

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de fin de Carrera Titulado:

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DETECCIÓN DE
COMUNIDADES BACTERIANAS ANAEROBIAS CON MULTIRRESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS”**

Realizado por:

ANDREA CAROLINA PÉREZ BÁEZ

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 15 de agosto del 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, ANDREA CAROLINA PÉREZ BÁEZ, con cédula de identidad #1722481775 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Andrea Carlina Pérez Báez

C.I. 1722481775

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DETECCIÓN DE
COMUNIDADES BACTERIANAS ANAEROBIAS CON MULTIRRESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS”**

Realizado por:

ANDREA CAROLINA PÉREZ BÁEZ

Como Requisito para la Obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOHANNA MEDRANO

KATTY CORAL

Después de revisar el trabajo presentado, lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia y amigos por su constante apoyo y aún más cuando mis ánimos decaen. En especial, quiero hacer mención de mi madre, que siempre estuvo ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

También quiero agradecer a mis profesores, quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada etapa para lograr alcanzar mi título de ingeniera.

Por último, quiero agradecer a la Universidad Internacional SEK Ecuador por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido llegar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivo General	6
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1 Montaje y puesta en marcha del sistema tecnológico.....	7
4.1.1 Recolección de muestras de matrices vegetales.....	7
4.1.2 Muestras tomadas en los puntos de muestreo	7
4.1.3 Preparación del medio de cultivo.....	7
4.1.4 Enriquecimiento de microorganismos presentes en matrices vegetales. Periodo de aclimatación.	9
4.1.5 Montaje del sistema tecnológico.....	9
4.1.6 Operación del sistema tecnológico.	10
4.2 Análisis de resultados.	13
4.2.1 Cálculo del delta DO y del Índice de susceptibilidad.	13
4.2.2 Conservación de las muestras	14
4.3 Pruebas moleculares:	14
4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN	14
4.3.2 Amplificación del gen 16S rRNA.....	15

4.3.3 Preparación de Librerías y Secuenciación.	17
4.3.4 Secuenciación masiva de nueva generación.	18
4.3.5 Análisis de datos de secuenciación masiva de nueva generación.	18
5. RESULTADOS	18
5.1 Ensayo del nuevo sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa, seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.	18
5.2 Identificación molecular de comunidades bacterianas en el quimiostato que no presentan susceptibilidad a antibióticos.	26
5.2.1 Amplificación de los primers (V3-V4) y (V4-V5) de la región 16S rRNA	26
5.2.2 Secuenciación metagenómica de las muestras.....	26
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
7. CONCLUSIONES	30
8. RECOMENDACIONES	31
9. BIBLIOGRAFÍA	32
10. ANEXOS	40

Índice de Tablas

Tabla 1. Cálculos para la elaboración del medio de cultivo.	9
Tabla 2. Tasas de dilución utilizadas en el quimiostato.....	12
Tabla 3. Dosis usadas del antibiótico, medio de cultivo e inóculo en la prueba de tubos de ensayo para la detección de comunidades bacterianas no susceptibles a antibióticos.....	13
Tabla 4. Rangos de susceptibilidad y resistencia bacteriana al antibiótico.	14
Tabla 5. Componentes del Mastermix para PCR.....	17
Tabla 6. Condiciones de Ciclado.	18
Tabla 7. Tabla resumen de los resultados del índice de susceptibilidad de comunidades bacterianas a antibióticos.	25
Tabla 8. Cálculo de la razón de la tasa de dilución mínima (0,075).....	42
Tabla 9. Cálculo de la razón de la tasa de dilución media (0,4)	43
Tabla 10. Cálculo de la razón de la tasa de dilución alta (0,6.....	44
Tabla 11. Identificación bacteriana de la región v3-v4 por medio del MINION DE OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES	51
Tabla 12. Identificación bacteriana de la región V4-V5 por medio del secuenciador MINION DE OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES	52
Tabla 13. Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V3-V4.....	53
Tabla 14. Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V4-V5.....	54

Índice de Imágenes

Imagen 1: Montaje y operación del nuevo sistema tecnológico compuesto por un quimiostato simple de una etapa con un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular.....	11
Imagen 2: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución mínima de $(0,075 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	20
Imagen 3: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución mínima de $(0,075 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	21
Imagen 4: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución media de $(0,4 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 5: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución media de $(0,4 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	23
Imagen 6: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución máxima de $(0,6 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	24
Imagen 7: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución máxima de $(0,6 \text{ h}^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.....	25

Imagen 8: Identificación bacteriana de la región V3-V4, obtenida del programa de Nanopore Technologies con una abundancia de 1X, una cobertura de 95% y una identidad del 95%. Los porcentajes obtenidos en cada género bacteriano corresponde a los porcentajes de la abundancia relativa.	27
Imagen 9: Identificación bacteriana de la región V4-V5, obtenida del programa de nanopore technologies con una abundancia de 1X, una cobertura de 95% y una identidad del 95%. Los porcentajes obtenidos en cada género bacteriano corresponde a los porcentajes de la abundancia relativa.	29
Imagen 10: Montaje y Corrida del sistema tecnológico basado en un quimiostato simple.	40
Imagen 11: Proceso de extracción de ADN.	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 12: Muestras colocadas en el termociclador	46
Imagen 13: Preparación de bibliotecas.	47
Imagen 14: Corrida de gel de electroforesis al 1.5%, de la región V3-V4.	48
Imagen 15: Corrida de gel de electroforesis al 1.5%, de la región V4-V5.	49
Imagen 16: Proceso de secuenciación de comunidades bacterianas en el equipo MINION DE OXFORD TECHNOLOGIES.	50

Índice de Anexos

Anexo A: Montaje y corrida del sistema tecnológico basado en un quimiostato simple	42
Anexo B: Cálculo de la razón de la tasa de dilución mínima (0,0075)	43
Anexo C: Cálculo de la razón de la tasa de dilución media (0,4)	44
Anexo D :Cálculo de la razón de la tasa de dilución Máxima (0,6)	45
Anexo E: Proceso de extracción de ADN.	46
Anexo F: Muestras colocadas en el termociclador	47

Anexo G: Preparación de Biblioteca	48
Anexo H: Corrida del gel de electroforesis al 1.5% de la región V3-V4	49
Anexo I: Corrida del gel de electroforesis al 1.5% de la región V4-V5.....	50
Anexo J: Proceso de secuenciación de comunidades bacterianas en el equipo MINION DE OXFORD TECHNOLOGIES	51
Anexo K: Identificación bacteriana de la región V3-V4 por medio MINION DE OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES.	52
Anexo L: Identificación bacteriana de la región V4-V5 por medio MINION DE OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES	53
Anexo M: Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V3-V4.....	54
Anexo N: Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V4-V5.	55

Para someter a:

To be submitted:

Carolina Pérez, Alberto Aguirre¹.

**“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DETECCIÓN DE
COMUNIDADES BACTERIANAS ANAEROBIAS CON MULTIRRESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS”**

1 Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas
(FICA),

Quito, Ecuador.

2023/08/01

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Dr. Alberto Alejandro Aguirre Bravo,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas (FICA),

Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-963091192; email: alberto.aguirre@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: **“EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TECNOLOGÍA
DE DETECCIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS ANAEROBIAS CON
MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS”**

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es una creciente preocupación global debido a su capacidad para propagar enfermedades infecciosas de manera rápida y causar altas tasas de mortalidad. Sin embargo, los métodos actuales para estudiar bacterias resistentes tienen limitaciones, ya que se centran en el análisis de cepas individuales en lugar de abordar comunidades bacterianas. Además, no pueden identificar bacterias resistentes que crezcan a altas velocidades, lo que podría representar un riesgo para la salud si se vuelven patógenas. Para abordar estas limitaciones, se ha evaluado un nuevo enfoque tecnológico en este estudio. El objetivo de la investigación fue determinar la eficacia de este enfoque tecnológico que combina un quimiostato de una sola etapa y pruebas de susceptibilidad y resistencia a antibióticos para identificar comunidades bacterianas anaerobias resistentes a múltiples antibióticos con altas tasas de crecimiento, presentes en alimentos de los mercados del DMQ. El estudio se dividió en dos etapas. En la primera etapa, se aislaron comunidades bacterianas anaerobias resistentes a antibióticos utilizando el nuevo sistema tecnológico. Los resultados indicaron que se detectó resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados en diversas tasas de dilución. En la segunda etapa, se realizó una secuenciación masiva para identificar bacterias anaerobias resistentes a amikacina, revelando la identificación de 36 géneros bacterianos resistentes en las regiones V3-V4 y V4-V5. Los géneros más abundantes incluyeron *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Leuconostoc*, *Paenibacillus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium* y *Chryseobacterium*. En conclusión, el enfoque tecnológico empleado demostró ser eficiente para identificar comunidades bacterianas anaerobias resistentes a antibióticos con altas tasas de crecimiento. Esta metodología innovadora combina el uso de un quimiostato de una sola etapa con pruebas de susceptibilidad a antibióticos y se presenta como una herramienta valiosa para detectar la resistencia bacteriana en el contexto alimentario.

Palabras Clave: bacterias, quimiostato, antibióticos, resistencia, secuenciación

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a growing global concern due to its ability to spread infectious diseases rapidly and cause high mortality rates. However, current methods for studying resistant bacteria have limitations as they focus on the analysis of individual strains rather than addressing bacterial communities. Additionally, they cannot identify resistant bacteria that grow at high speeds, which could pose a health risk if they become pathogenic. To address these limitations, a new technological approach has been evaluated in this study. The objective of the research was to determine the effectiveness of this technological approach that combines a single stage chemostat and antibiotic susceptibility and resistance tests to identify anaerobic bacterial communities resistant to multiple antibiotics with high growth rates, present in foods from the markets of the DMQ. The study was divided into two stages. In the first stage, antibiotic-resistant anaerobic bacterial communities were isolated using the new technological system. The results indicated that resistance was detected to most of the antibiotics tested at various dilution rates. In the second stage, massive sequencing was performed to identify anaerobic bacteria resistant to amikacin, revealing the identification of 36 resistant bacterial genera in the V3-V4 and V4-V5 regions. The most abundant genera included *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Leuconostoc*, *Paenibacillus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, and *Chryseobacterium*. In conclusion, the technological approach used proved to be efficient in identifying antibiotic-resistant anaerobic bacterial communities with high growth rates. This innovative methodology combines the use of a single stage chemostat with antibiotic susceptibility testing and is presented as a valuable tool to detect bacterial resistance in the food context.

Keywords: bacteria, chemostat, antibiotics, resistance, sequencing

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos (AMR) comprende la capacidad de los microorganismos de resistir los efectos de los antimicrobianos (Calderón & Aguilar, 2016). El uso inadecuado de antibióticos y su distribución sin control representan una amenaza global, agravada por la falta de investigación en resistencia microbiana, especialmente en países en desarrollo (Barletta et al., 2018). La cadena alimentaria es una vía común de transmisión de microorganismos que causan enfermedades infecciosas y millones de muertes anuales (Ruiz-Roldán et al., 2018).

La resistencia a antibióticos plantea un riesgo para la salud pública al dificultar el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes debido a la rápida propagación de microorganismos resistentes (OMS, 2020). Se ha observado un aumento en las muertes anuales relacionadas con enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes a antibióticos, con cifras proyectadas para 20250 que son alarmantes (Jim O'Neill, 2016). Para abordar esto, se necesita una supervisión constante y nuevos tratamientos para prevenir una gran cantidad de muertes en el futuro (Ramon-Pardo et al., 2018).

Los genes de resistencia a antibióticos se encuentran en diversas fuentes, incluyendo el agua, la ganadería, la agricultura y los alimentos (Kümmerer, 2011). La resistencia a antibióticos en la cadena alimentaria es especialmente preocupante debido a su relación con la exposición humana, lo que ha llevado a un mayor control de la calidad de los alimentos en mercados y lugares de comida (Zekar et al., 2017).

La resistencia bacteriana en entornos hospitalarios limita las opciones de tratamiento y prolonga la agonía de los pacientes, aumentando los costos y las tasas de mortalidad (Serra-Valdés et al., 2017). Los microorganismos resistentes han evolucionado, utilizando estrategias como cambios enzimáticos, alteraciones genéticas y otros mecanismos para eludir los efectos de los antibióticos (Ross et al., 2020).

La resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida, y puede transferirse entre diferentes especies bacterianas, incluso de alimentos a seres humanos (Godziszewska et al., 2018). Diversas organizaciones, como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (ReLAVRA), han categorizado y priorizado antibióticos para abordar el problema (OMS, 2018), (Jiménez-Pearson et al., 2019). Países como Uruguay, Brasil, Colombia y Argentina han identificado bacterias patógenas multirresistentes en alimentos, lo que destaca la importancia de la vigilancia (Jiménez-Peatson et al., 2019); (MSP, 2018).

Se emplean dos métodos convencionales para estudiar bacterias resistentes. El primero es microbiológico, incluyendo pruebas de susceptibilidad de difusión en disco, recuento en placa y microdilución en caldo (Ramirez-Hernandez et al., 2019). El segundo método es molecular, identificando bacterias resistentes y buscando genes como (*arma*, *rmtB*, *VIM*, *NDM*) (Ahmed, 2019); (Gopalakrishnan et al., 2018). Las pruebas de difusión en disco se hacen en medio agar Mueller-Hinton con colonias de 0.5 McFarland (Amare et al., 2019); (Huynh et al., 2020). También se utilizan alícuotas para recuento en placa con agar sólido y microdilución en placas de 96 pocillos (Ramirez-Hernandez et al., 2019). Para identificación y verificación de genes de resistencia se emplea la amplificación de la región 16S RNAr (Ahmed, 2019). Sin embargo, los métodos tradicionales actuales no permiten identificar resistencia a antibióticos en comunidades bacterianas y tampoco determinan si su crecimiento es rápido o lento (Gopalakrishnan et al., 2018).

Debido a que las pruebas actuales de aislamiento y detección de microorganismos resistentes no permiten identificar bacterias con altas tasas específicas de crecimiento y tampoco detectar resistencia de comunidades bacterianas a algunos antibióticos, en este estudio se buscó evaluar un quimiostato de una etapa seguido de un sistema de detección de bacterias

anaerobias susceptibles a antibióticos. Todo lo anteriormente mencionado se hizo con el fin de resolver todas las limitaciones que presentan los métodos convencionales actuales.

Es importante notar que las bacterias patógenas resistentes a antibióticos y que presentan altas velocidades específicas de crecimiento pueden causar enfermedades graves, esto sucede porque al tener velocidades específicas de crecimiento altas se pueden propagar más rápidamente en el huésped, lo que hace que tengan mayor probabilidad de afectar al paciente en menor tiempo (Burnham et al., 2017); (Caycedo Lozano et al., 2021).

2. HIPÓTESIS

Es posible detectar comunidades bacterianas anaerobias con resistencia a antibióticos y que presenten altas velocidades específicas de crecimiento a partir de matrices vegetales utilizando un nuevo sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y secuenciación masiva de nueva generación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar si un sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa seguido de un sistema de detección de resistencia bacteriana a antibióticos, permite detectar comunidades bacterianas anaerobias multirresistentes y que presentan altas velocidades específicas de crecimiento en alimentos expendidos en mercados del DMQ.

3.2 Objetivos Específicos

-Implementar un quimiostato simple de una etapa para el crecimiento de comunidades bacterianas anaerobias presentes en alimentos recolectados de mercados del DMQ seguido de una etapa de pruebas de sensibilidad a antibióticos basadas en la lectura de densidad óptica.

-Identificar los géneros bacterianos anaerobios que provengan del quimiostato y que presenten resistencia bacteriana, a través de secuenciación masiva de nueva generación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Montaje y puesta en marcha del sistema tecnológico.

4.1.1 Recolección de muestras de matrices vegetales.

Las muestras fueron tomadas de los mercados del Norte-Centro-Sur del Distrito Metropolitano de Quito, por la mala manipulación de los productos y el consumo frecuente de alimentos en los patios de comidas.

4.1.2 Muestras tomadas en los puntos de muestreo

Las muestras recolectadas para este estudio fueron: frutas y verduras (papaya, espinaca, mandarina, mora, frutilla, cilantro, guayaba, chochos, entre otras).

4.1.3 Preparación del medio de cultivo.

La preparación del medio de cultivo para los microorganismos se realizó siguiendo las recomendaciones de Acevedo et al. (2002); para calcular los nutrientes que se necesitaba en el medio se utilizó la siguiente ecuación (1).

$$SO = SF + \frac{XF - XO}{\frac{Yx}{s}} \quad (1)$$

Donde:

SO: Concentración inicial del nutriente.

SF: Concentración final del nutriente.

XF: Concentración final de los microorganismos

XO: concentración inicial de los microorganismos en el cultivo.

Yx/s: Rendimiento del sustrato en la biomasa

Los reactivos para la preparación del medio de cultivo se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Cálculos para la elaboración del medio de cultivo.

Medio de Cultivo	
Fuente de Carbono	
Reactivos	Concentración
Sacarosa	32,13 g/L
Buffer fosfato	
K₂HPO₄	0,1 g/L
KH₂PO₄	0,9 g/L
Fuente de Nitrógeno	
Extracto de quinoa	0,42 g/L
pH 7-7.5	
Agua destilada 1000 mL	

Para la preparación del extracto de quinua se pesó 21,25 g de quinua en grano, posteriormente se hirvió la quinua en 30 ml de agua y finalmente se licuó y tamizó (Acevedo et al., 2002)

4.1.4 Enriquecimiento de microorganismos presentes en matrices vegetales.

Periodo de aclimatación.

Las frutas y verduras recolectadas fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingenierías (FICA), en donde se las aplastó en el mortero hasta extraer el líquido de las frutas y la clorofila de los vegetales. El líquido extraido se lo colocó en un matraz de 100 mL juntamente con el medio de cultivo que se indica en la tabla 1 con el fin de obtener el desarrollo de las comunidades bacterianas presentes en las frutas y verduras. Los parámetros utilizados para este proceso fueron: incubación a 30 °C por 72 horas, sin agitación. Se conectó una manguera en la tapa del Erlenmeyer que conectaba con un matraz que contenía una solución saturada de sulfato de cobre con el fin de neutralizar los bioaerosoles y la salida de los gases de fermentación.

4.1.5 Montaje del sistema tecnológico.

El quimiostato fue construido con un matraz de 500 mL que tenía una oliva en un costado, en donde se colocó una manguera de 10 mm de ancho para los desechos del medio de cultivo que caían en un vaso de precipitación de 1000 mL. Cada matraz tenía una tapa que poseía dos olivas, una de ellas para la salida que conectaba con una manguera de pecera a un matraz que se encontraba con una solución saturada de sulfato de cobre con el fin de permitir la salida de los gases causados por el ensayo y la otra para la alimentación continua de las comunidades bacterianas dentro del reactor a partir de un galón de 6 Litros, Como se puede observar en la Imagen 1.

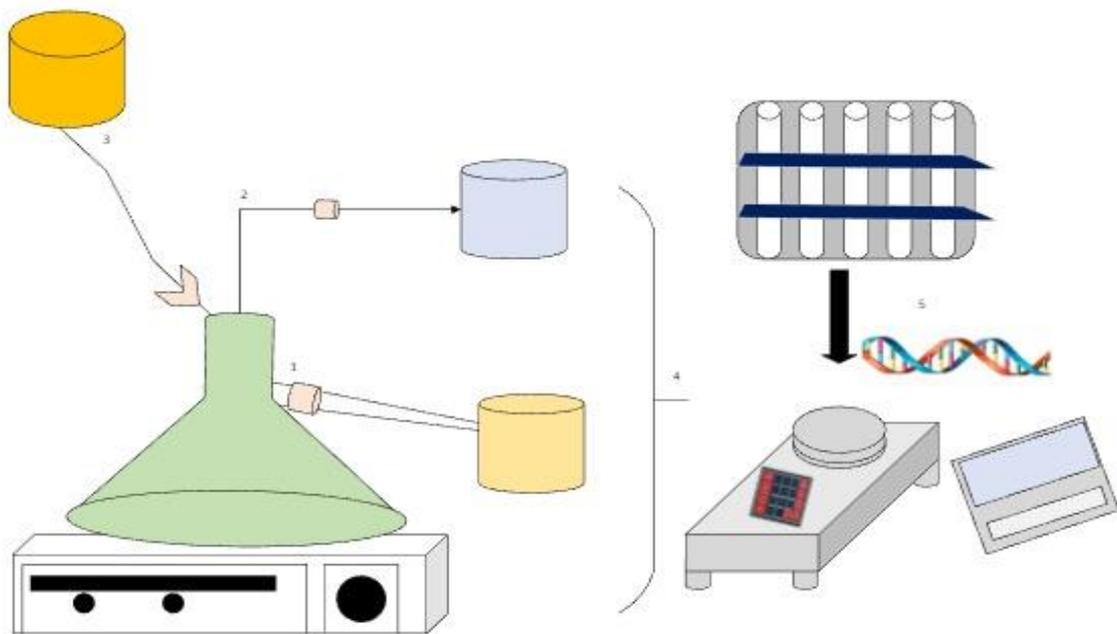


Imagen 1: Montaje y operación del nuevo sistema tecnológico compuesto por un quimiostato simple de una etapa con un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos y análisis molecular. 1.- Salida de los desechos (caldo de cultivo más bacterias muertas que no se adaptan a la tasa de dilución), 2.- Salida de los gases, 3.- Alimentación (ingreso del medio de cultivo al quimiostato) 4.- Sistema de detección de susceptibilidad a antimicrobianos y 5.- Identificación molecular de las comunidades bacterianas.

4.1.6 Operación del sistema tecnológico.

La alimentación del medio de cultivo del matraz se hacía por medio de una botella de alimentación que se conectaba a una manguera de venoclisis con dos válvulas, las cuales se encargaban de regular el flujo en el biorreactor (quimiostato). El medio de cultivo que ingresaba en la botella de alimentación poseía un pH que variaba de 7.00 a 7.4, al ingresar al reactor el pH cambiaba de 6.5 a 5, al estar conectado a una manguera de pecera de 10 mm de ancho hacia el vaso de residuos, la cual estaba colocada en forma de U con la punta de la manguera a la altura de los 500 mL del matraz con el fin de desechar los residuos y que el reactor se mantenga en los 500 mL. También se encontraba conectado un matraz de sulfato de cobre (CuSO_4) de 200 mL para sacar los gases que se formaban. La temperatura dentro del sistema se mantuvo constante a 30 °C al igual que los 110 rpm. Es importante mencionar que

operaron dos quimiostatos en paralelo, los mismos que fueron dos replicas independientes. Los quimiostatos se operaron a 3 tasas de dilución, éstas se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Tasas de dilución utilizadas en el quimiostato

Tasas de dilución utilizadas en el quimiostato
Tasa de dilución
Tasa mínima ($0.075h^{-1}$)
Tasa media ($0.4 h^{-1}$)
Tasa máxima ($0.6 h^{-1}$)

Para calcular el flujo de entrada del medio de cultivo se utilizó la siguiente ecuación (2):

$$\text{Flujo de entrada } (l * h^{-1}) = (D) \text{ Tasa de dilución } (h^{-1}) * (V) \text{ Volumen dentro del quimiostato } (2)$$

En cada tasa de dilución se esperó al menos 3 tiempos de residencia (T) para que el crecimiento bacteriano del cultivo de los quimiostato llegue a estado estacionario El cálculo del tiempo de residencia se realizó mediante la siguiente ecuación (3).

$$(T) \text{ Tiempo de residencia } (h) = \frac{(V) \text{ Volumen líquido en el quimiostato } (l)}{(F) \text{ Flujo de Entrada } (l * h^{-1})} (3)$$

Se realizó un estudio en tubos de ensayo para identificar bacterias resistentes a antibióticos, y se inóculo el medio con muestras extraídas de los quimiostatos a diversas tasas de dilución y diferentes dosis de cada antibiótico durante 24 horas. Las diluciones usadas de cada antibiótico se detallan en la tabla 3

Tabla 3. Dosis usadas de antibiótico, medio de cultivo e inóculo en la prueba de tubos de ensayo para la detección de comunidades bacterianas no susceptibles a antibióticos.

