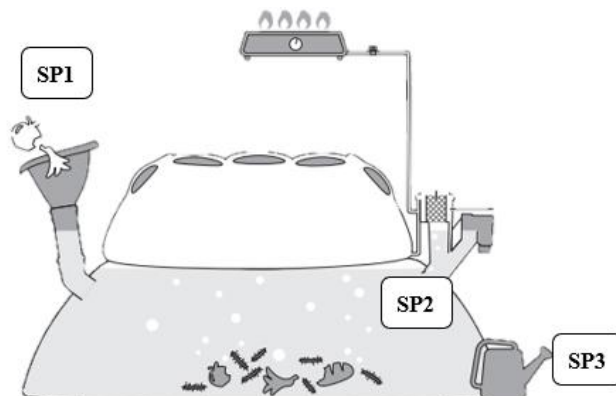


Figura 2. Puntos de muestreo del biodigestor (*Homebiogas 2.0*)

SP1 es un colector plástico donde se unen los residuos orgánicos que se producen en la sala de ordeño de la hacienda y baño del uso humano, así como, desechos de comida (excepto detergentes), presentó una consistencia semisólida; SP2, interior del biodigestor (anaerobiosis), se encuentran todos los residuos orgánicos mezclados con la población bacteriana propia del biodigestor, presentó una consistencia semisólida; y SP3, salida del biodigestor, el biol, se presentó una consistencia líquida de color amarillo. Se colectaron 100ml de cada punto en 3 repeticiones.

2.2 Fase de laboratorio

La cuantificación, se realizó mediante el cultivo en Tryptone Bile Glucoronic Agar (TBX Agar) selectivo para *E. coli*, con la adición de 5 $\mu\text{l/ml}$ de ceftriaxona (CRO) a la mitad del agar preparado. Así mismo, las muestras se diluyeron de la siguiente forma: SP1 a 10^{-5} , SP2 a 10^{-1} y SP3 a 10^{-1} considerando las características físicas de los puntos de muestreo. Una vez obtenidas las diluciones, se utilizó un filtro nanopore (Millipore Corporation Bedford, MA 01730) de 0.45 μm para filtrar las bacterias mayores a este diámetro. El filtro se colocó sobre las placas con el medio TBX y TBX+CRO preparadas se incubó durante 18 horas a una temperatura de 37 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, después 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.

Artículo científico: Interacción de *e. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

La resistencia antimicrobiana se testeó seleccionando 10 colonias con la morfología y el color característico de *E. coli*. Después, 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. Posteriormente, se sembró homogéneamente esta suspensión en cajas petri con agar Mueller Hinton. Se dispuso sobre el agar, discos de inhibición de las siguientes familias de antibióticos: Aminoglucósidos (Amikacina, Gentamicina, Netilmicina), Quinolonas (Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Norfloxacino), Beta-lactámicos (Aztreonam, Cefoxitina, Cefepima, Cefotaxima, Ceftazidima, Imipenem), Tetraciclinas (Doxiciclina, Tetraciclina), Fosfonatos (Fosfomicina), Macrólidos (Azitromicina), Anfenicoles (Cloranfenicol), Nitrofuranos (Nitrofurantoína), Antagonistas del folato (Sulfametoxazol/trimetoprima) y Glicilciclinas (Tigeciclinas). Se incubó a 37° C por 24 horas y finalmente se midió la susceptibilidad de los antibióticos de acuerdo con el diámetro del halo generado alrededor de las colonias, considerando los valores propuestos por la CLSI M100 30th Edition. Journal of Services Marketing (Vol. 30th). (Anexo1)

Posteriormente, 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). 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 y 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. Después, los 10 tubos eppendorf con caldo TSB se llevaron a incubar durante 24 h, para posteriormente agregar 500 µl de glicerol para su almacenamiento como ADN de respaldo. 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 extrajo 150 µl del sobrenadante (ADN), los cuales fueron depositados en nuevos tubos eppendorf previamente identificados de acuerdo con las colonias tomadas.

