



MEJORAMIENTO DEL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO  
MAYOR DE CUNDINAMARCA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE CEPAS GRAM NEGATIVAS

LAURA CAROLINA GUZMÁN ARIAS  
DIEGO ALEJANDRO MORENO MUÑOZ

**MSc. LIGIA CONSUELO  
SÁNCHEZ LEAL**  
Asesora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
INFORME FINAL  
BOGOTÁ – 2018-I

# INTRODUCCIÓN



Nuevas  
tecnologías  
moleculares Gen  
16S rRNA

Colección de  
Cultivos de  
Microorganismos  
del Programa de  
Bacteriología en  
1986



Instituto de  
Investigación de  
Recursos  
Biológicos  
"Alexander Von  
Humboldt"

Promover la mejora  
del Cepario  
Herramienta que  
fortaleció el Cepario

# OBJETIVOS



Trazabilidad: mantenimiento, conservación, cultivo, aislamiento, revalidación



Mejorar la colección de cultivos de microorganismos Gram negativos de la UCMC, mediante la identificación genotípica por técnicas moleculares



Confirmar géneros y especies, generando el registro de cepas



# ANTECEDENTES



**J. Washington**

Primeros  
ensayos  
con  
pruebas  
bioquímica  
s

**Leong y Greisen**

Estrategia  
de  
amplificaci  
ón gen  
16S

**Soumitech**

Estudio de  
regiones  
hipervariabl  
es del gen  
16S

**Caporaso**

Implementaci  
ón de nuevas  
plataformas  
de  
secuenciación

**Aquino**

Nuevas  
tecnología  
s MALDI-  
TOFF

# METODOLOGÍA



● MOLECULAR



<https://www.zymoresearch.com/>

● BIOQUÍMICO



Autores: Guzmán y Moreno 2018

● REACTIVACIÓN