Dosis de antibióticos, bacterias y medio de cultivo.				
Nombre del antibiótico	Volumen del antibiótico	Volume n de bacteria s	Volumen de medio	Familia al que el antibiótico pertenece
Amoxicilina (AMX)	2.25 uL	600 uL	5390 uL	Betalactámico
Gentamicina (GEN)	3.21 uL	600 uL	5390 uL	Aminoglucósido
Amikacina (AMK)	9 uL	600 uL	5391 uL	Aminoglucósido
Ceftriaxona (CRO)	6 uL	600 uL	5394 uL	Cefalosporina
Ampicilina (AMP)	7.5 uL	600 uL	5392 uL	Betalactámico
Control	-	5400 uL	600 uL	-

Una vez calculadas las concentraciones necesarias en cada tubo se obtuvo un volumen máximo de 6 mL para cada una de las muestras que se realizaron por triplicado de cada quimiostato. Se midió la densidad óptica inicial a la hora cero y cada 24 horas por tres días. Cada muestra se dejó incubando por 24 horas a una temperatura de 30°C (Tonoyan et al., 2019a). La preparación del tubo control fue distinta ya que en vez de colocar antibiótico en él se colocó agua. Es importante tener en cuenta que los antibióticos utilizados en este estudio fueron de uso inyectable. Esta recomendación fue tomada por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP, 2018) y Vademécum (Rodríguez, 2013).

4.2 Análisis de resultados.

4.2.1 Cálculo del delta DO y del Índice de susceptibilidad.

Con la densidad óptica se calculó la razón (OD) utilizando la ecuación (4) con el fin de establecer si existe algún cambio en el crecimiento bacteriano antes y después de la incubación de la muestra tomada, a continuación, se realizó una segunda razón que se usó para interpretar los resultados y conocer si existe comunidades bacterianas con susceptibilidad o sin susceptibilidad al antibiótico en el quimiostato en base al control de este estudio. Para obtener el índice de susceptibilidad se empleó la ecuación (5).

$$\text{Razon (OD)} = \frac{\text{OD después de inocular}}{\text{OD antes de inocular}} \quad (4)$$

$$\text{Índice de susceptibilidad} = \frac{\text{Razón OD de cada antibiótico}}{\text{Razón OD del control}} \quad (5)$$

Para identificar si las comunidades bacterianas son o no susceptibles a los antibióticos se planteó una escala de 2 niveles como se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Rangos de susceptibilidad y resistencia bacteriana al antibiótico.

Índice de posible susceptibilidad y no susceptibilidad	
Susceptibles	< 1
No susceptibles	≥1

Una vez establecidos los niveles de rangos se clasificó en susceptibles o no susceptibles las comunidades bacterianas existentes en cada uno de los tubos realizados por cada tasa de dilución a la que se trabajó en el quimiostato.

La metodología implementada en esta investigación de la identificación de susceptibilidad a antibióticos es completamente nueva y tiene ciertas ventajas con respecto a

las técnicas tradicionales (cultivos-antibiogramas), como por ejemplo permite un análisis de comunidades bacterianas y no solo de un cultivo puro, también es mucho más rápido la llegada del antibiótico a las células en medios líquidos que en medios sólidos.

4.2.2 Conservación de las muestras

Para la conservación de muestras se utilizó aproximadamente 312 tubos eppendorf de 1.5 mL, en los cuales se colocaron 200 mL de glicerina y 800 mL de la muestra y se congeló a -4°C.

4.3 Pruebas moleculares:

Se utilizaron técnicas moleculares para analizar las bacterias que conforman las comunidades en el quimiostato, con el fin identificar las especies bacterianas con resistencia a antibióticos. De las tres tasas de dilución con las que se trabajó se escogió la tasa más alta (0,6 h^{-1}) debido a que presentó los valores más altos en el índice de susceptibilidad. Con las muestras seleccionadas se realizó la extracción de ADN, la amplificación de la región 16 S rRNA mediante PCR convencional y finalmente se las secuenció.

4. 3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo del Kit Colum-Pure Bacteria Genomic DNA Isolation (Applied Biological Materials Inc, 2019). Una vez realizado el procedimiento, se utilizó el equipo Qubit, con el Kit QubitTM 1X dsDNA HS Assay, para determinar la cantidad de ADN de cada una de las muestras.

4.3.2 Amplificación del gen 16S rRNA.

Una vez obtenido la extracción de ADN genómico se procedió a amplificar la región 16S rRNA, por ser la región más variable y confiable para los análisis filogenéticos bacterianos. La misma posee una longitud de aproximadamente 1500 pb, consta de nueve regiones intercaladas (C1-C9) y nueve variables (V1-V9). De todas las regiones, se tomó dos regiones que son hipervariables (V4-V5) Y (V3-V4), ya que poseen una mayor presión de análisis taxonómico (Rajeev et al., 2020). La mastermix para ambas regiones tuvo un volumen final de 25 ul la cual se encuentra conformada por los siguientes componentes buffer, dNTPs, Primer 341F, Primer 806R, templado, MEGAFI™ DNA Polymerase y agua miliQ. Las cantidades exactas se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes del Mastermix para PCR

Componentes	Región V4-V5	Región V3-V4
	Volumen (ul)	Volumen (ul)
Primer 341F	1	1
Primer 806R	1	1
Buffer	5	5
Dntps	0,5	0,5
Templado	2	3
MEGAFT™ DNA Polimerasa	0,5	0,5
Agua Mili Q	16	14

Para la realización de este proceso se usaron protocolos para cada región para la (V4-V5) el de (Mei et al., 2022) y para la (V3-V4) el de (Wang et al., 2021)

Las condiciones de ciclado para ambas regiones variaron en el número de ciclos, tiempo y temperatura como se puede observar en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de Ciclado.

Condiciones de Ciclado para PCR		
Fases	Región V4-V5	Región V3-V4
Desnaturalización	98°C – 3 min	98°C – 1 min
Inicial		
Ciclos	25	35
Desnaturalización	98°C – 15 seg	98°C – 10 seg
Hibridación	56°C – 30 seg	56°C – 30 seg
Extensión	72°C – 30 seg	72°C – 30 seg
Extensión Final	72°C – 5 min	72°C – 5 min

Posteriormente, se realizó la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con el ladder de 100 pb de Invitrogen™ Trackit™

Se realizó el mismo procedimiento detallado anteriormente con las mismas condiciones con aumentando colas y posteriormente los códigos de barras en cada muestra para pasar al proceso de secuenciación e identificar las diferentes muestras.

4.3.3 Preparación de Librerías y Secuenciación.

Para la preparación de las bibliotecas se utilizó el protocolo de Oxford NANOPORE Technologies, donde inicialmente se hizo una corrida de PCR barcoding amplicons (SQK-LSK109) manipulando 12 código de barras para la discriminación de las muestras, a continuación, se realizó la purificación con el Kit Pure Link® PCR Purification, del pooleado, y la preparación y recuperación de extremos para la unión de los adaptadores con el Kit NEB

Next® Companion Module y de la purificación de las perlas AMPure XP beads. Lacon por la ligación de adaptadores AMX se realizó con el Kit Ligación Sequencing (SQK-LSK 109), cuyo objetivo es permitir el paso del amplicón por el poro de la correcta secuenciación.

Para finalizar, se prepararon las celdas de flujo con el Kit Flow Cell Priming, y se cargó 75 uL de la biblioteca de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante El dispositivo de secuenciación MinION se usó para la secuenciación de las muestras por aproximadamente 2 días a 180mV y seteada para High accuracy bascalling y quality check superior a 9.

4.3.4 Secuenciación masiva de nueva generación.

Para la secuenciación se usó de referencia el protocolo de nanopore oxford technology de minion, con algunas modificaciones las cuales fueron: longitud de 300 a 400 pb, quality shape > 9.

4.3.5 Análisis de datos de secuenciación masiva de nueva generación.

El análisis de datos fue procesado en el programa epi2me de nanopore oxford technology de minion, con una abundancia de 1%, una identidad de 95 % y una cobertura de 95 %. Los datos fueron comparados con el GenBank del NCBI.

5. RESULTADOS

5.1 Ensayo del nuevo sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa, seguido de un sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos.

En la imagen 2 se observa el índice susceptibilidad frente a dos tipos de antibióticos: amikacina y gentamicina que poseen mayor efecto en bacterias **GRAM (-)** con una tasa de dilución mínima de $0,075h^{-1}$. La gentamicina presenta una razón < 1 lo que muestra que hay

una susceptibilidad bacteriana, en comparación con la amikacina que revela una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a este antibiótico.

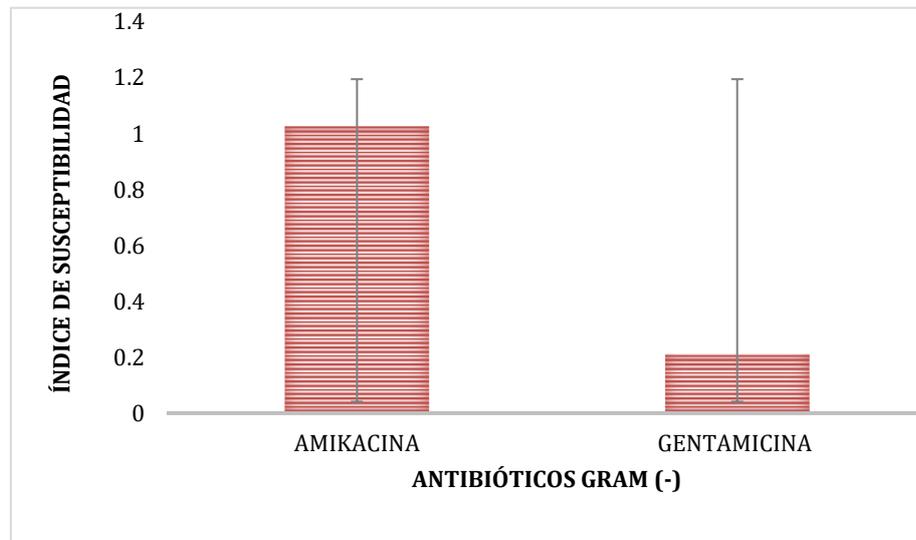


Imagen 2: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución mínima de $(0,075h^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

En la imagen 3 se observa el índice de susceptibilidad bacteriana frente a tres tipos de antibióticos: ampicilina, amoxicilina y ceftriaxona que son antimicrobianos de **ALTO ESPECTRO** con una tasa de dilución mínima de $0,075 h^{-1}$. La amoxicilina y la ampicilina presenta una razón < 1 , lo que revela que hay susceptibilidad bacteriana, a diferencia de la ceftriaxona que muestra una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a este antibiótico.

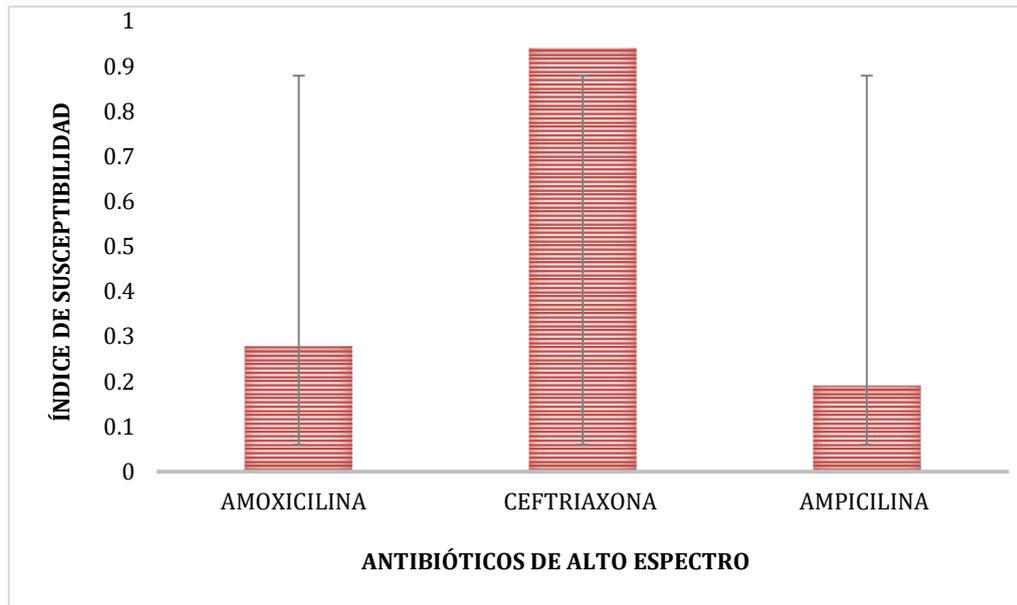


Imagen 3: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución mínima de ($0,075h^{-1}$). Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

En la imagen 4 se observa la índice susceptibilidad frente a dos tipos de antibióticos: amikacina y gentamicina que poseen mayor efecto en bacterias **GRAM (-)** con una tasa de dilución media de $0,4 h^{-1}$. La gentamicina y la amikacina presenta una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a ningún antibiótico.