Finalmente, se genotipificó las colonias mediante una PCR múltiple, empleando Master Mix Hot Start Taq (GOLDBIO) 12.5 µl (2x), iniciador derecho 1 µl (10mM), iniciador izquierdo 1 µl (10mM) (Eurofins Genomics 8785689), ADN 3.5 µl (~200 nmol) y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µl. Los protocolos programados en el termociclador correspondientes a cada familia génica *bla*_{CTX-M} se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de identificación de la familia génica *bla*_{CTX-M} en la PCR

Gen <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
SEGMENTADO								
Desnaturalización	94°C	30s	94°C	30s	94°C	30s	94°C	30s
Alineación	60°C	30s	55°C	30s	55°C	30s	55°C	30s
Extensión	72°C	30s	72°C	30s	72°C	30s	72°C	30s
Extensión Final	72°C	7min	72°C	7min	72°C	7min	72°C	7min
CICLOS	35		35		35		35	
Iniciador derecho	CCCATGGTTAAATCACTGC		TGGTGACAAAGAGAGTGCAACG		ATGACTCAGAGCATTTCG		TGAGACATCGCGTTAAG	
Iniciador izquierdo	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG		TCACAGCCCTTCGGCGAT		TGGGTTACGATTTTCGCCGC		TAACCGTCGGTGACGATTTT	

Para la interpretación del resultado de la PCR, se preparó el gel de agarosa con 80 ml de TBE 5X, 1.5 g de Agarosa y Sybr gold (1 µl), el cual se colocó en la cámara de solidificación con un peine que enmarca los espacios donde posteriormente introducimos el resultado PCR (5 µl). Una vez completado este proceso se colocó el gel en la cámara de electroforesis a 150 voltios, 400 mAh durante 45 minutos y transcurrido dicho tiempo se llevó el gel al transiluminador, para observar las bandas de acuerdo con el peso molecular del gen.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cuantificación.

La interacción de las bacterias resistentes a *E. coli* C3G de la hacienda LYG FARM en los procesos de biodigestión se muestran a continuación. Con respecto a la cuantificación, en el primer punto de muestreo (SP1), se encontró alrededor de 2833.33 UFC/ml de *E. coli* C3G, volumen superior al reportado por (Molina Cuasapaz et al., 2020) en una investigación similar, e inferiores a las reportadas por Resende et al., 2014. En el mismo punto (SP1) se encontró alrededor de 13333.3 UFC/ml de *E. coli*, cantidad mínima con respecto al rango superior (2300000 UFC/ml de *E. coli*) reportado en heces de bovinos (Fox et al., 2007) considerando que el porcentaje de *E. coli* en animales sanos oscila entre el 7 y 30 % (Blanco et al., 1996).

En cambio, dentro del biodigestor en el segundo punto de muestreo (SP2), se evidenció un descenso de la cantidad de *E. coli* C3G a 0.78 UFC/ml, así también bajó la cantidad total de *E.*

Artículo científico: Interacción de *e. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

coli a 2500 UFC/ml (Figura 1), lo cual podría indicar que, en el proceso de digestión anaerobia, existen varios factores que disminuyen la cantidad de *E. coli* C3G y *E. coli*, uno de ellos podría ser la temperatura ya que entre los 15 °C a 25 °C se reduce la *E. coli* (Ahlberg-Eliasson et al., 2021; FAO, 2011; Hilbert, s. f.; Manyi-Loh et al., 2016), el biodigestor utilizado funciona a una temperatura mayor a 20 °C (*HomeBiogas 2.0*, s. f.).

Conjuntamente, otro factor que podría influir en la reducción de *E. coli* C3G 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; Morán Parrales, 2019; Ortiz Cabrera, 2015), se ha demostrado que en la digestión anaerobia se puede encontrar varios grupos de bacterias con características sintróficas (*Clostridium*, *Lactobacillus*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei* y *Smithella sp.*) (Ahlberg-Eliasson et al., 2021; Corrales et al., 2015; Manyi-Loh et al., 2013) responsables de las etapas acetogénicas y metanogénicas dentro del biodigestor (Parra Huertas, 2015), en donde se degradan sustratos debido a que actúan sobre los productos resultantes de las etapas anteriores (Amani et al., 2010). 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% en coliformes totales como *Salmonella spp.* y *E. coli* (Hassaneen, 2021; Morán Parrales, 2019).

En el SP3 se contabilizó una disminución significativa de *E. coli* C3G a 0.75 UFC/ml, resultados similares a los reportados (Molina Cuasapaz et al., 2020), es evidente que el biodigestor utilizado, en las condiciones que se realizó en la investigación, reduce la cantidad de *E. coli* C3G en el tratamiento de los residuos orgánicos de la hacienda. Así mismo, en este punto, se reporta una cantidad de 2500 UFC/ml de *E. coli*, que representa el 18% del total de *E. coli* que ingreso en el SP1, y aunque forme parte de la flora bacteriana normal, también es un indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos (Heras-Sierra et al., 2016). En síntesis, se redujo en un 99.97% la *E. coli* C3G, entre el SP1 y el SP3 (Tabla 3), resultado similar al encontrado en Brasil a partir estiércol bovino donde la cuantificación se redujo en un 99.96% (Resende et al., 2014).