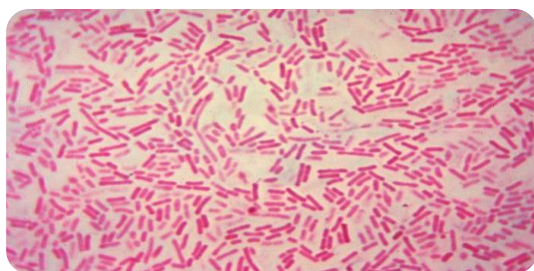


Autores: Guzmán y Moreno 2018



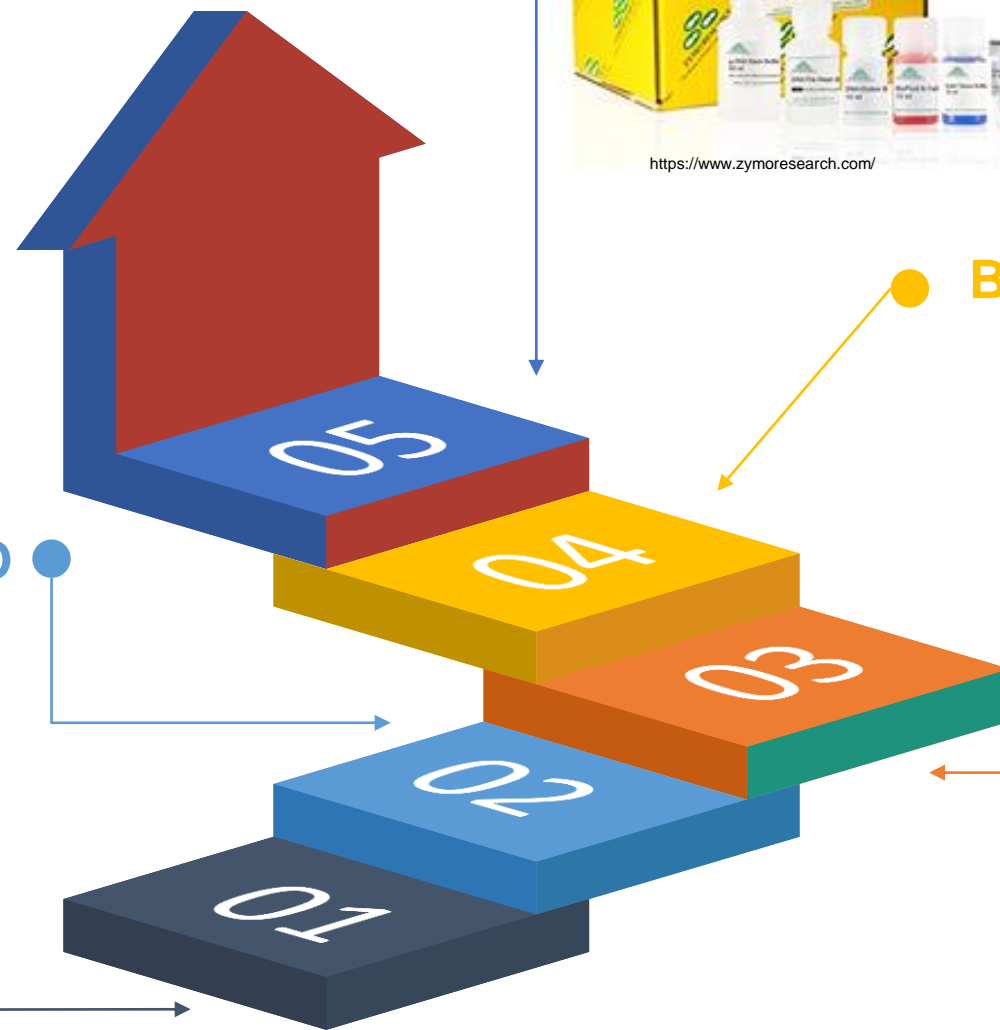
Autores: Guzmán y Moreno 2018

● MACROSCÓPICO



Autores: Guzmán y Moreno 2018

● MICROSCOPICO



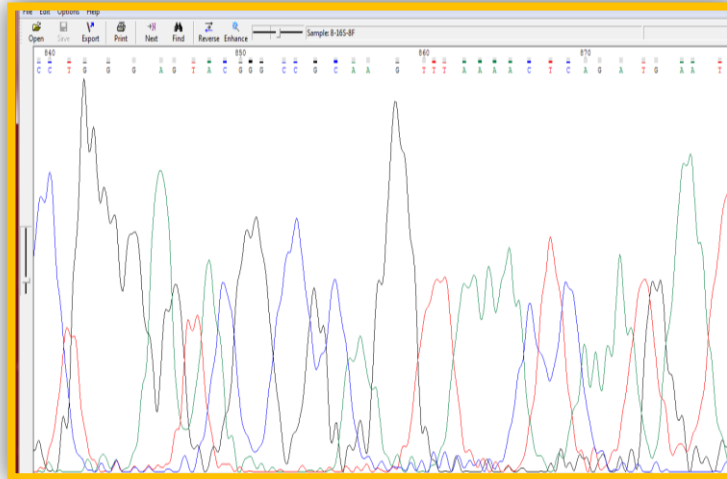
# MOLECULAR



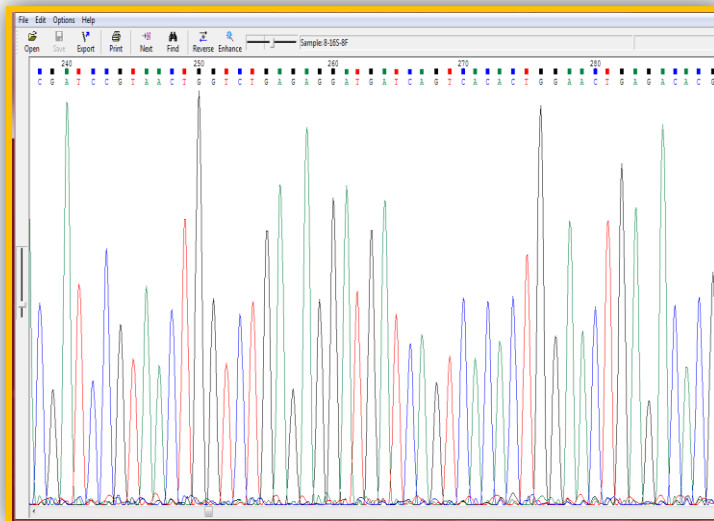
## PCR y Electroforesis

CEBADORES:  
16S-8F  
16S-1492R

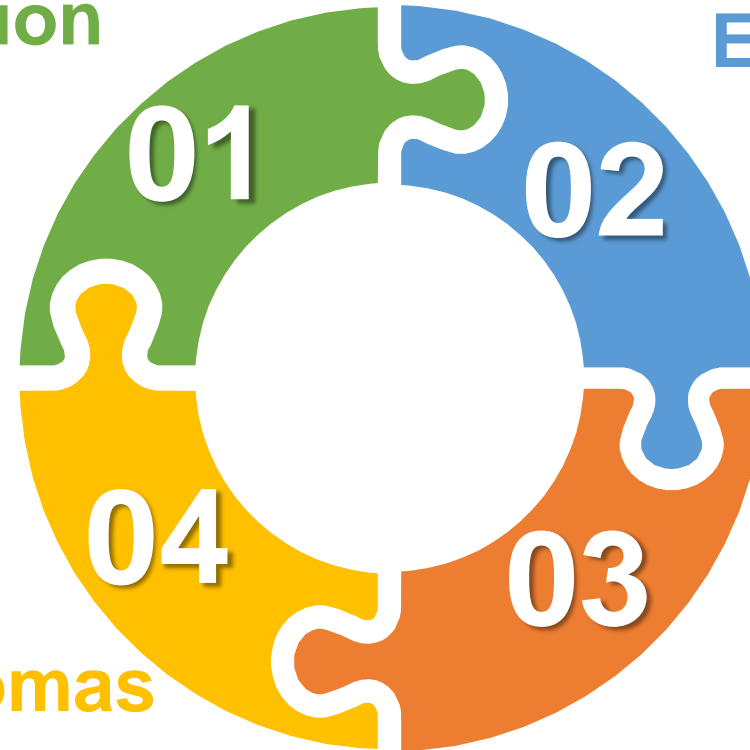
## Extracción DNA



Autores: Guzmán y Moreno 2018

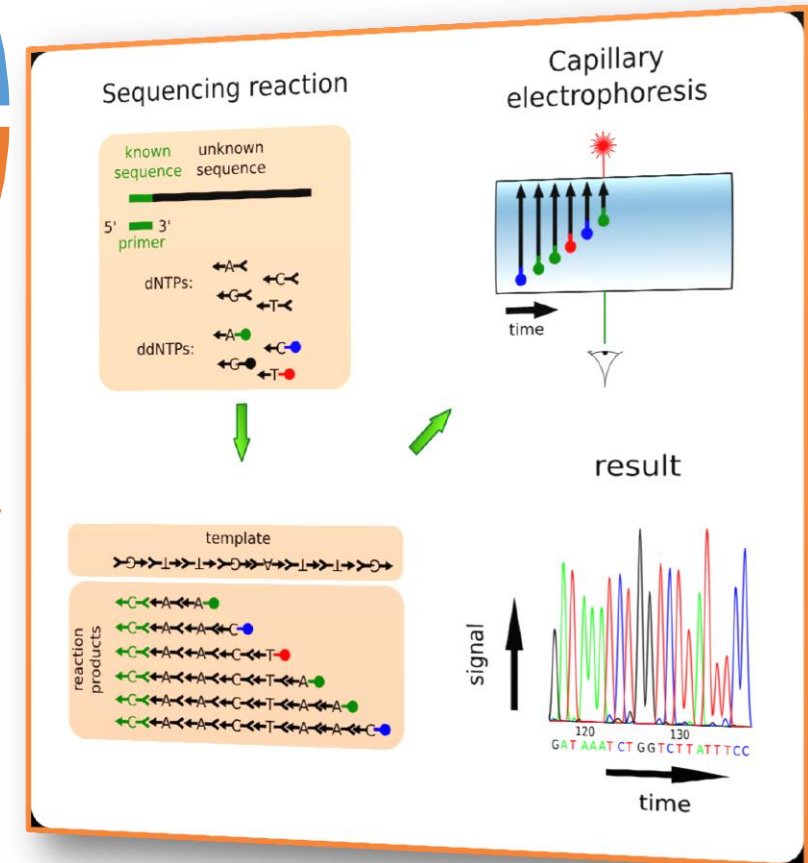


Autores: Guzmán y Moreno 2018



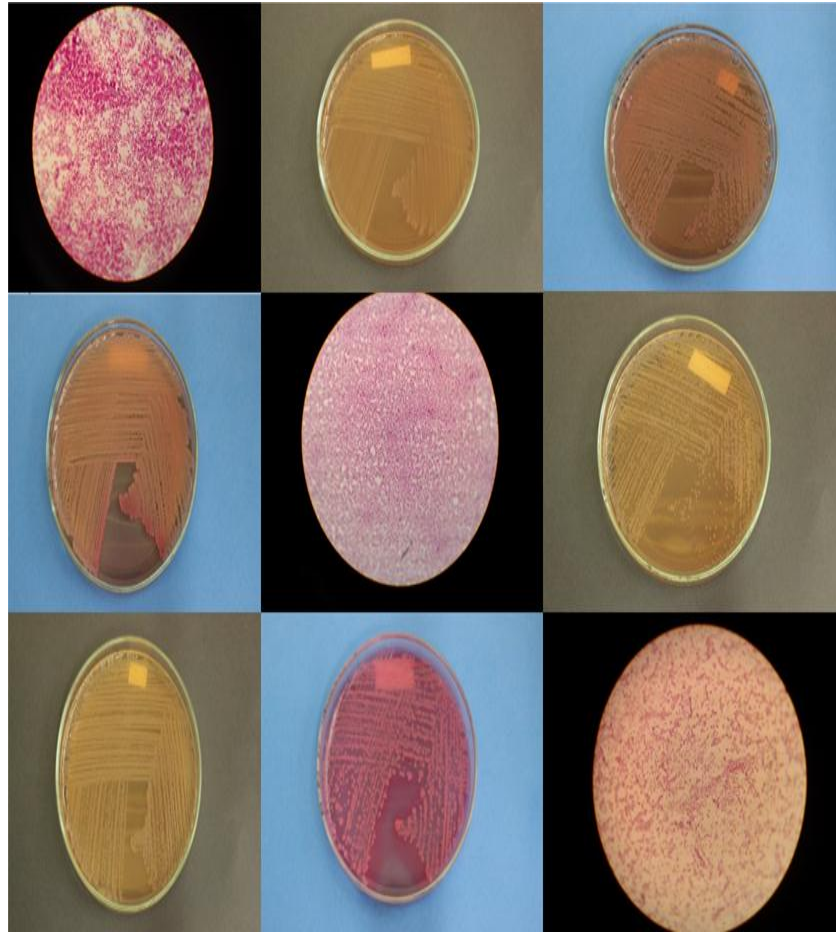
## Chromas Lite

## Sanger



Autores: Guzmán y Moreno 2018

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Agar MacConkey, Guzmán y Moreno 2018.

