

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

Caracterización de las comunidades microbianas aerobias que habitan en las heces fecales de las iguanas verdes (*Iguana iguana*) y evaluación de la capacidad celulolítica de los aislados.

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

#### **Biólogo**

Presentado por:

Joseph Alberto Berruz Chungata

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019 - 2020

## DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mis padres por el ímpetu diario hacia mi formación integral y profesional. A mis hermanos por sus opiniones ecuanímes en mi formación académica. A mis sobrinos dotándome de tolerancia, entendimiento y hacerme sentir tan especial como yo a ellos. A mi cuñada por su carisma, amor, energía, guía y llenarme de ideales.

A mi Moya, le debo tanto y tengo tan poco, la amo mi madrecita. Joffre y Dustin por darme toda su amistad, hermandad y dotarme de todas sus fortalezas, virtudes y complacencia desde la infancia, son el resumen de mi personalidad. Kevin, mi nigga, por proveerme de su inteligencia, actitud y aptitud, predisposición, humildad, destreza y sapiencia, se merecen esto y mucho más.

Adres, Sebastián y Mateo, esto es por ustedes.

# AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a:

- Christian Romero PhD, por ser pionero en la asignatura de microbiología, profeso y tutor a la vez. Su paciencia y predisposición a la excelencia personal y colectiva es ejemplo a seguir.
- Doctores, Marynes y Félix, por guiarme y formarme en esta última etapa de mi carrera profesional
- Blgo. Kevin Mindiola y Adriana Borja en su predisposición y colaboración en la realización de este proyecto.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Joseph Alberto Berruz Chungata* doy mi consentimiento para que la ESPOC realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

---

Joseph Alberto Berruz Chungata

# EVALUADORES

---

**Diego Arturo Gallardo Polit, Msc.**

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**Christian Abraham Romero Bonifaz, PhD.**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La iguana verde, *Iguana iguana*, es uno de los reptiles icónicos de la urbe, sin embargo, se desconocen muchos aspectos de su ecología, del número de poblaciones que habitan en la región, del número de individuos que conforman cada población y de la diversidad filogenética de su microbiota intestinal. Estudios previos sugieren que este reptil pertenece al grupo de Reptiles Asociados a Salmonelosis (RAS), lo que implica que su tracto intestinal es posiblemente un hospedero natural de *Salmonella*, convirtiéndolo en un posible vector de transmisiones de enfermedades zoonóticas y entero patógenas a los humanos que mantienen contacto directo e indirecto con este reptil. Para descartar la presencia de esta bacteria patógena, fue necesario caracterizar la microbiota que habita en las heces fecales de las iguanas verdes utilizando métodos microbiológicos, bioquímicos y de machine learning. Seis muestras de heces fecales fueron colectadas en envases estériles, las heces fueron posteriormente sembradas por 24h a 37°C en medios de cultivo sólidos (generales y selectivos) y líquidos. Se aislaron 6 cepas bacterianas, las cuales fueron purificadas e identificadas mediante pruebas bioquímicas: IMVIC, TSI y LIA. Para detectar la presencia de *Salmonella* se enriquecieron las muestras de heces en agua peptonada y posteriormente en RPV, las muestras fueron incubadas por 48 h a 42°C, transcurrido este tiempo, las muestras que crecieron en RPV fueron sembradas en agar XLD por 24h a 37°C. En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *Salmonella*. La capacidad celulolítica de las bacterias que habitan en las heces fecales fue determinada cualitativamente en agar nutritivo suplementado con 1% de CMC, una cepa promisorio fue aislada y sembrada en medio selectivo CRC. La determinación cuantitativa de celulasas fue realizada por triplicado en tubos de ensayo que contenían 5 mL del medio selectivo líquido CRC, los tubos fueron incubados por 96h a 37°C, la medición de las celulasas liberadas se la realizó por espectrofotometría a las 48, 72 y 96 h utilizando el método de cuantificación de azúcares reductores por DNS. Se determinó que la capacidad celulolítica de la bacteria promisorio fue 17% menor que la del control positivo.