3.2 Resistencia antimicrobiana

Por otro lado, con respecto a la multiresistencia de las *E. coli* C3G aisladas, presentaron resistencia a los 15 de los 21 antimicrobianos testeados, y a 8 de las 10 familias de antimicrobianos (Figura 3). Entre los antimicrobianos con mayor presencia de resistencia, se encuentra la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico 68.75%, la tetraciclina 62.5%, el cloranfenicol y la levofloxacina 50%, la norfloxacina 43.75%, el sulfametoxazol-trimetoprima 31.25%, la fosfomicina 25%. De este grupo de antimicrobianos la ciprofloxacina, la tetraciclina, el ácido nalidíxico, la levofloxacina, la fosfomicina y el sulfametoxazol-trimetropin se han especificado para uso veterinario en múltiples especies (Organización Mundial de Sanidad ANimal, 2018), a pesar de que no se han desarrollado nuevos antimicrobianos, si se han realizado mejoras a los ya existentes, determinándolos como antimicrobianos de tercera y cuarta generación los cuales son de uso exclusivo intrahospitalario como son el imipenem y la tigeciclina (Martín-Aragón, 2011) utilizados en esta investigación sin mostrar resistencia alguna, por otro lado, el cloranfenicol y la levofloxacina también se catalogan para uso intrahospitalario (J. Calvo & Martínez-Martínez, 2009), mientras que la ciprofloxacina, el ácido nalidíxico, la tetraciclina, norfloxacina, sulfametoxazol-trimetropin y la fosfomicina se pueden encontrar en farmacias bajo prescripción médica.

En detalle, en el SP1, se presentó resistencia a los 7 de los 21. Mientras que el SP3, se presentó resistencia en 14 de los 21 antimicrobianos probados. 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.

La *E. coli* tiene una alta habilidad para sobrevivir en ambientes adversos, debido a que toma partes de código genético de otras fuentes para replicarse rápidamente (Mundasad, 2011). Por ejemplo, en un estudio de antagonismo entre *P. aeruginosa* y *E. coli*, la *E. coli*, tras estar en

Artículo científico: Interacción de *e. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

exposición contra las toxinas de *P. aeruginosa*, mostraron una evolución molecular paralela y una convergencia adaptativa en cuanto a genes (Khare & Tavazoie, 2015). Considerando esto, se podría relacionar porque aumento la resistencia en el SP3 de algunos antimicrobianos que no mostraron resistencia en el SP1, ya que la exposición a otros microorganismos en dichas condiciones físicas del biodigestor podría hacer que la *E. coli* modifique sus genes para garantizar su supervivencia durante todo el proceso de biodigestión, obteniendo nuevos códigos genéticos para mostrar resistencia a otros antimicrobianos.

	AZM	CTX	NA	FOX	CIP	C	AK	FEP	DO	TE	F	TGC	CN	NET	ATM	NOR	CAZ	IPM	LEV	FF	SXT
SP1	S	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	S	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	S	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S
	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S
SP2	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	I	S	S	R	S
	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	R
	S	R	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S
	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	R
	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	I	S
	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R
SP3	S	R	R	S	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R
	R	R	I	R	S	R	S	S	S	R	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	R	S

Nota. Las letras (S) indican sensibilidad, mientras que las (R) representa resistencia y las (I) intermedio. AK, amikacina; ATM, aztreonam; AZM, azitromicina; C, cloranfenicol; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacina; CTX, cefotaxima; DO, doxiciclina; F, nitrofurantoína; FEP, cefepime; FF, fosfomicina; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; LEV, levofloxacina; NAX, ácido nalidíxico; NET, netilmicina; NOR, norfloxacina; SXT, trimetoprim / sulfametoxazol; TE, tetraciclina; TGC, tigeciclina

Figura 3. Perfil de multirresistencia de las *E. Coli* resistentes a cefotaxima aisladas del proceso de biodigestión.

Debido a que, 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 (Buxton & Fraser, 1977). 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 (Di Conza et al., 2013). 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 (Vignoli, 2017).