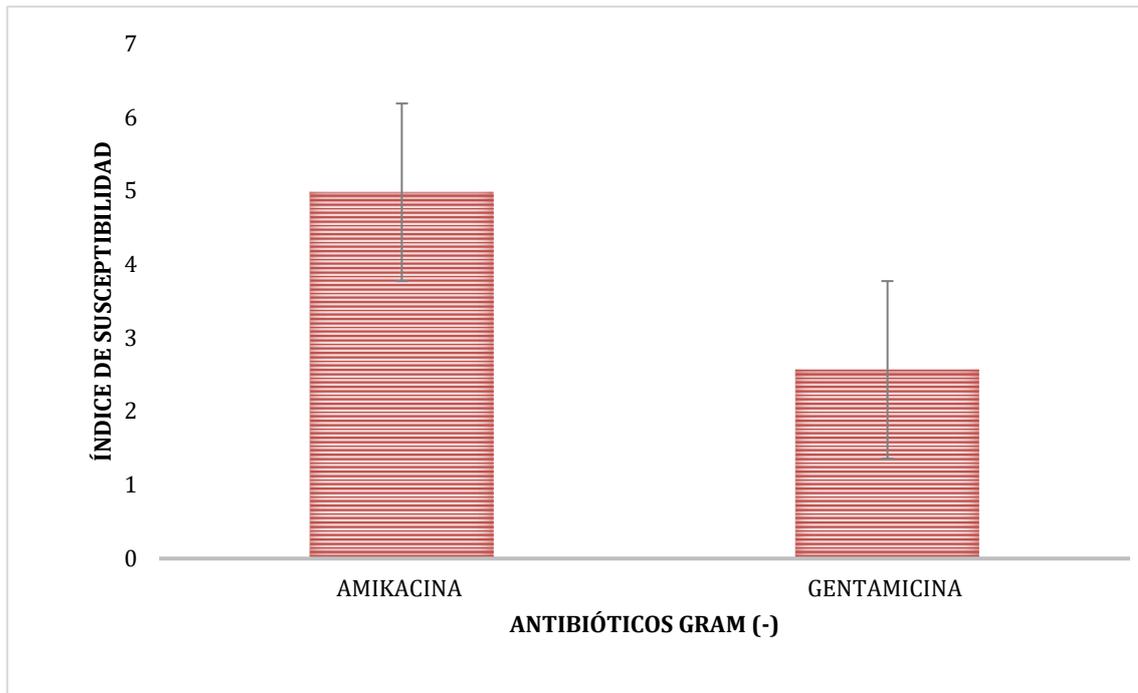


Imagen 4: Interpretación del índice grado susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución media de $(0,4 h^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

En la Imagen 5 se observa el índice de susceptibilidad bacteriana frente a tres tipos de antibióticos: ampicilina, amoxicilina y ceftriaxona que son antimicrobianos de **ALTO ESPECTRO** con una tasa de dilución media de $0,4h^{-1}$. La amoxicilina, la ampicilina y la ceftriaxona presenta una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a ningún antibiótico.

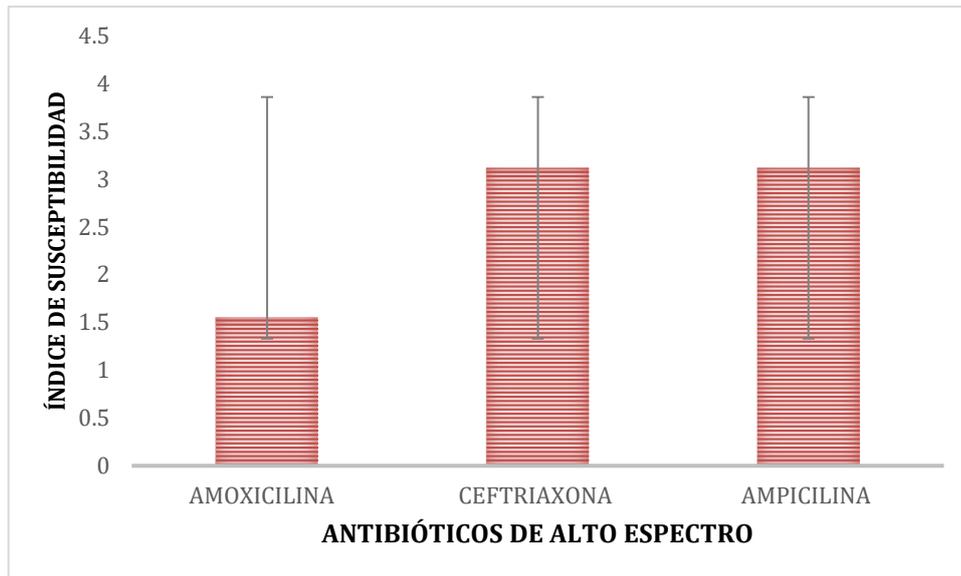


Imagen 5: Interpretación del índice de susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución media de $(0,4 h^{-1})$.

Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

En la imagen 6 se observa la índice susceptibilidad frente a dos tipos de antibióticos: amikacina y gentamicina que poseen mayor efecto en bacterias **GRAM (-)** con una tasa de dilución máximo de $0,6h^{-1}$. La gentamicina presenta una razón < 1 lo que muestra que hay una susceptibilidad bacteriana, en comparación con la amikacina que revela una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a este antibiótico.

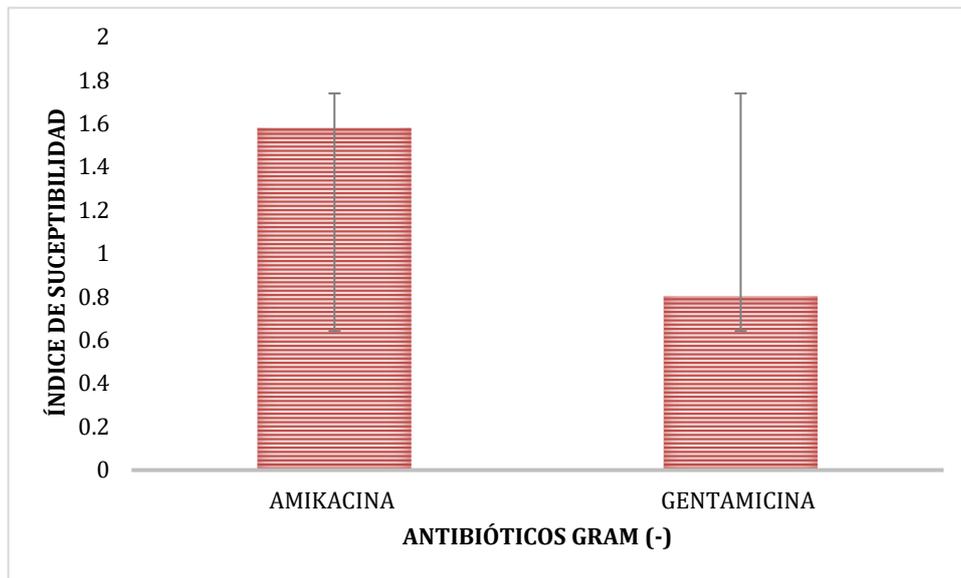


Imagen 6: Interpretación del índice susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución máxima de $(0,6 h^{-1})$. Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

En la imagen 7 se observa el índice de susceptibilidad bacteriana frente a tres tipos de antibióticos: ampicilina, amoxicilina y ceftriaxona que son antimicrobianos de **ALTO ESPECTRO** con una tasa de dilución máxima de $0,6 h^{-1}$. La amoxicilina, la ampicilina y la ceftriaxona presenta una razón ≥ 1 , lo que indica que la comunidad bacteriana no presenta susceptibilidad a ningún antibiótico.

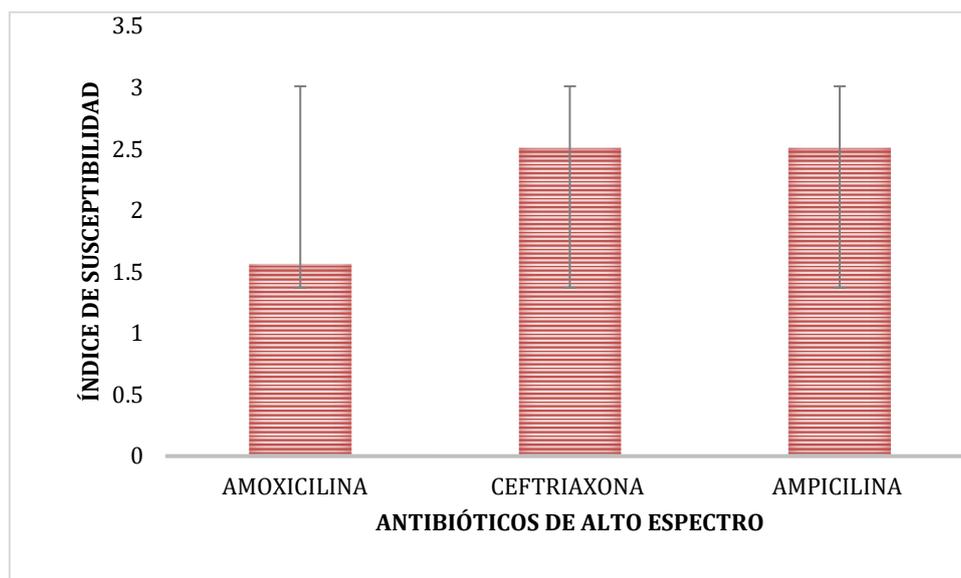


Imagen 7: Interpretación del índice de susceptibilidad bacteriana a antibióticos en una tasa de dilución máxima de ($0,6 h^{-1}$). Las barras representan promedios de dos replicas independientes. Además, se encuentra representada la desviación estándar.

A continuación, se presenta una tabla resumen que muestra los índices de susceptibilidad y resistencia de las comunidades bacterianas a los antibióticos.

Tabla 7. Tabla resumen de los resultados del índice de susceptibilidad de comunidades bacteriana para todas las tasas de dilución. La interpretación de resistencia y susceptibilidad se divide en tres categorías: * indica susceptibilidad alta, ** indica susceptibilidad baja y *** indica resistencia.

Tasa de dilución	Tipo de antibiótico (Espectro)	Nombre del antibiótico	Índice de susceptibilidad/resistencia	Interpretación
$0.075 h^{-1}$	Antibióticos Gram (-)	Amikacina	1,026	***
		Gentamicina	0,21	*

	Antibióticos de alto espectro	Amoxicilina	0,0278	*
		Ceftriaxona	0,94	**
		Ampicilina	0,191	*
0.4 h⁻¹	Antibióticos Gram (-)	Amikacina	4,979	***
		Gentamicina	2,565	***
	Antibióticos de alto espectro	Amoxicilina	1,553	***
		Ceftriaxona	3,117	***
		Ampicilina	3,117	***
	0.6 h⁻¹	Antibióticos Gram (-)	Amikacina	1,579
Gentamicina			0,903	**
Antibióticos de alto espectro		Amoxicilina	1,56	***
		Ceftriaxona	2,507	***
		Ampicilina	2,507	***

5.2 Identificación molecular de comunidades bacterianas en el quimiostato que no presentan susceptibilidad a antibióticos.

Para la realización del análisis molecular se consideró únicamente las muestras de la tasa de dilución más alta ($0,6h^{-1}$) debido a que las comunidades bacterianas crecieron a una alta velocidad, lo que indica una propagación bacteriana que puede desarrollar más rápido enfermedades infecciosas en el paciente. El antibiótico seleccionado fue la amikacina (AMK) que fue el que presentó la no susceptibilidad más alta.

5.2.1 Amplificación de los primers (V3-V4) y (V4-V5) de la región 16S rRNA

Se realizaron dos amplificaciones en las muestras. La primera se realizó para obtener una amplia cantidad de copias de las regiones hipervariables, mientras que la segunda empleó los mismos cebadores con una cola adicional con el propósito de identificar los códigos de barra.