**Palabras Clave:** *Iguana iguana*, capacidad celulolítica, *Salmonella*, micrografías.

## **ABSTRACT**

*The green iguana, Iguana iguana, is one of the iconic reptiles of the city; however, many aspects of its ecology are unknown including the number of populations that inhabit the region, the number of individuals that conform each population and the phylogenetic diversity of their intestinal microbiota. Previous studies suggested that this reptile belongs to the group of Reptiles Associated with Salmonellosis (RAS), which implies that its intestinal tract may be the natural host of Salmonella, thus, green iguanas are considered as a possible transmission vector of zoonotic and enteropathogenic diseases especially to humans that maintain close contact with this reptile. In order to dismiss the presence of this pathogenic bacterium, it was necessary to characterize the microbiota that inhabits the feces of green iguanas using microbiological, biochemical and machine learning approaches. Stool samples of 6 iguanas were collected in sterile containers, the feces samples were subsequently seeded for 24 h at 37°C in solid (general and selective) and liquid culture media. Six bacterial strains were isolated, purified and tentatively identified by the following biochemical tests: IMVIC, TSI and LIA. To detect the presence of Salmonella, the stool samples were enriched in peptone water and subsequently in RPV, the samples were incubated for 48 h at 42°C, then the samples that exhibited an abundant growth in RPV were seeded on XLD agar for 24 h at 37°C. The presence of Salmonella was not detected in any of the analyzed samples. The cellulolytic capacity of the bacteria that inhabit the feces was qualitatively determined in nutrient agar supplemented with 1% of CMC, a promising strain was isolated to be grown in selective CRC medium. The quantitative determination of cellulases was carried out in triplicate using test tubes containing 5 mL of the liquid selective medium CRC, the tubes were incubated for 96 h at 37°C, and the measurement of the released cellulases was performed by spectrophotometry at 48, 72 and 96 h using the method of quantification of reducing sugars by DNS. It was determined that the cellulolytic capacity of the promising bacterium was 17% lower than the positive control.*

*Keywords: Iguana iguana, cellulolytic capacity, Salmonella, micrographs.*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS .....	IV
SIMBOLOGÍA .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
CAPÍTULO 1 .....	9
1.    Introducción .....	9
1.1    Descripción del problema .....	9
1.2    Justificación del problema.....	10
1.3    Objetivos.....	10
1.3.1    Objetivo General .....	10
1.3.2    Objetivos Específicos .....	11
1.4    Marco teórico .....	11
CAPÍTULO 2.....	17
2.    Metodología .....	17
CAPÍTULO 3.....	24
3.    Resultados y análisis .....	24
CAPÍTULO 4.....	31
4.    Conclusiones y recomendaciones.....	31
Conclusiones .....	31
Recomendaciones .....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

## **ABREVIATURAS**

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
IUCN	<i>Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
CDC	<i>US Center for Disease Control and Prevention</i>
IMVIC	<i>Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, SIM &amp; Citrate</i>
MRVP	<i>Methyl red and Voges-Proskauer</i>

## SIMBOLOGÍA

AN	Agar Nutritivo
BDC	Bacteria Degradadora de Celulosa
CMC	Carboximetilcelulosa
CP	Caldo Peptona
CRC	Celulosa Red Congo
CT	Tampón Citrato
dH <sub>2</sub> O	Agua Destilada
DNS	<i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i>
EMB	Eosina azul de metileno
g	Gramos
h	Horas
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfhídrico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
L	Litros
LIA	Agar Lisina Hierro
M	Molar
MC	Agar Macconkey
ME	Agar de extracto de malta
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
mL	Mililitros
mol	Molaridad
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
PDA	Papa Dextrosa Agar
pH	Potencial del Hidrógeno
RC	Rojo Congo

RM	Rojo Metilo
RPV	Caldo Rappaport-Vassiliadis
SD	Agar Sabouraud dextrosa
SIM	Sulfuro para Movilidad
TSI	Triple Sugar Iron
μL	Microlitros
XLD	Xilosa Lisina Desoxicolato

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Vista general del Parque Seminario .....	17
Figura 3.1 Detección y cuantificación de <i>Salmonella</i> .....	26
Figura 3.2 Prueba presuntiva de detección de celulasas con RC .....	27
Figura 3.3 Prueba confirmatoria de detección de celulasas en medio CRC y Rojo Metilo .....	28
Figura 3.4 Medio CRC líquido, inoculados con muestra control y BDC, 48h, 72h y 96h respectivamente .....	29
Figura 3.5 Diluciones de la muestra control, BDC y estándares de glucosa .....	29
Figura 3.6 Producción de celulasas <i>Aspergillus niger</i> vs Bacteria FCV-MI-1 medidas a 540nm .....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Microorganismos aislados.....	144
Tabla 2.1 Preparación del reactivo de DNS.....	233
Tabla 2.2 Preparación del Tampón Citrato 100mL 1M.....	23
Tabla 3.1 Resultados de pruebas bioquímicas.....	24
Tabla 3.2 Micromorfología .....	25
Tabla 3.3 Resultados de espectrofotometría a 540nm por triplicado .....	30