**Identificación fenotípica de 41 bacterias Gram negativas tanto en morfología micro como macroscópica**

Código Interno Cepario	Bacteria del Cepario	Gram	Crecimiento agar McConkey	Porcentaje de similitud sistema identificación BBL	Oxidasa	Indol
020	<i>Salmonella typhi</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.0%	Neg	Neg
021	<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.0%	Neg	Neg
028	<i>Citrobacter diversus</i>	Bacilos Negativos	Lac Positiva	99.9%	Neg	Pos
029	<i>Citrobacter koseri</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Pos
030	<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilos Negativos	Lac Positiva	99.9%	Neg	Var
032	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	99.0%	Neg	Neg
033	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	95.9%	Neg	Neg
034	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	95.6%	Neg	Neg
037	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cocobacilos Negativo	Lac Positiva	96.2%	Neg	Neg
038	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cocobacilos Negativo	Lac Positiva	99.2%	Neg	Neg

Resultados BBL Crystal, Guzmán y Moreno 2018.

**Confirmación del perfil bioquímico de las 41 bacterias en estudio con un porcentaje de aceptación del 95%**

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

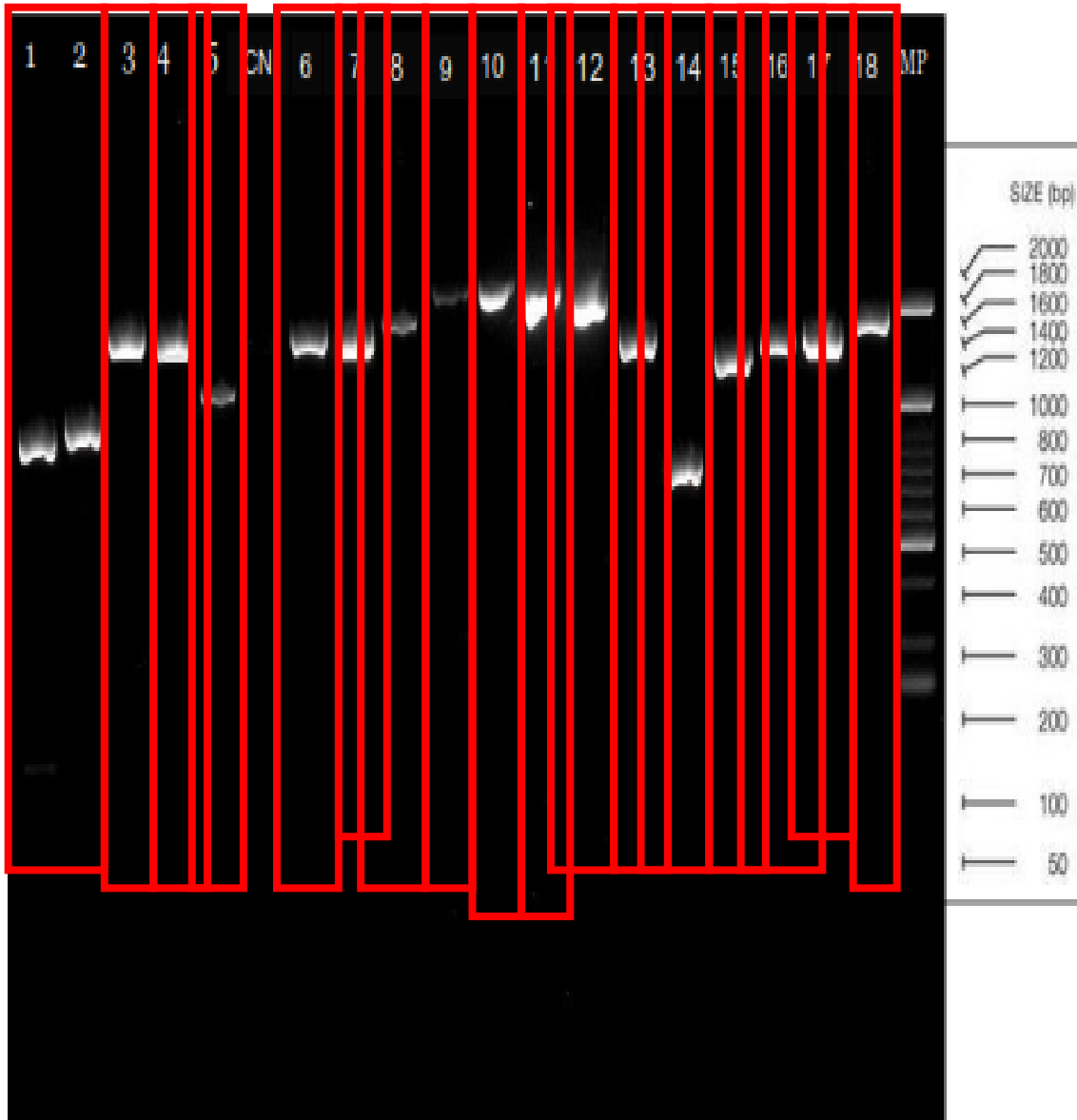


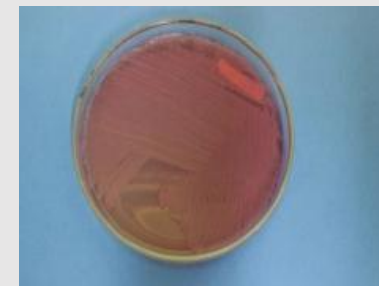
Foto electroforesis 1, Guzmán y Moreno 2018.