3.3 Genotipificación

Así mismo, los resultados muestran que el 43.75% de las *E. coli* resistentes a C3G contienen genes *bla*_{CTX-M}, los cuales son dominantes sobre otros tipos de genes de resistencia. Incluso existen algunas variantes que pueden ser dominantes sobre otras dentro de la misma familia *bla*_{CTX-M} debido a su presencia natural en los diferentes medios. En la cuantificación, el gen *bla*_{CTX-M-1} tuvo nula presencia dentro del ensayo, pues, coincide con una investigación realizada a partir de las heces de varios animales (perros, bovinos, cerdos, pollos y caballos) en Canadá para identificar la diversidad de *E. coli* *bla*_{CTX-M} donde reportaron que el gen *bla*_{CTX-M-1} fue la variante dominante encontrada en aislamientos de pollos (91%) y caballos (100%), mientras que en bovinos solo alcanzó una presencia del 5% (Cormier et al., 2019). Por otra parte, el gen *bla*_{CTX-M-9} tampoco se presentó dentro de la cuantificación, y justamente se ha informado que en este grupo la frecuencia de presentación es hospitalaria (Merida-Vieyra et al., 2016). Por ejemplo, en una investigación realizada en España a partir de heces fecales de humanos en un hospital, este gen fue el más prevalente con un 81.54% (Garrido et al., 2014).

De este modo, puede sugerir que los elementos genéticos que llevan estas variantes 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. (Cormier et al., 2019).

El gen *bla*_{CTX-M-8}, también ha sido reportado en múltiples especies, especialmente en aves y bovinos que son destinados para la faena y el consumo para humanos (Nahar et al., 2018; Palmeira et al., 2020), 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*_{CTX-M} dentro de sus tejidos (Ferreira et al., 2014; Sartori, 2018).

De manera simultánea, se evidenció que el gen más prevalente es el *bla*_{CTX-M-2}, este se detectó en Japón como primera descripción de *E. coli* C3G en heces bovinas (Palmeira & Ferreira,

Artículo científico: Interacción de *e. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

2020), 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* C3G (Pérez Mesa, 2015). 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 (Ferreira et al., 2014; Sartori, 2018).

La *E. coli* C3G 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 (Casella, 2012).

4. CONCLUSIÓN

En conclusión, en la hacienda LYG FARM se generan *E. coli* C3G en los residuos orgánicos desecho de la producción lechera, el manejo y uso adecuado de antimicrobianos no es suficiente para detener la diseminación de estas bacterias, de hecho, 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, se pudo encontrar altos rastros de resistencia en un elevado número de antimicrobianos. 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* C3G, 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* C3G al ambiente, incluso podemos contribuir con la mitigación de algunos de los problemas ambientales más apremiantes del mundo como el calentamiento global, el cambio climático, la degradación de las tierras, la contaminación atmosférica y del agua, y la pérdida de biodiversidad además de obtener fertilizante de alta calidad libre de estas bacterias y energía renovable. Sin embargo, aunque el biodigestor es capaz de reducir la presencia de *E. coli* C3G, 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 multiresistencia de determinados antimicrobianos. Por otro lado, los genes tipo *bla*_{CTX-M} están teniendo cambios muy rápidos e impredecibles en cuanto a su variabilidad y diseminación, especialmente el gen *bla*_{CTX-M-2} 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.