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La iguana verde (*Iguana iguana*) también conocida como iguana de Guayaquil, se encuentra ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales de América, especialmente en los bosques secos de México hasta Argentina (Guerra & Rodríguez, 2019). En Ecuador, se han reportado poblaciones de iguanas a lo largo del litoral desde los 8 a los 340 metros sobre el nivel del mar (msnm). El desarrollo urbano que Guayaquil experimentó principalmente durante la época de la colonia, ocasionó el desplazamiento de varias poblaciones nativas de iguanas a zonas de manglar no urbanizadas. Algunas poblaciones se adaptaron a convivir con los humanos y actualmente habitan en zonas recreativas como el Parque Seminario, el cual alberga docenas de iguanas verdes en sus instalaciones (Alcaldía de Guayaquil, 2019). Esta especie supone un potencial riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas como salmonelosis, infecciones gastrointestinales o enfermedades invasivas a turistas nacionales y extranjeros y a los cuidadores que mantienen contacto directo con las iguanas.

Barazorda Romero, Čížek, Masaříková, & Knotek, (2015) reportaron que cepas de *Salmonella* potencialmente patógenas para los humanos, forman parte de la microbiota natural de la cloaca de iguanas verdes que son mantenidas en cautiverio. Se debe agregar que la creciente población de estos reptiles y la transfaunación a las crías de manera directa, supone un riesgo adicional que amerita ser estudiado (Mitchell & Shane, 2000). Por consiguiente, es importante realizar la caracterización de las comunidades microbianas que habitan en las heces de las iguanas del Parque Seminario para confirmar la presencia de cepas de *Salmonella* y determinar en estudios posteriores la prevalencia de serotipos patógenos.

### 1.1 Descripción del problema

En países subdesarrollados y en vías de desarrollo como el Ecuador, enfermedades emergentes, infecciosas y gastrointestinales se producen principalmente como consecuencia del contacto directo con animales portadores de enteropatógenos zoonóticos. Estudios previos sugieren que a pesar de que la transmisión de *Salmonella* de perros, pollos u otros animales

a humanos no es alta (Vasco, Graham, & Trueba, 2016), es importante establecer el potencial riesgo de transmisión de esta bacteria a los trabajadores del parque, a los turistas y a los otros animales que habitan en el Parque y que podrían infectarse al estar en contacto directo con las iguanas verdes.

## **1.2 Justificación del problema**

La contaminación de alimentos por enteropatógenos como la *Salmonella*, involucra la preocupación y toma de acciones por parte de Organismos de Salud Pública a nivel mundial. En el 2010, se estimó que el número de personas infectadas con *Salmonella* no tifoidea debido al consumo de alimentos contaminados fue de 6.43 millones, adicionalmente se reportó que 93.8 millones de casos correspondían a gastroenteritis, de los cuales se registraron 155,000 muertes alrededor del mundo. En Ecuador, en el 2014, a causa de la interacción con animales domésticos y el consumo de alimentos como carnes blancas, se reportaron 3,373 casos de salmonelosis transmitida por alimentos contaminados (Vinuesa-Burgos, Cevallos, Ron-Garrido, & Bertrand, 2016). Actualmente, se ha podido identificar que las iguanas verdes son reservorios naturales de esta especie (Sylvester, Amadi, Pinckney, Macpherson, & Mckibben, 2014), por lo que forman parte del grupo de Reptiles Asociados a Salmonelosis (RAS), reconocido como una zoonosis emergente que se asocia constantemente a enfermedades invasivas. (Sauteur, Really, Hug, Wittenbrink, & Berger, 2013)

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Caracterizar las comunidades microbianas aerobias que habitan en las heces fecales de las iguanas verdes (*Iguana iguana*) mediante métodos microbiológicos, bioquímicos, moleculares y de machine learning para determinar la prevalencia de cepas bacterianas potencialmente patógenas para los humanos.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar mediante métodos microbiológicos, bioquímicos y moleculares las comunidades bacterianas y fúngicas aeróbicas cultivables que habitan en las heces fecales de las iguanas verdes para determinar la diversidad genética de los aislados.
2. Identificar colonias bacterianas a nivel de género mediante el uso de una red convolucional para acelerar el proceso de caracterización de las comunidades bacterianas que habitan en las heces fecales de las iguanas verdes.
3. Evaluar mediante métodos cualitativos y cuantitativos la capacidad celulolítica de los aislados para identificar microorganismos promisorios que puedan ser utilizados en fermentadores para producir celulasas.