1	<i>E. coli nativa</i>
2	<i>E. coli polifenoles</i>
3	<i>S. flexneri</i>
4	<i>E. aerogenes</i>
5	<i>S. dysenteriae</i>
6	<i>C. koseri</i>
7	<i>E. cloacae</i>
8	<i>K. pneumoniae</i>
9	<i>P. agglomerans</i>
10	<i>C. diversus</i>
11	<i>E. gergoviae</i>
12	<i>E. coli ATCC</i>
13	<i>S. typhi</i>
14	<i>A. baumannii</i>
15	<i>S. typhimurium</i>
16	<i>C. freundii</i>
17	<i>S. sonnei</i>
18	<i>S. enteritidis</i>

**CONFIRMACIÓN DE ESPECIE**  
***A. baumannii***

*Acinetobacter seifertii*

*Complejo ACB*



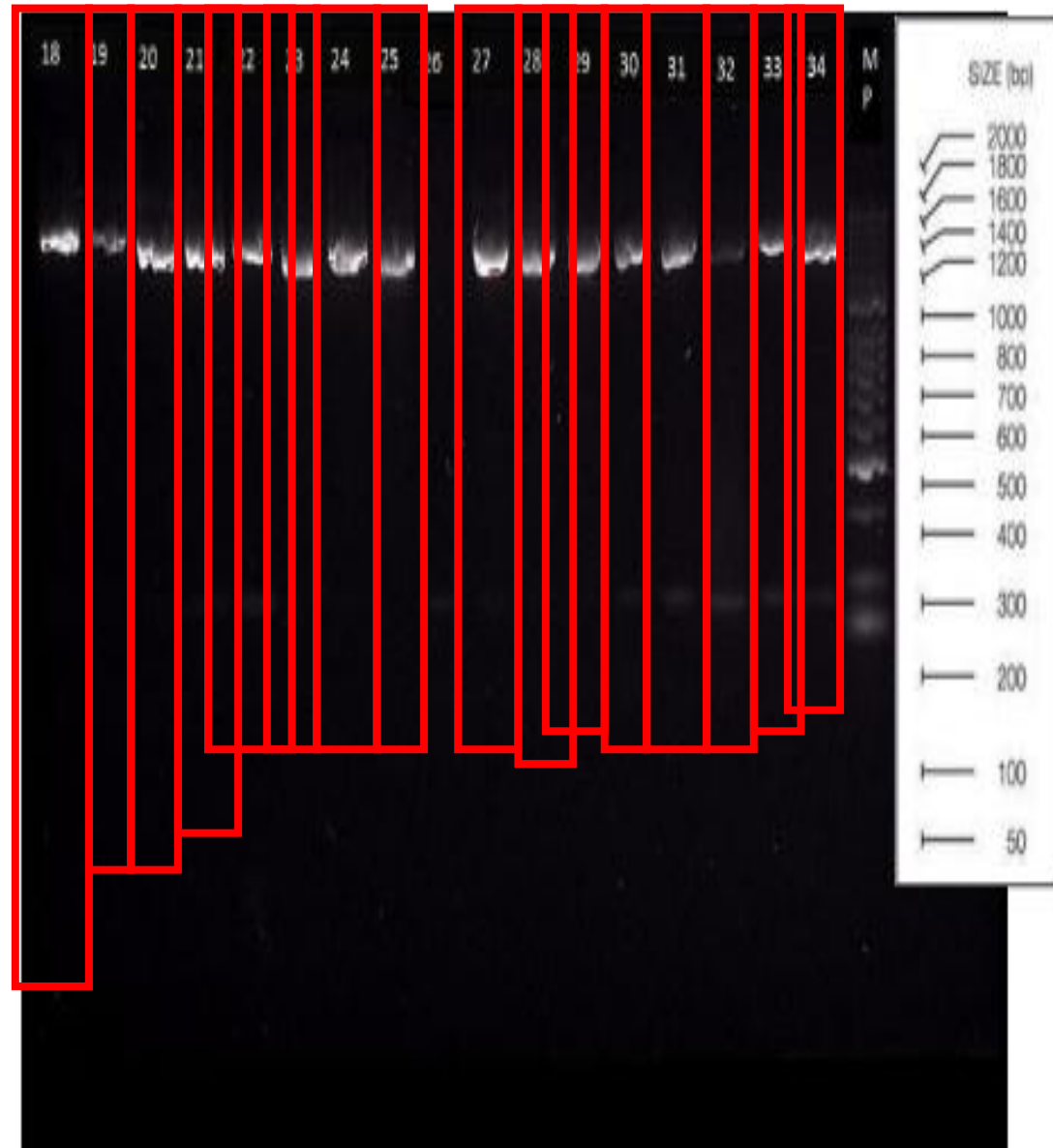
Autores Guzmán y Moreno 2018

05

**Yang (2016)**



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



POZO	BACTERIA
18	<i>K. ozaenae</i>
19	<i>K. rhinoscleromatis</i>
20	<i>K. pneumoniae</i> suelo
21	<i>S. marcescens</i>
22	<i>S. liquefaciens</i>
23	<i>P. mirabilis</i>
24	<i>P. vulgaris</i>
25	<i>P. rettgeri</i>
27	<i>H. alvei</i>
28	<i>M. morgani</i>
29	<i>Y. enterocolitica</i>
30	<i>A. hydrophila</i>
31	<i>P. putida</i>
32	<i>B. cepacea</i>
33	<i>P. fluorescens</i>
34	<i>P. aeruginosa</i> ATCC