5.2.2 Secuenciación metagenómica de las muestras.

En la imagen 8 se encuentra representada la identificación bacteriana por medio del porcentaje de abundancia de cada especie presente en el ensayo realizado con amikacina (48h) con una tasa de dilución máxima de " $0,6 h^{-1}$ " obteniendo el 79,00 % de *Clostridium* (verde claro), 7,00 % de *Gluconacetobacter* (anaranjado), 6,00 % de *Leuconostoc* (gris), 5,41% de *Paenibacillus* (amarillo), 1,36% de *Acetobacter* (azul) y 1,23% de *Bifidobacterium* (verde oscuro), obtenido de la región V3-V4.

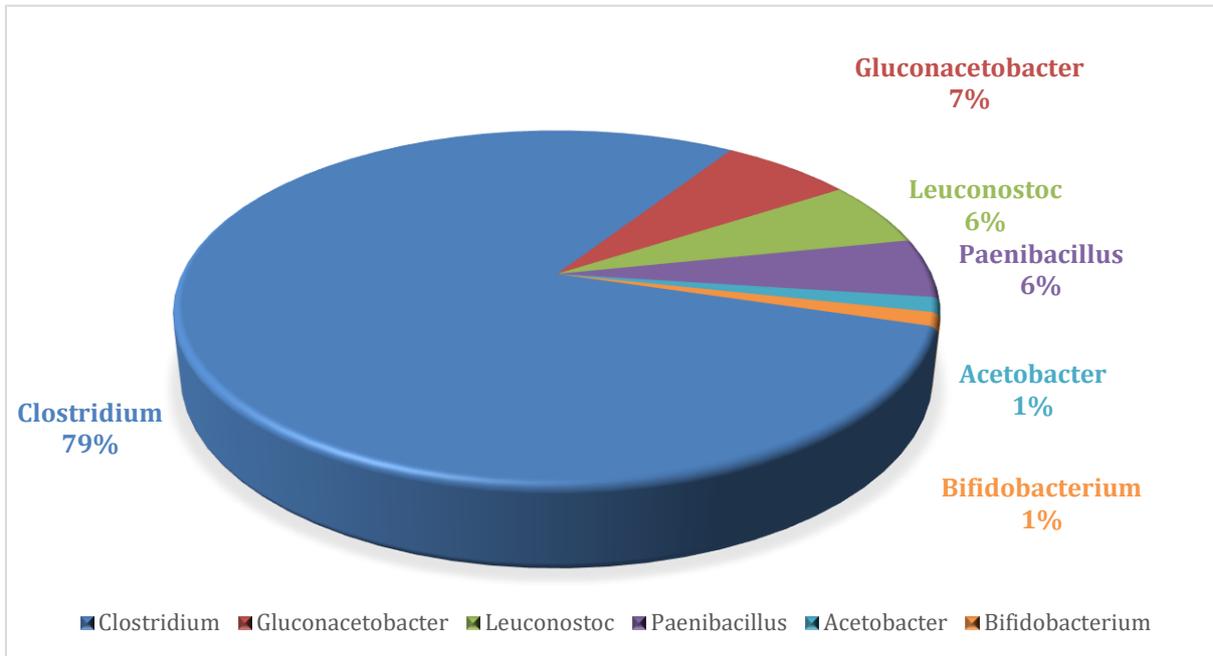


Imagen 8: Identificación bacteriana de la región V3-V4, obtenida del programa de Nanopore Technologies con una abundancia de 1X, una cobertura de 95% y una identidad del 95%. Los porcentajes obtenidos en cada género bacteriano corresponde a los porcentajes de la abundancia relativa.

En la imagen 9 se encuentra representada la identificación bacteriana por medio del porcentaje de abundancia de cada especie presente en el ensayo realizado con amikacina (24 h) con una tasa de dilución máxima de $0.6 h^{-1}$, obteniendo el 72,00 % de *Clostridium* (verde claro), 13,00 % de *Gluconacetobacter* (anaranjado), 7,00% de *Leuconostoc* (gris), 6,00% de *Paenibacillus* (amarillo), 1,00% de *Chryseobacterium* (azulew34wd5frtsa) y 1,00% de *Acetobacter* (verde oscuro). Obtenido de la región V4-V5.

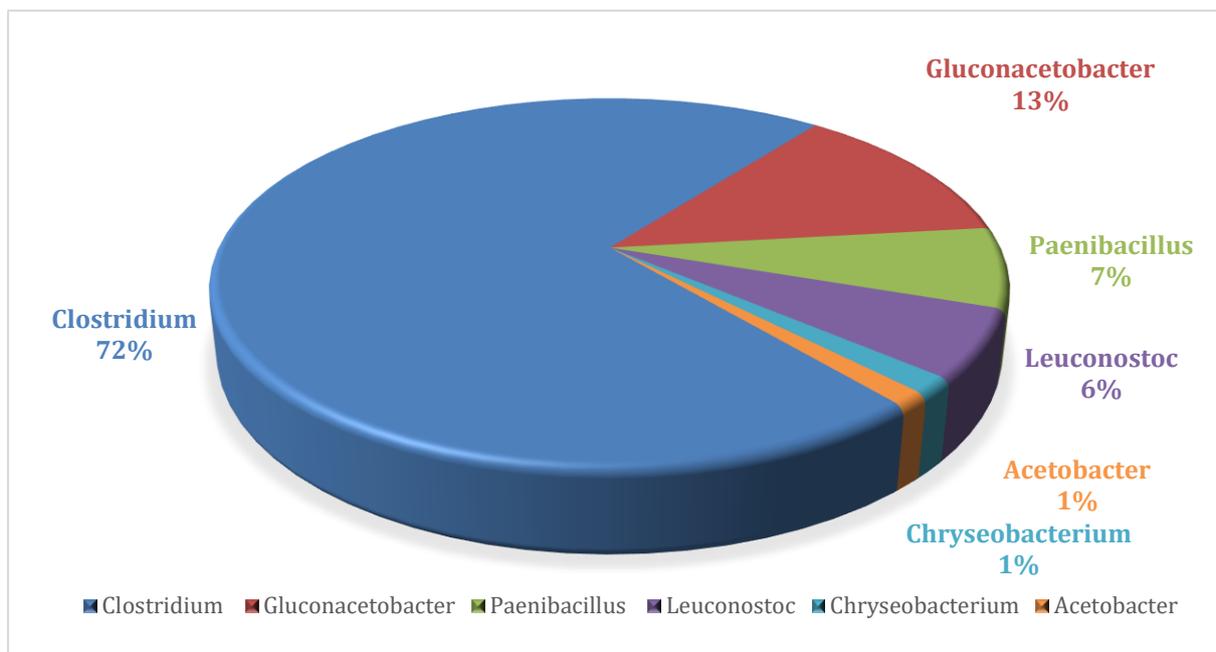


Imagen 9: Identificación bacteriana de la región V4-V5, obtenida del programa de nanopore technologies con una abundancia de 1X, una cobertura de 95% y una identidad del 95%. Los porcentajes obtenidos en cada género bacteriano corresponde a los porcentajes de la abundancia relativa.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del índice de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos señalan que a la tasa de dilución más baja ($0,075 h^{-1}$), la amikacina fue el único antibiótico que presentó resistencia bacteriana. En cambio, en las tasas media ($0,4 h^{-1}$) y máxima ($0,6 h^{-1}$), se observa que la resistencia bacteriana fue predominante ante la mayoría de los antibióticos evaluados (amikacina, amoxicilina, ceftriaxona y ampicilina), esto podría estar asociado a la presencia de diferentes comunidades bacterianas; es decir, las tasas de dilución media y máxima podrían tener comunidades bacterianas similares en comparación con la tasa de dilución mínima. Varios estudios sobre comunidades bacterianas resistentes a antibióticos en el área hospitalaria y alimenticia indican que las bacterias desarrollan varios mecanismos de acción mecanismo de acción contra los antibióticos betalactámicas, penicilinas, aminoglucósidos y cefalosporina a causa del mal uso y uso excesivo de antibióticos en la población y el área alimenticia (Capita

& Alonso-Calleja, 2013), (Felden & Cattoira, 2018), (Kelley, 2017), (Brown et al, 1990), (Risager, Petersen, et al., 2020).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el quimiostato seguido de la prueba de susceptibilidad a antibióticos, es capaz de identificar resistencia en comunidades bacterianas anaerobias resistentes a antibióticos que presentan altas velocidades específicas de crecimiento, sin necesidad de realizar subcultivos para obtener cepas puras y permitir la ejecución de una presión selectiva en el medio de cultivo para aislar a los organismos con altas tasas de crecimiento (Burnham et al., 2017); (Gelbíčová et al., 2022). Una de las ventajas de este sistema tecnológico es su bajo costo en el montaje y su fácil operación. Sin embargo, también existen desventajas en el uso de este quimiostato para la detección de bacterias resistentes a antibióticos, las mismas que son el tiempo que tarda el proceso de inoculación e incubación antes de empezar con las pruebas de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos. En el caso de la selección de los antimicrobianos se pudo vislumbrar que el uso de antibióticos sin coloración es óptimo en el proceso, estos evitan ruido en las lecturas de densidad óptica lo que hace que sea una desventaja debido a que limitaría el estudio a un solo tipo de antibióticos (Lahuatte, 2020); (Risager, Petersen, et al., 2020); (Risager, Wulff, et al., 2020).

Las bacterias anaerobias aisladas en el sistema tecnológico fueron identificadas mediante análisis moleculares realizados en la muestra de amikacina, tras realizar una secuenciación masiva de nueva generación, la misma que permitió encontrar los siguientes géneros bacterianos: *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Leuconostoc*, *Paenibacillus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium* y *Chryseobacterium*, de todos los géneros bacterianos identificados solo dos de ellos fueron anaerobios y el resto aerobio, esto sucedió debido a la contaminación ambiental que hubo dentro del sistema tecnológico; además, de que las muestras de frutas y verduras provenientes de los mercados del DMQ no fueron lavadas antes de ser molidas en el mortero para la extracción de los microorganismos de estudio. Se observó que el

género más abundante fue *Clostridium spp.* que se caracteriza por ser bacterias gram positivas, anaerobias facultativas y formadoras de esporas; además, se encuentran distribuidas en el suelo, intestino humano y animal. En este contexto, dicho género es conocido como un agente patógeno que ocasiona un sin número de enfermedades humanas y animales, por ejemplo, el tétano, el botulismo, la gangrena gaseosa y la colitis pseudomembranosa (Pahalagedara et al., 2020). Dentro de este género, dos especies destacadas son el *Clostridium botulinum* y el *Clostridium perfringens*, que se transmiten a través de alimentos (Hu et al., 2018); (Park et al., 2015). Esta correlación es coherente con los resultados de nuestro estudio, ya que las muestras analizadas provienen de frutas y verduras obtenidas en mercados del DMQ. Debido a la procedencia anteriormente mencionada, se sugiere comenzar el control del uso de antimicrobianos en los productos en el área alimenticia, ganadera, pesquera y agrícola. Se recomienda la implementación de normas regulatorias para evitar el uso desmedido de estos antimicrobianos en todas las áreas aplicables a su uso.

Finalmente, se recomienda el uso de esta metodología por su eficiencia al detectar comunidades bacterianas que presentan altas velocidades específicas de crecimiento; adicionalmente, esta tecnología puede ser implementada fácilmente en la industria gracias a su operación sencilla y montaje económico. Esta tecnología tiene un potencial de aplicación en laboratorios clínicos, centros de salud, medicina veterinaria y control de calidad en la industria alimenticia.

7. CONCLUSIONES

- El nuevo sistema tecnológico basado en un quimiostato simple de una etapa seguido del sistema de detección de susceptibilidad a antibióticos muestra ser eficiente para detectar comunidades bacterianas anaerobias con posible resistencia a antibióticos

que presentan altas velocidades específicas de crecimiento, por tanto, la hipótesis de investigación planteada se acepta.