5. REFERENCIAS

- Ahlberg-Eliasson, K., Westerholm, M., Isaksson, S., & Schnürer, A. (2021). Anaerobic Digestion of Animal Manure and Influence of Organic Loading Rate and Temperature on Process Performance, Microbiology, and Methane Emission From Digestates. *Frontiers in Energy Research*, 9. <https://www.frontiersin.org/journals/energy-research/articles/10.3389/fenrg.2021.740314/full>
- Amani, T., Nosrati, M., & Sreekrishnan, T. R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects—A review. *Environmental Reviews*, 18(NA). 255-278. <https://doi.org/10.1139/A10-011>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Gonzalez, E. A., Alonso, M. P., Maas, H., & Jansen, W. H. (1996). Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic Escherichia coli strains isolated in Galicia (north-western Spain). *European Journal of Epidemiology*, 12, 13-19. <https://doi.org/10.1007/BF00144422>
- Buxton, A., & Fraser, G. (1977). Escherichia Coli, In: Animal Microbiology. *Blackwell Scientific Publication*, 1.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Calvo, M. L., & López, U. P. (2019, 7 de noviembre). ¿Qué papel tiene la agricultura en la transmisión de la resistencia a antibióticos? *The Conversation*. <http://theconversation.com/que-papel-tiene-la-agricultura-en-la-transmision-de-la-resistencia-a-antibioticos-126369>
- Casella, T. (2012). Detecção e identificação de genes de β -lactamases de espectro estendido em Salmonella spp. E Escherichia coli isoladas de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano. [Tesis de posgrado, Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”]. <https://repositorio.unesp.br/items/54eae8b-8628-40f9-aa12-01278366a559>
- Cormier, A., Zhang, P.L., Chalmers, G., Weese, J.S., Deckert, A., Mulvey, M., McAllister, T., & Boerlin, P. (2019). Diversity of CTX-M-positive Escherichia coli recovered from animals in Canada. *Veterinary Microbiology*, 231, 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031>
- Corrales, L., Romero, D. M. A., Macías, J. A. B., & Vargas, A. M. C. (2015). Bacterias anaerobias: Procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(24). 55-81. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>
- Crespo, C. (2018, noviembre 16). La resistencia a los antibióticos mata a 700.000 personas cada año. *National Geographic*. <https://www.nationalgeographic.es/ciencia/2018/11/la-resistencia-a-los-antibioticos-mata-a-700000-personas-cada-ano>
- Di Conza, J. A., Poder, P., & Gutkind, G. O. (2013). Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas. *Reseñas de Revista Farmacéutica* 155(1-2), 57-69. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/1729>
- Mundasad, S. (2011, 4 de junio). E. coli: ¿bacteria amiga o enemiga?. *BBC News Mundo*. https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/06/110604_ecoli_buena_o_mala_sao
- Ministerio de Energía, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Global Environment Facility. (2011). *Manual de Biogás*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/3763f13e-2295-42c6-902a-37477a406719/content>
- Ferreira, J. C., Filho, R. A. C. P., Andrade, L. N., Berchieri, A., & Darini, A. L. C. (2014). Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse Escherichia coli isolates from healthy broiler chickens. *Clinical*

Artículo científico: Interacción de e. coli resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

Microbiology and Infection, 20(10), O623-O626.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14653969>

- Fox, J. T., Renter, D. G., Sanderson, M. W., Thomson, D. U., Lechtenberg, K. F., & Nagaraja, T. G. (2007). Evaluation of Culture Methods To Identify Bovine Feces with High Concentrations of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16).
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00554-07>
- Garrido, A., Seral, C., Gude, M. J., Casado, C., González-Domínguez, M., Sáenz, Y., & Castillo, F. J. (2014). Characterization of plasmid-mediated β -lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 20(4), 301-304.
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2013.0109>
- Hassaneen, F. (2021). *Evaluation of Bacterial Community Shifts in Enhanced-Performance Biogas Reactors*. [Tesis de posgrado, Universidad de Assiut]. Archivo digital.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29479.68001>
- Heras-Sierra, T., Enríquez-Verdugo, I., Gaxiola-Camacho, S., Romo-Rubio, J., Anne-Marie, P., Barajas-Cruz, R., Heras-Sierra, T., Enríquez-Verdugo, I., Gaxiola-Camacho, S., Romo-Rubio, J., Anne-Marie, P., & Barajas-Cruz, R. (2016). Comportamiento de *Escherichia coli* en heces de vacas adicionadas con taninos hidrolizables. *Abanico veterinario*, 6(3), 47-54. <https://doi.org/10.21929/abavet2016.63.4>
- Hilbert, J. (s. f.). *Manual para la producción de biogas*. Recuperado 28 de febrero de 2022, de <https://inta.gov.ar/documentos/manual-para-la-produccion-de-biogas>
- HomeBiogas 2. (s. f.). HomeBiogas. Recuperado 9 de diciembre de 2021, de https://www.homebiogas.com/wp-content/uploads/2021/03/HB2GF_0321_print_v2.pdf
- Jinks, T. (2017, octubre 27). Por qué es tan difícil desarrollar nuevos antibióticos. *BBC News Mundo*.
<https://www.bbc.com/mundo/noticias-41776539>
- Khare, A., & Tavazoie, S. (2015). Multifactorial Competition and Resistance in a Two-Species Bacterial System. *PLOS Genetics*, 11(12), e1005715. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005715>
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Makaka, G., Simon, M., & Okoh, A. I. (2016). An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 843. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090843>
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Okoh, A. I., Makaka, G., & Simon, M. (2013). Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4390-4417. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094390>
- Martín-Aragón, S. (2011). Antibióticos de última generación. Revisión. *Offarm farmacia y sociedad*, 30(6), 58-63. <https://dialnet.unirioja.es/info/textonodisponible>
- Merida-Vieyra, J., De Colsa, A., Calderon Castañeda, Y., Arzate Barbosa, P., & Aquino Andrade, A. (2016). First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. *PLoS ONE*, 11(12), e0168608.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168608>
- Ministerio de Salud Pública. (2018). *Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Molina Cuasapaz, G. M., Garzón, P. L., Borja, E. R., & Cevallos, F. (2020). Biodigestores en Unidades Productivas Agropecuarias (UPAs): Un proceso para combatir la RAM, producir energía renovable y fertilizante de alta calidad—Proyecto Piloto Inventagri. *ECUADOR ES CALIDAD - Revista Científica Ecuatoriana*, 7(1), 1025-1035. <https://doi.org/10.36331/revista.v7i1.89>
- Morán Parrales, R. G. (2019). *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). [Tesis de grado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/13826>