**CONFIRMACIÓN DE ESPECIE**  
*P. fluorescens*

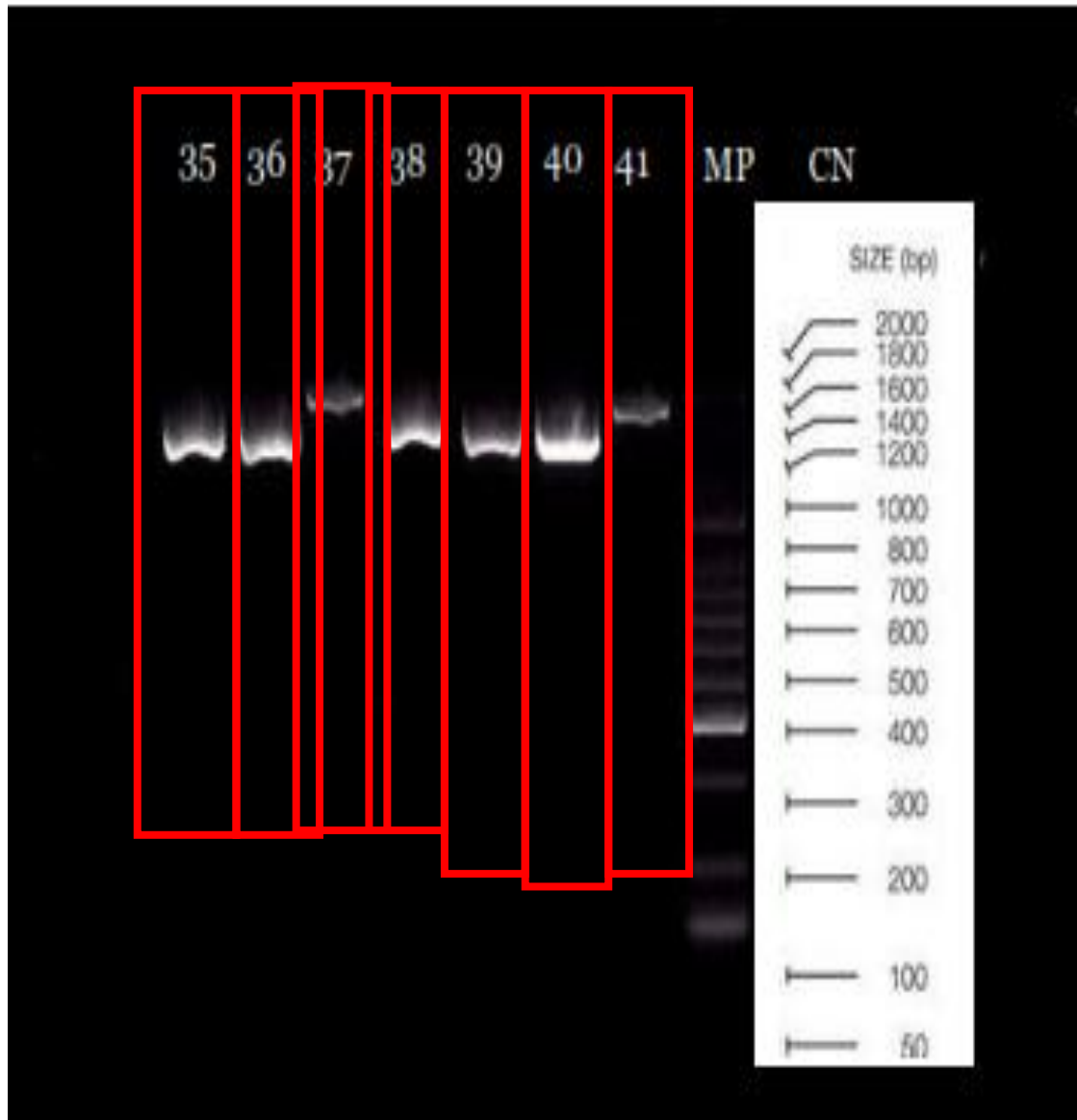
***P. aeruginosa***

Infecciones oportunistas

*Altas tasas de mutabilidad*

**07**  
***Bodilis (2012)***

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



POZO	BACTERIA
35	<i>P. aeruginosa</i> <i>ambiental</i>
36	<i>Xanthomona</i> <i>spp.</i>
37	<i>V.</i> <i>angynoliticus</i>
38	<i>V.</i> <i>metschnikovii</i>
39	<i>P. shigelloides</i>
40	<i>S. maltophilia</i>
41	<i>K. oxytoca</i>