- El análisis metagenómico realizado mediante la plataforma Nanopore de Oxford para las muestras con mayor incidencia de posible resistencia a antibióticos reveló la presencia de varios géneros bacterianos anaerobios. Entre ellos, se identificaron *Clostridium*, *Gliconacetobacter*, *Leuconostoc*, *Paenibacillus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium* y *Chryseobacterium*. Algunos de estos géneros se originan directamente de los alimentos, ya que se utilizan como probióticos, mientras que otros son conocidos como agentes patógenos responsables de enfermedades en los seres humanos.
- Los resultados obtenidos sugieren la viabilidad de esta tecnología como un método rápido, confiable y de alta sensibilidad para la detección temprana de amenazas microbiológicas en alimentos, permitiendo tomar medidas preventivas oportunas y contribuyendo a la reducción de los riesgos asociados al consumo de alimentos contaminados.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo un análisis exhaustivo de cada muestra secuenciada en el presente estudio para identificar su nivel de resistencia y determinar si se consideran agentes patógenos para los seres humanos o simplemente se utilizan como probióticos en los alimentos. Esto permitirá obtener una comprensión más completa de la diversidad bacteriana presente y su relevancia para la salud pública,

proporcionando información valiosa para futuras investigaciones y acciones dirigidas hacia la seguridad alimentaria y la prevención de enfermedades asociadas.

- Es necesario motivar al Gobierno de la República del Ecuador a implementar las normativas INEN 2587: 2013 “Mercados Saludables” en los mercados del país para disminuir la resistencia bacteriana en productos alimenticios que causen enfermedades infecciosas en los seres humanos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002). Fundamentos de Ingeniería Bioquímica (Ediciones). file:///C:/Users/UserPc/Downloads/acevedo-fundamentos-deingenieria-bioquimica_compress.pdf

Ahmed, M. (2019). The investigation of molecular characterization of presumptive *Listeria monocytogenes* isolates from a food-processing environment. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(1), 46–50.

Amare, A., Worku, T., Ashagirie, B., Adugna, M., Getaneh, A., & Dagneu, M. (2019). Bacteriological profile, antimicrobial susceptibility patterns of the isolates among street vended foods and hygienic practice of vendors in Gondar town, Northwest Ethiopia: A cross sectional study. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1509-4>

Applied Biological Materials Inc. (2019). D511 : Column-Pure Bacteria Genomic DNA Isolation Kit. 2414. https://www.abmgood.com/pub/media/productdocument/document/D511-Manual_print_v2.pdf

Barletta, R., Pérez, L., Castro, G., Pujol, M., Barletta, J., & Dueñas, Y. (2018). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapeutica actual.

Brown, M. R. W., Collier, P. J., & Gilbert, P. (1990). Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), 1623. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1623>

Burnham, C. A. D., Leeds, J., Nordmann, P., O'Grady, J., & Patel, J. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 697–703). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.103>

Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia Antimicrobiana : Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, 621, 757–763.

Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>

Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Felden, B., & Cattoira, V. (2018). Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02503-17/ASSET/A8FFB7C1-E279-4C1D-AB55-3B6E74BD7D24/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0051871640001.JPEG>

Foley, S. L., & Grant, K. (2020). Molecular Techniques of Detection and Discrimination of Foodborne Pathogens and Their Toxins. Retrieved September 27, 2022, from <https://ecam>.

Gelbíčová, T., Brodíková, K., & Karpíšková, R. (2022). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Czech retailed ready-to-eat meat products.

International Journal of Food Microbiology, 374, 109727.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109727>

Godziszewska, J., Pogorzelska-Nowicka, E., Brodowska, M., Jagura-Burdzy, G., & Wierzbicka, A. (2018a). Detection in raw cow's milk of coliform bacteria - reservoir of antibiotic resistance. *LWT*, 93, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.019>

Godziszewska, J., Pogorzelska-Nowicka, E., Brodowska, M., Jagura-Burdzy, G., & Wierzbicka, A. (2018b). Detection in raw cow's milk of coliform bacteria - a reservoir of antibiotic resistance. *LWT*, 93, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.019>

Gopalakrishnan, S., Kamalanathan, A., Rajan, S., Bhagat, V. M., & Showkath, M. (2018). Emergence of armA and rmtB GENES AMONG VIM, NDM, and IMP Metallo- β -Lactamase-producing multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 65(1), 107–118. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.027>

Hu, W. S., Kim, H., & Koo, O. K. (2018). Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. *Anaerobe*, 52, 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2018.06.011>

Huttner, A., Bielicki, J., Clements, M. N., Frimodt-Møller, N., Muller, A. E., Paccaud, J. P., & Mouton, J. W. (2020). Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(7), 871–879. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.11.028>

Huynh, B., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T., Kerleguer, A., Hennart, M., Lauzanne, A. De, Herindrainy, P., Seck, A., Bercion, R., Borand, L., Pardos de la 34 Gandara, M., Delarocque, E., Guillemot, D., Vray, M., Garin, B., Collard, J., Rodrigues, C., & Brisse, S. (2020). *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance,

genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes*, 11(5), 1287–1299.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1748257>

Jim O'Neill. (14 de 05 de 2016). *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS*. Obtenido de THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*. 2019;43:e65. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>

Kelley, S. O. (2017). New Technologies for Rapid Bacterial Identification and Antibiotic Resistance Profiling. In *SLAS Technology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 113–121). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/2211068216680207>

Kümmerer, K. (2011). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere*, 45(6–7), 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8)

LAHUATTE, D. (11 de 08 de 2022). Evaluación de una tecnología para la detección de comunidades bacterianas aerobias con multiresistencia a antibióticos a diferentes velocidades específicas de crecimiento. Obtenido de <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4848/1/Lahuatte%20Imbaquingo%20Doris%20Alejandra%20.pdf>

Mei, S., Zhao, M., Liu, Y., Zhao, C., Xu, H., Fang, Y., & Zhu, B. (2022). Evaluations and comparisons of microbial diversities in four types of body fluids based on two 16S rRNA gene sequencing methods. *Forensic Science International*, 331, 111128.
<https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2021.111128>

Ministerio de Salud Pública. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador. In Ministerio de Salud Pública (Vol. 2, Issue 1). https://www.salud.gob.ec/wpcontent/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

OMS. (2015). Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. Pahalagedara, A. S. N. W., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., & Gupta, T. B. (2020).

Pahalagedara, A. S. N. W., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., & Gupta, T. B. (2020). 36 Antimicrobial production by strictly anaerobic *Clostridium* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105910. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.105910>

Pérez-Cano Atzín Robles-Contreras Autor para correspondencia Héctor Javier Pérez-Cano, H. (n.d.). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. www.revistamedicamd.com

Park, J. Y., Kim, S., Oh, J. Y., Kim, H. R., Jang, I., Lee, H. S., & Kwon, Y. K. (2015). Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. *Poultry Science*, 94(6), 1158–1164. <https://doi.org/10.3382/PS/PEV037>

Rahman, M., Alam, M.-U., Khan Luies, S., Kamal, A., Ferdous, S., Lin, A., Sharior, F., Khan, R., Rahman, Z., Masud Parvez, S., Amin, N., Hasan, R., Tilahun Tadesse, B., Taneja, N., Aminul Islam, M., & Ercumen, A. (2021). Contamination of Fresh Produce with Antibiotic-Resistant Bacteria and Associated Risks to Human Health: A Scoping Review. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010360>

Rajeev, M., Sushmitha, T. J., Toleti, S. R., & Pandian, S. K. (2020). Sediment-associated bacterial community and predictive functionalities are influenced by choice of 16S ribosomal RNA hypervariable region(s): An amplicon-based diversity study. *Genomics*, 112(6), 4968–4979. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.006>

Ramirez-Hernandez, Bugarel, M., Kumar, S., Thippareddi, H., Brashears, M., & Sanchez, M. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and parts collected at different stages during processing. *Journal of Food Protection*, 82(10), 1793– 1801. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-056>

Ramon-Pardo, P., Sati, H., & Galas, M. (2018). Enfoque de una salud en las acciones para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos desde una óptica latinoamericana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(1), 103–109. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2018.351.3605>

Ramirez-Hernandez, Bugarel, M., Kumar, S., Thippareddi, H., Brashears, M., & Sanchez, M. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and parts collected at different stages during processing. *Journal of Food Protection*, 82(10), 1793– 1801. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-056>

Risager, N., Petersen, N., & Sonnenschein, N. (2020). Single-Cell Technologies to Understand the Mechanisms of Cellular Adaptation in Chemostats. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579841>

Risager, N., Wulff, T., Palmqvist, E. A., Jørgensen, T. R., Workman, C. T., Sonnenschein, N., Rønne, N. P., & Herrgård, M. J. (2020). Fluctuations in glucose availability prevent global proteome changes and physiological transition during prolonged chemostat cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(7), 2074–2088. <https://doi.org/10.1002/bit.27353>

Risager, N., Wulff, T., Palmqvist, E. A., Jørgensen, T. R., Workman, C. T., Sonnenschein, N., Rønne, N. P., & Herrgård, M. J. (2020). Fluctuations in glucose availability prevent global proteome changes and physiological transition during prolonged

chemostat cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(7), 2074–2088. <https://doi.org/10.1002/bit.27353> Rodríguez, R. (2013). *Vademécum Académico de Medicamentos*. In *Vademécum Académico de medicamentos (Sexta)*. Mc Graw Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1552>

Rodríguez-Lázaro, & Hernández. (2020). MOLECULAR METHODOLOGY IN FOOD MICROBIOLOGY DIAGNOSTICS: TRENDS AND CURRENT CHALLENGES. <https://doi.org/10.1051/IUFoST:20060643>

Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Índices de resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos en Santo Domingo, Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1). <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i1.144>

Ruiz-Roldán, L., Martínez-Puchol, S., Gomes, C., Palma, N., Riveros, M., Ocampo, K., Durand, D., Ochoa, T. J., Ruiz, J., & Pons, M. J. (2018). Presencia de Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(3), 425–432. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2018.353.3737>

Sharma, N., Singh, K., Toor, D., Pai, S. S., Chakraborty, R., & Khan, K. M. (n.d.). Antibiotic Resistance in Microbes from Street Fruit Drinks and Hygiene Behavior of the Vendors in Delhi, India. *International Journal of Environmental Research and Public Health* Article. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134829>

Sharifzadeh Peyvasti, V., Mohabati Mobarez, A., Shahcheraghi, F., Khoramabadi, N., Razaz Rahmati, N., & Hosseini Doust, R. (2020). High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among 38 *Enterococcus* spp. clinical isolates in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 318–323. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.08.00>

Serra Valdés, Miguel Ángel. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. Recuperado en 23 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es.

Tonoyan, L., Fleming, G. T. A., Friel, R., & O'Flaherty, V. (2019a). Continuous culture of *Escherichia coli*, under selective pressure by a novel antimicrobial complex, does not result in development of resistance. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38925-9>

Xu, F., Wang, J., Guo, Y., Fu, P., Zeng, H., Li, Z., Pei, X., Liu, X., & Wang, S. (2018). Antibiotic resistance, biochemical typing, and PFGE typing of *Bifidobacterium* strains commonly used in probiotic health foods. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 467–477. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0320-6>

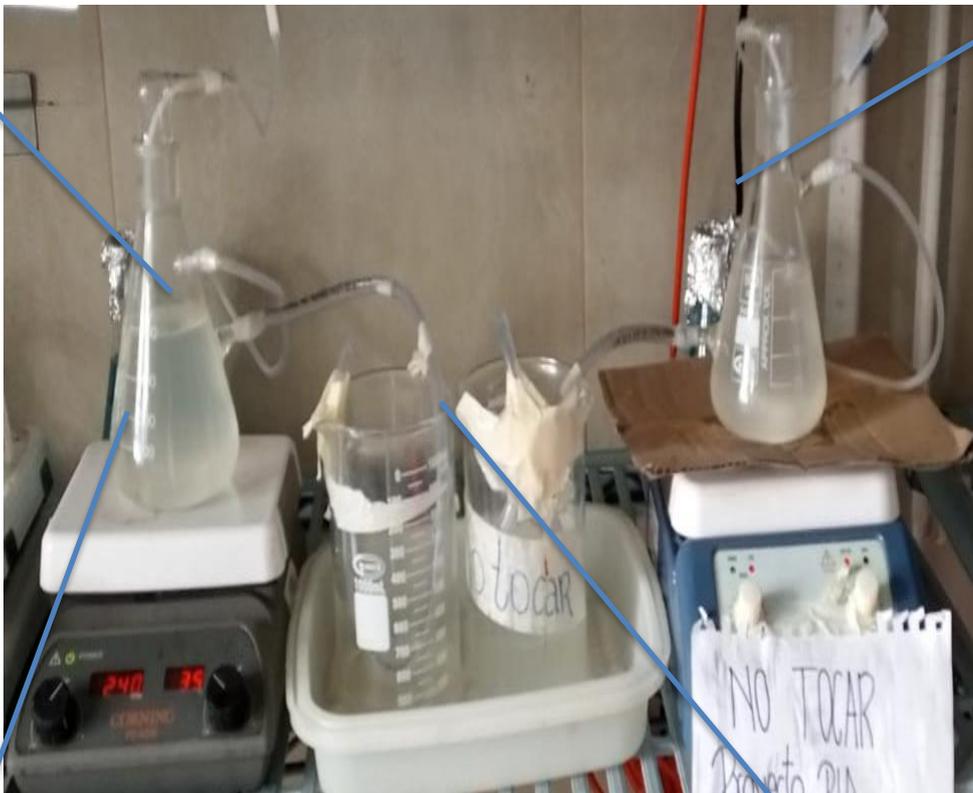
Yang, X., Wang, Y., Li, J., Chen, J., Liu, J., Tian, G., Zhao, H., Piao, D., Fan, Y., & Jiang, H. (2022). Genetic characteristics of an amikacin-resistant *Brucella abortus* strain first isolated from *Marmota himalayana*. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105402. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105402>

Zekar, F. M., Granier, S. A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., Touati, A., & Millemann, Y. (2017). From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG).