Nahar, A., Awasthi, S., Hatanaka, N., OKUNO, K., hoai phuong, H., Hassan, J., Hinenoya, A., & YAMASAKI, S. (2018). Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3). 510-517. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0708>

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Lista de los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. *OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal*. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Mayo2018.pdf

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2017, 27 de febrero). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-López, S., Espinel, N., Crespo-Pérez, V., & Zurita, J. (2019). High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. *Journal of Water and Health*, 18(1). <https://doi.org/10.2166/wh.2019.195>

Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-López, S., Espinel, N., & Zurita, J. (2018). *Escherichia coli* hyperendemic clone ST410-A harboring bla CTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International Journal of Food Microbiology*, 280. 41-45 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.037>

Ortiz Cabrera, M. A. (2015). *Desarrollo de un simulador numérico basado en ADM1 de un reactor anaerobio AnSBR*. [Tesis de posgrado, Universidad Politécnica de Catalunya]. [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/80317/TFM_MARCO_ORTIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/80317/TFM_MARCO_ORTIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

O'Neill J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally. Vol. 7, *Archives of Pharmacy*

Palmeira, J. D., & Ferreira, H. M. N. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206>

Palmeira, J. D., Haenni, M., Metayer, V., Madec, J.-Y., & Ferreira, H. M. N. (2020). Epidemic spread of Inc11/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) blaCTX-M-8 gene in *Escherichia coli* of Brazilian cattle. *Veterinary Microbiology*, 243, 108629. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108629>

Parra Huertas, R. A. (2015). Digestión anaeróbica: Mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción + Limpia*, 10(2), 142-159. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552015000200014&script=sci_abstract&tlng=es

Pérez Mesa, H. J. (2015). *Detección del gen CTX-M 2 en cepas de Escherichia Coli productoras de Beta-Lactamasas de espectro extendido (C3G) aisladas del Hospital Vicente Corral Moscoso; Cuenca-Ecuador*. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58079>

Resende, J. A., Silva, V. L., de Oliveira, T. L. R., de Oliveira Fortunato, S., da Costa Carneiro, J., Otenio, M. H., & Diniz, C. G. (2014). Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*, 153, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>

Sartori, L. (2018). *Caracterização molecular de Escherichia coli produtora de β -lactamasas de amplo espectro em bovinocultura leiteira* [Tesis de posgrado, Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.9.2018.tde-10102018-153547>

Artículo científico: Interacción de e. coli resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 1-16)

Vignoli, R. (2017). *Escherichia coli patógeno extra intestinal (ExPEC): Atributos de virulencia, epidemiología molecular y resistencia a antibióticos*. [Tesis de posgrado, Universidad de la República]
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/10229>

Anexo 1

Tabla 3. *Parámetros de susceptibilidad de los antibióticos utilizados.*

	Antimicrobianos		≥S	SDD	I	R
1	Aztreonam	30µg	21	-	18-20 [^]	17
2	Ácido nalidíxico	30µg	19	-	14-18	13
3	Amikacina	30µg	17	-	15-16 [^]	14
4	Azitromicina	15µg	13	-	-	12
5	Cefotaxima	30µg	26	-	23-25 [^]	22
6	Ceftazidima	30µg	21	-	18-20 [^]	17
7	Cefepima	30µg	25	19-24	-	18
8	Cefoxitina	30µg	18	-	15-17 [^]	14
9	Ciprofloxacina	5µg	26	-	22-25 [^]	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 [^]	12
14	Imipenem	11µg	23	-	20-22	19
15	Levofloxacina	5µg	21	-	17-20 [^]	16
16	Netilmicina	30µg	15	-	13-14 [^]	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

Nota: Tomado de *Clinical and Laboratory Standards Institute (2020)*