CONFIRMACIÓN DE  
ESPECIE  
*V. alginolyticus*

*Vibrio cholerae*

MALDI-TOFF

03  
*Bunpa (2010)*

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

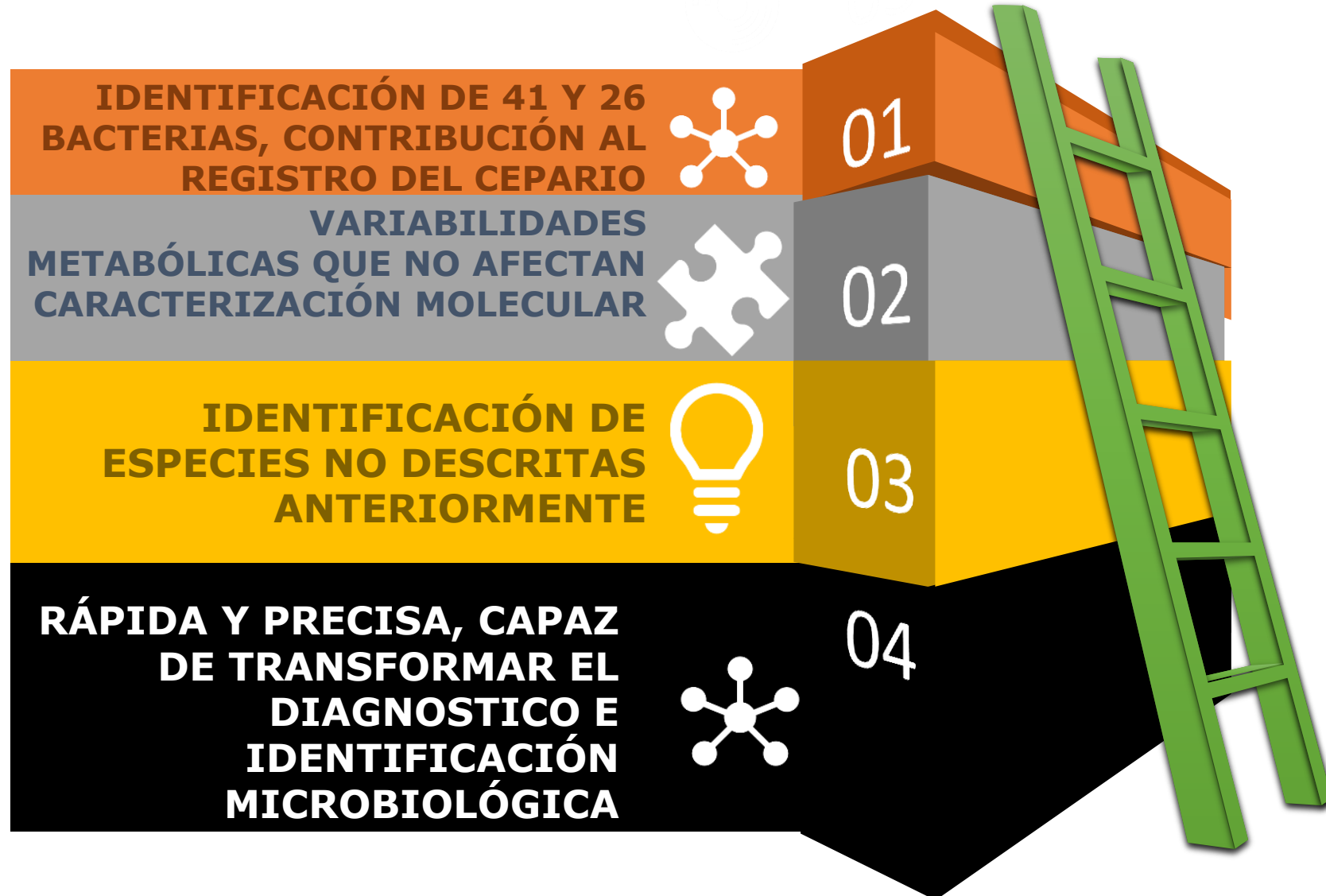


## COMPARATIVA PERFIL BIOQUIMICO Y MOLECULAR

Código	Aislamiento	Nombre de bacteria	Porcentaje identidad BBL Crystal	Bacteria reportada BBL Crystal	Dirección de la secuencia	Porcentaje de Identidad	Bacteria Reportada en Blast	Acceso Gen Bank
002	Donación secretaria de salud	<i>Escherichia coli</i> ATCC	99.7%	<i>Escherichia coli</i>	Forward	98%	<i>Escherichia coli</i> strain FORC_042 chromosome, complete genome	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP025318.1?report=genbank&amp;log\$=nucleotide&amp;blast_rank=1&amp;RID=8R4EA44301R">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP025318.1?report=genbank&amp;log\$=nucleotide&amp;blast_rank=1&amp;RID=8R4EA44301R</a>
					Reverse	98%		

Tabla comparativa pruebas fenotípicas y moleculares, Guzmán y Moreno 2018.

# CONCLUSIONES



# RECOMENDACIONES



Actualización de los registros de las cepas identificadas en este estudio

Incorporación de registros fotográficos a las hojas de vida de cada cepa bacteriana.