10. ANEXOS
ANEXO A

Quimiostato

Quimiostato



Plancha

Vaso de residuos

Imagen 10: Montaje y corrida del sistema tecnológico basado en un quimiostato simple.

ANEXO B

Tabla 8. Cálculo de la razón en la tasa de dilución mínima ($0,075h^{-1}$)

FLUJO MINIMO					
0.075	24 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de suceptibilidad / resistencia	Interpretación
		1.6289441	5.8662762	0.278	•
		Razón Gentamicina			
		1.23147888		0.210	•
		Razón Amikacina			
		6.017113095		1.026	***
		Razón Ceftriazona			
		5.51221001		0.940	**
		Razón Ampicilina			
	1.123203055	0.191		•	
	48 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de suceptibilidad / resistencia	Interpretación
		4.254182195	4.9066362	0.867	***
		Razón Gentamicina			
		1.457176255		0.297	•
		Razón Amikacina			
		6.017113095		1.226	***
		Razón Ceftriazona			
		5.51221001		1.123	**
		Razón Ampicilina			
1.123203055	1.123	***			

En la tabla 8 se observa el índice de susceptibilidad y resistencia bacteriana de la tasa de dilución mínima, cuya interpretación de resistencia y susceptibilidad se clasifica en 3, siendo * susceptibilidad alta, ** susceptibilidad baja y *** resistencia.

ANEXO C

Tabla 9. Cálculo de la razón de la tasa de dilución media ($0,4 h^{-1}$)

FLUJO MEDIO					
0.4	24 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de suceptibilidad / resistencia	Interpretación
		2.061147186	1.32690056	1.553	***
		Razón Gentamicina			
		3.404040404		2.565	***
		Razón Amikacina			
		6.607119314		4.979	***
		Razón Ceftriazona			
		4.135714286		3.117	***
		Razón Ampicilina			
	4.135714286	3.117		***	
	48 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de suceptibilidad / resistencia	Interpretación
		4.254182195	1.32690056	3.206	***
		Razón Gentamicina			
		1.457176255		1.098	**
		Razón Amikacina			
		6.017113095		4.535	***
		Razón Ceftriazona			
		5.51221001		4.154	***
		Razón Ampicilina			
1.123203055	0.846	*			

En la tabla 9 se observa el índice de susceptibilidad y resistencia bacteriana de la tasa de dilución media, cuya interpretación de resistencia y susceptibilidad se clasifica en 3, siendo * susceptibilidad, ** resistencia baja y *** resistencia alta.

ANEXO D

Tabla 10. Cálculo de la razón de la tasa de dilución alta ($0,6 h^{-1}$)

FLUJO MAXIMO					
0.6	24 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de susceptibilidad / resistencia	Interpretación
		4.220930233	2.70600865	1.560	***
		Razón Gentamicina			
		2.172093023		0.803	**
		Razón Amikacina			
		4.272093023		1.579	***
		Razón Ceftriazona			
		6.78372093		2.507	***
		Razón Ampicilina			
	6.78372093	2.507		***	
	48 horas	Razón Amoxicilina	Razón control	Índice de susceptibilidad / resistencia	Interpretación
		15.42325581	4.70699865	3.277	***
		Razón Gentamicina			
		12.63488372		2.684	***
		Razón Amikacina			
		4.272093023		0.908	**
		Razón Ceftriazona			
		6.78372093		1.441	***
Razón Ampicilina					
3.774418605	0.802	**			

En la tabla 10 se observa el índice de susceptibilidad y resistencia bacteriana de la tasa de dilución máxima, cuya interpretación de resistencia y susceptibilidad se clasifica en 3, siendo * susceptibilidad, ** resistencia baja y *** resistencia alta.

ANEXO E



Imagen 11: Proceso de extracción de ADN.

ANEXOS F



Imagen 12: Muestras colocadas en el termociclador

ANEXOS G

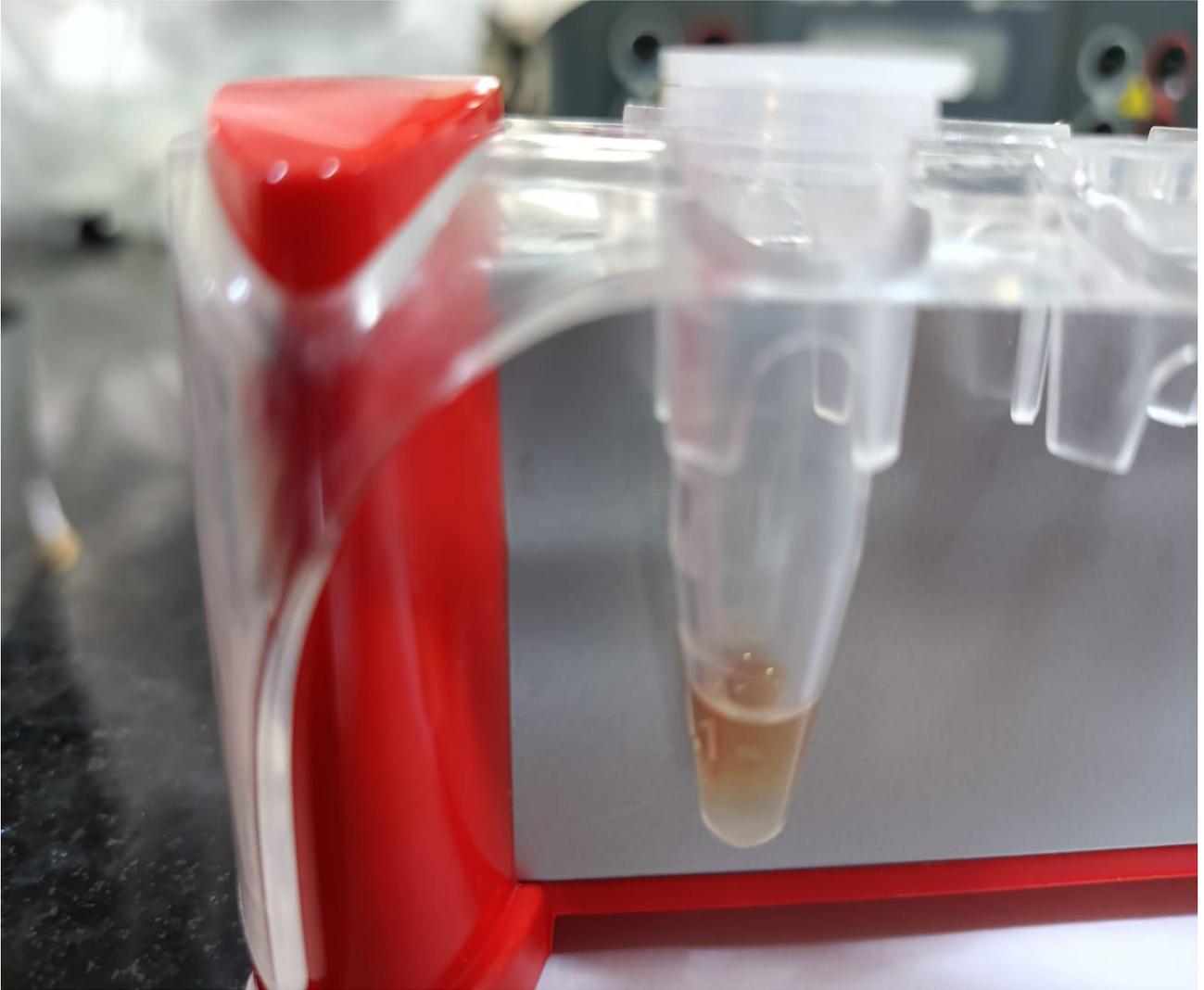


Imagen 13: Preparación de bibliotecas.

ANEXO H

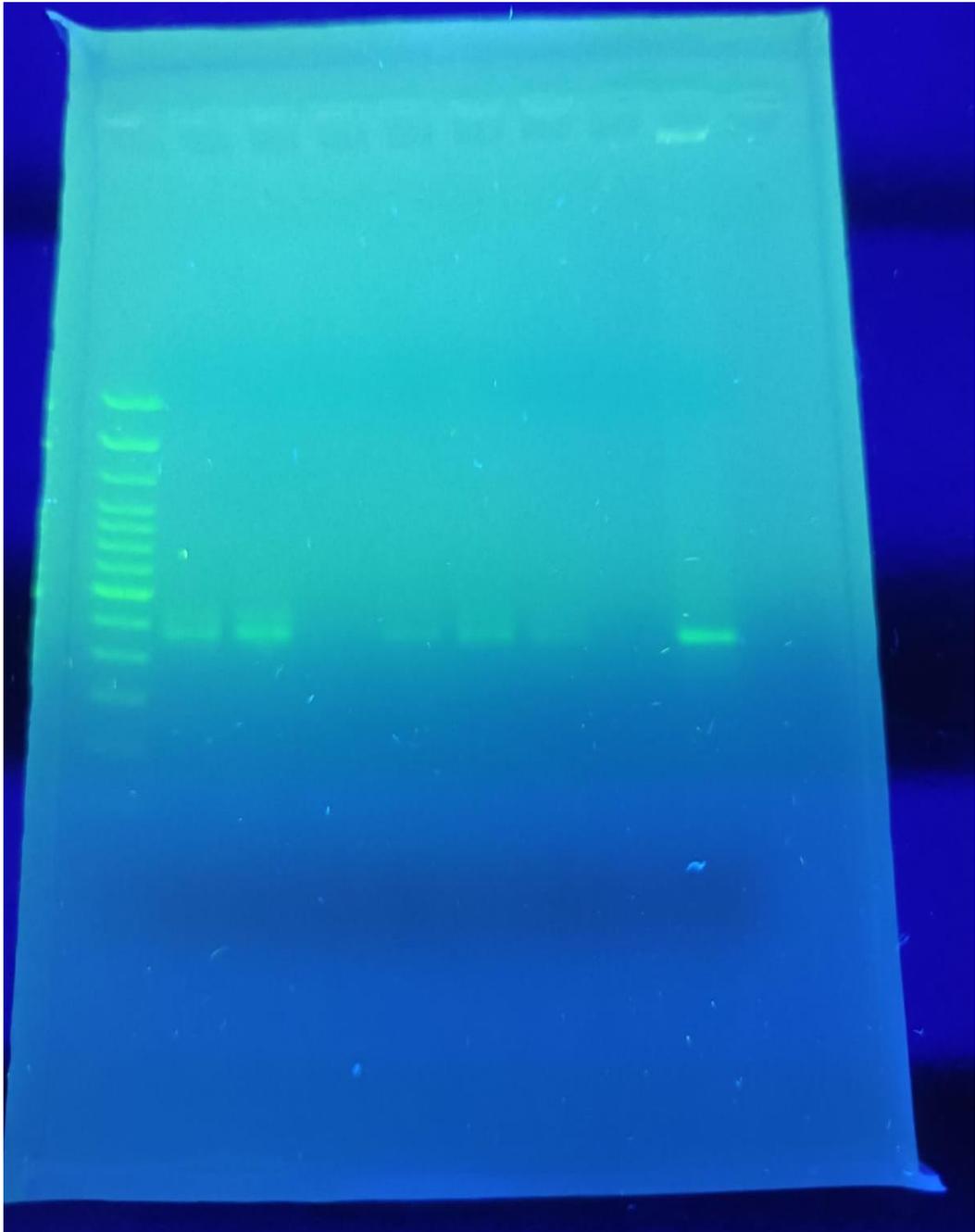


Imagen 14: Corrida de gel de electroforesis al 1.5%, de la región V3-V4.