Realizar caracterización molecular a las 15 bacterias a las cuales se les confirmo únicamente el P. bioquímico

# AGRADECIMIENTOS

- ❑ En primer lugar, agradecemos a las doctoras Ligia Consuelo Sánchez y Martha Lucia Posada
- ❑ Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- ❑ Al grupo de investigación Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por enriquecer nuestros conocimientos y brindarnos los espacios para la realización del proceso experimental, ofreciéndonos la oportunidad de contribuir a sus investigaciones.
- ❑ Finalmente, nuestros más sinceros agradecimientos a nuestras familias, amigos y todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este proyecto.



# BIBLIOGRAFÍA

- M. de la Rosa, J. Prieto, J. Navarro. Microbiología en ciencias de la salud, conceptos y aplicaciones, Vol 10, 3ra ed, Elsevier. España, Barcelona, 2011, Cap.13. Pag. 141.
- L. Eguiarte, A.Aguirre, J. Barbolla, E. Aguirre, Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución, [Internet], TIPVolume 16, Issue 1, 2013, [Citado 2 Feb de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X13720771>
- G.YooaYong, O. LeeaTae, J. Jun, G. Dingc, Variable effects of biochar application to soils on nitrification-mediated N2O emissions, [Internet], Science of The Total Environment Volume 626, 1 June 2018, [Citado 7 Ene de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718301189?via%3Dihub>
- J. Ortíz, E. Escalante, R.Fócil, H. Ramíreze I. Díaz, Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con Hidrocarburos, [Internet], Rev. Int. Contam. Ambie. 33 (2) 237-246, 2017, [Citado 2 May de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v33n2/0188-4999-rica-33-02-00247.pdf>
- E. Jami, C. Acosta, Evaluación de bioaerosoles asociados en el sitio de desposición final de residuos sólidos en la Empresa Pública de Aseo y Gestión Ambiental del cantón Latacunga (EPAGAL. abr-2017).[Internet], Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.[Citado 14 Ene de 2018].Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25304/1/BQ%20119.pdf>
- N. Arenas, A. Gutiérrez, L. Salazar, J. Polanco, A. Gómez, Construction of a molecular phylogeny for klebsiella and Raoultella SPbased on rRNA 16S and RNA polimarase subunit genes, [Internet], Rev. Cienc. Salud vol.7 no.2 Bogotá May. 2009,[Citado 13 de Mar de 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-72732009000200004](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200004)
- S. Bunpa, M. Nishibuchi, J. Thawonsuwan, N.Sermwittayawong, Genetic heterogeneity among Vibrio alginolyticus strains and design of a PCR-based identification method using gyrB gene sequence, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, [Internet], 2010, [Citado 22 Abr de 2018]. Disponible en: <http://sci-hub.tw/http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/cjm-2017-0269>
- Y. Yang, J. Wang, Y. Fu, Z. Ruan, Y. Yu, *Acinetobacter seifertii* Isolated from China, Medicine (Baltimore), [Internet], 2016, [Citado 21 Abr de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782885/>



# BIBLIOGRAFÍA

- S.Huang, P.Sheng, H.Zhang, Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Holotrichia parallela Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae), Int J Mol Sci. [Internet], 2012; 13(3): 2563–2577, [Citado 9 May de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317674/>
- Koneman, Diagnostico Microbiologico, Texto y Atlas a color, 6 edición, panamericana, [Internet], 2015, Pág. 255, [Citado 4 May de 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA255&lpg=PA255&dq=relacion+genetica+en+tre+serratia+liquefaciens+e+serratia+marcescens&source=bl&ots=5PHh-06Tox&sig=gQopoYfydjyVazPWDS5RKn5EWe4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjqqJrUk-jaAhXiuFkKHfZVBGUQ6AEIZjAG#v=onepage&q=relacion%20genetica%20entre%20serratia%20liquefaciens%20e%20serratia%20marcescens&f=false>
- L. Lavalett, M. Margot, N. Muñoz, J. Moreno, N. Cardona, Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de Salmonella entérica, [Internet], Biomédica vol.29 no.2, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, Bogotá Apr./June 2009, [Citado 4 Ene de 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572009000200009&script=sci\\_arttext&tIng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572009000200009&script=sci_arttext&tIng=en)
- J. Bodilis, S. Nsigue, L. Besaury, L. Quillet, Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in Pseudomonas, Plos One, [Internet], Published: April 24, 2012, [Citado 19 Abr de 2018]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035647>
- A.Narciso, W. Martins, R. Cayô, A. Pereira, S. Santos, P. Ramos, A.Gales, Detection of OXA-58-producing Acinetobacter seifertii recovered from black-necked swan at a Zoo Lake, American Society for Microbiology, [Internet], 2017, [Citado 8 Ene de 2018]. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/early/2017/09/19/AAC.01360-17?related-urls=yes&legid=aac;AAC.01360-17v1>
- Bosshard, PP, S. Abels, R. Zbinden, EC Bottger y M. Altwegg, Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-negative rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). J. Clin. Microbiol. 2003, [Citado 19 Feb de 2018]. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/41/9/4134.full>