ANEXO I

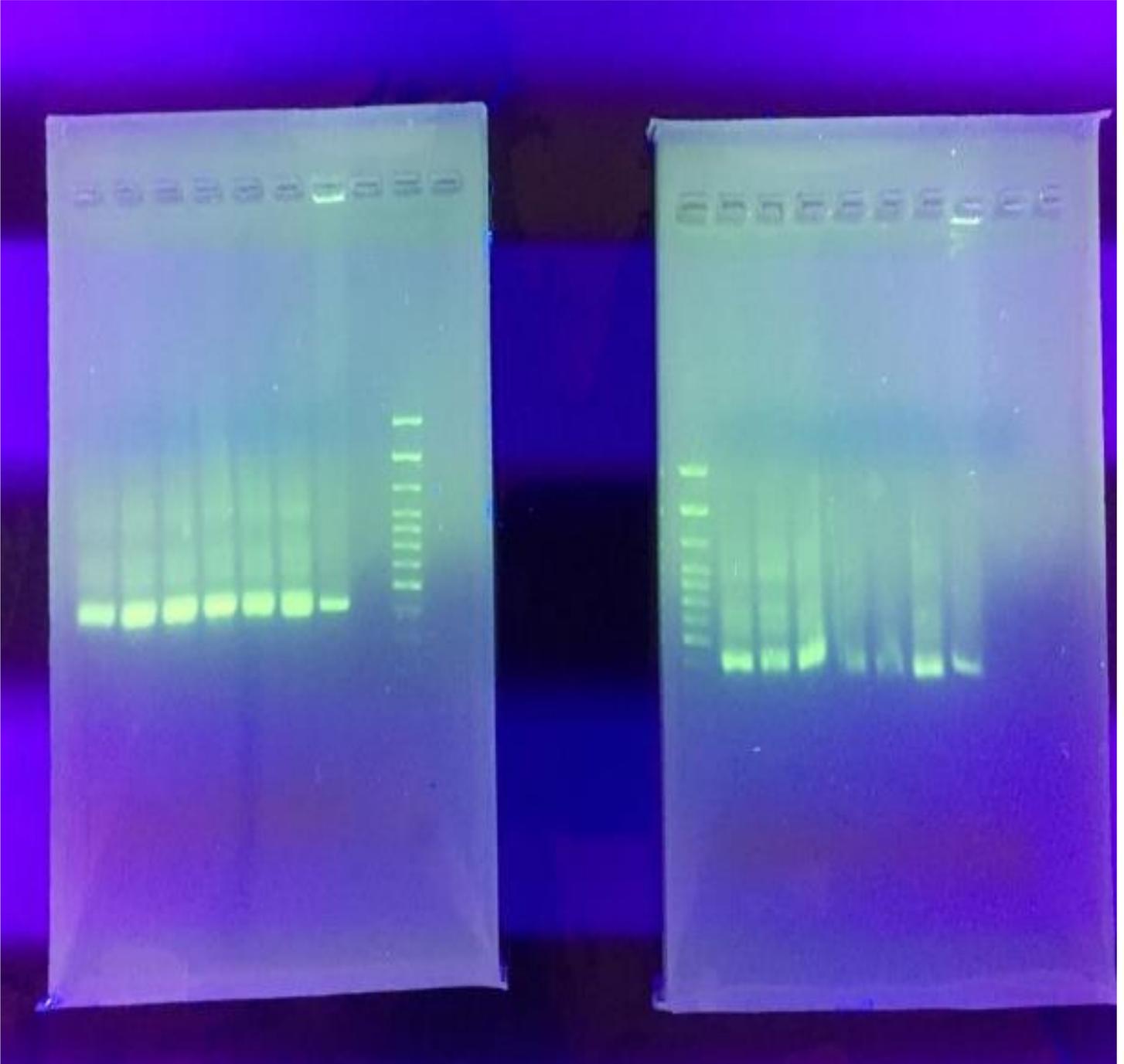


Imagen 15: Corrida de gel de electroforesis al 1.5%, de la región V4-V5

ANEXO J

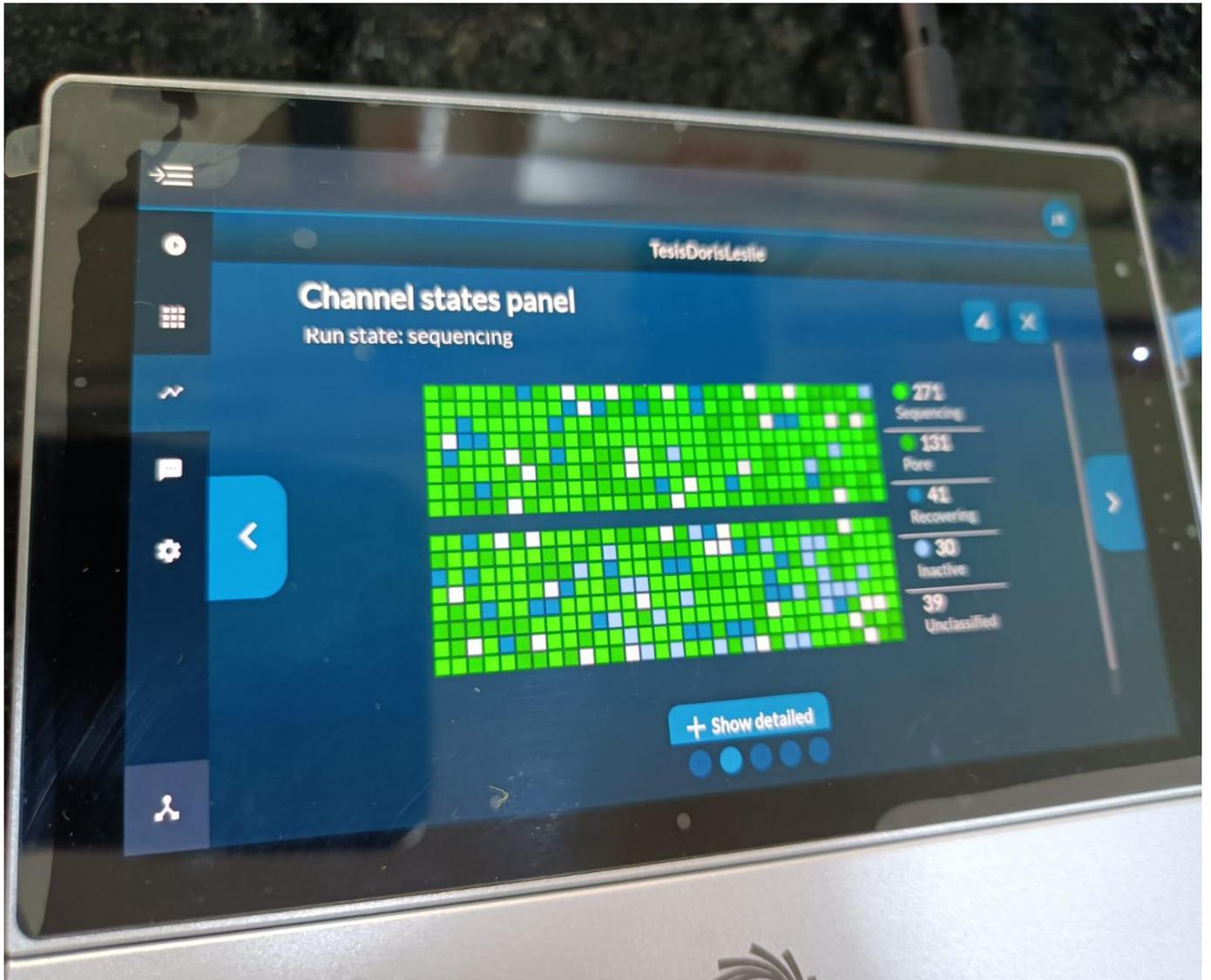


Imagen 16: Proceso de secuenciación de comunidades bacterianas en el equipo MINION DE OXFORD TECHNOLOGIES.

ANEXO K

Tabla 11. Identificación bacteriana de la región v3-v4 por medio del MINION DE OXFORD NANOPORE

TECNOLOGIES

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE LA REGIÓN V3-V4		
Nombre de la bacteria	Abundancia	Porcentaje
Clostridium	8.855	0.36
Gluconacetobacter	748	30.36
Leuconostoc	663	26.91
Paenibacillus	604	24.51
Acetobacter	152	6.17
Bifidobacterium	138	5.60
Chryseobacterium	39	1.58
Gluconobacter	30	1.22
Stenotrophomonas	13	0.53
Sphingobacterium	7	0.28
Ralstonia	7	0.28
Methylophilus	6	0.24
Asaia	5	0.20
Sphingomonas	5	0.20
Komagataeibacter	4	0.16
Rhizobium	4	0.16
Lactococcus	3	0.12
Pseudomonas	3	0.12
Dysgonomonas	3	0.12
Methylobacterium	3	0.12
Klebsiella	2	0.08
Acinetobacter	2	0.08
Enterobacter	2	0.08
Achromobacter	1	0.04
Variovorax	1	0.04
Asinibacterium	1	0.04
Brevundimonas	1	0.04
Nguyenibacter	1	0.04
Flavobacterium	1	0.04
Ochrobactrum	1	0.04
Moraxella	1	0.04
Gorillibacterium	1	0.04
Pelosinus	1	0.04
Paraburkholderia	1	0.04
Lachnoclostridium	1	0.04
total	2463.855	100

ANEXO L

Tabla 12. Identificación bacteriana de la región V4-V5 por medio del secuenciador MINION DE OXFORD

NANOPORE TECHNOLOGIES

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE LA REGIÓN V4-V5		
Nombre de la bacteria	Abundancia	Porcentaje
Clostridium	9633	70.19
Gluconacetobacter	1722	12.55
Paenibacillus	951	6.93
Leuconostoc	810	5.90
Chryseobacterium	195	1.42
Acetobacter	160	1.17
Gluconobacter	83	0.60
Stenotrophonas	53	0.39
Bifidobacterium	35	0.26
Sphingobacterium	14	0.10
Ralstonia	12	0.09
Methylophilus	8	0.06
Microbacterium	7	0.05
Asaia	6	0.04
Sphingomonas	5	0.04
Raoultella	4	0.03
Komagataeibacter	4	0.03
Variovorax	4	0.03
Gorillibacterium	3	0.02
Klebsiella	2	0.01
Yokenella	2	0.01
Sphingobium	2	0.01
Nguyenibacter	2	0.01
Lactococcus	1	0.01
Dysgonomonas	1	0.01
Asinibacterium	1	0.01
Methylorubrum	1	0.01
Bradyrhizobium	1	0.01
Cloacibacterium	1	0.01
Caulobacter	1	0.01
Pelosinus	1	0.01
Total	13725	100

ANEXO M

Tabla 13. Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V3-V4.

BACTERIAS CON MAYOR PORCENTAJE DE ABUNDANCIA DE LA REGIÓN V3-V4		
Nombre de la bacteria	Abundancia	Porcentaje
Clostridium	8855	79.35
Gluconacetobacter	748	6.70
Leuconostoc	663	5.94
Paenibacillus	604	5.41
Acetobacter	152	1.36
Bifidobacterium	138	1.24
total	11160	100

ANEXO N

Tabla 14. Bacterias con mayor porcentaje de abundancia de la región V4-V5.

BACTERIAS CON MAYOR PORCENTAJE DE ABUNDANCIA DE LA REGIÓN V4-V5		
Nombre de la bacteria	Abundancia	Porcentaje
Clostridium	9633	71.51
Gluconacetobacter	1722	12.78
Paenibacillus	951	7.06
Leuconostoc	810	6.01
Chryseobacterium	195	1.45
Acetobacter	160	1.19
Total	13471	100