### 1.4 Marco teórico

#### - **Biología de la iguana verde (*Iguana iguana*)**

La iguana verde, *Iguana iguana*, pertenece a la clase Reptilia, orden Squamata, suborden Sauria y familia Iguanidae. Fue descrita por primera vez por Linnaeus en el año 1758 y posee una gran capacidad de adaptación a zonas urbanas y rurales (Mitchell & Shane, 2001). Las poblaciones de iguanas se distribuyen desde el noreste de México hasta el norte de Argentina, desde los 0 m hasta un máximo de 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Esta especie se encuentra categorizada por la *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) como una especie de preocupación menor, sin embargo, no se han reportado datos precisos sobre su población (Reynolds & Riggs, 2011). En Ecuador, se ha reportado la especie a lo largo del litoral, desde los 8 a 324 (msnm). Las iguanas poseen una longitud promedio de 2.3 metros de largo y un peso de 10.5 kilogramos y habitan principalmente en las cercanías de cuerpos de agua, en zonas boscosas y en la copa de los árboles, ya que les proporcionan alimento y refugio (Guerra & Rodríguez, 2019).

La ecología y alimentación de los reptiles varía de especie a especie, las iguanas verdes tienden a tener una dieta rica en fibra vegetal (Troyer, 1987) que incluye una variedad de hojas, brotes de flores y frutos como col, cilantro y papaya (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014). Por lo que dependen de una microflora intestinal funcional que facilite la transformación química de compuestos como la celulosa en ácidos grasos volátiles (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014), los ácidos grasos generados son importantes ya que representan entre el 30% y 38% de los requerimientos diarios de energía de las iguanas (McBee & McBee, 1982), de esta forma el contenido intestinal es retenido por más tiempo en el colon (Troyer, 1984) lo que implica que la captación de minerales como el calcio y zinc sea mayor.

El tracto gastrointestinal de los reptiles es anatómicamente sencillo en comparación con el de vertebrados de mayor tamaño. El sistema digestivo está formado por la boca, cavidad bucal, orofaringe, esófago, estómago, intestino corto, intestino largo, colon y cloaca (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014). El intestino de los reptiles desempeña un rol importante en la captación de los nutrientes, es por ello que este órgano es más largo que el de animales omnívoros y carnívoros. Los procesos fermentativos que ocurren en el intestino delgado y grueso están ligados directamente a la capacidad de termorregulación y mantención del pH (6.5 a 8) en estos ectodermos, es decir al perder o ganar calor de su masa corporal, el pH varía y la fermentación se ve involucrada, acelerando o ralentizando la degradación de materia orgánica vegetal (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014). Así mismo, la cloaca representa el término del tracto gastrointestinal que a su vez comprende parte del sistema reproductor y excretor, atribuyéndole la funcionalidad de absorción activa de electrolitos y la absorción pasiva de fluidos (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014).

#### - **Microflora gastrointestinal**

Generalmente la microflora intestinal de estos reptiles está formada por bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas, así como también de levaduras y protozoarios (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014) que se

encuentran condicionadas a posibles variaciones de temperatura dada la fisiología de la especie, incidiendo directamente en el anabolismo y catabolismo de los alimentos (Troyer, 1987). El treinta por ciento de las calorías que requiere la iguana son provistas por la actividad metabólica de la microbiota (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014) del intestino posterior, lugar donde se dan procesos de fermentación para la degradación de fibras vegetales (Troyer, 1987).

La adquisición de microorganismos capaces de realizar estos procesos fermentativos se da a temprana edad (Troyer, 1984). Sokol (1971) y Mc Bee y Mc Bee (1982) sugieren que los reptiles neonatales no tiene contacto maternal, por lo que la inoculación de estos microorganismo puede ocurrir por la ingesta de suelo o material fecal materno depositado en los nidos o en sus alrededores (Troyer, 1984), además, el proceso de transfaunación puede ocurrir también, por la ingesta de la cáscara de huevo de la cría al nacer (Salb, Mitchell, Riggs, Diaz-Figueroa, & Roy, 2007), después de tres a cuatro semanas de haber adquirido estos microorganismos, los reptiles neonatales serán capaces de fermentar en su intestino posterior, los compuestos celulósicos de los alimentos que consumen (Troyer, 1984). Es importante para las crías de iguana verde adquirir este sistema de fermentación en las primeras semanas de vida para alcanzar su máxima eficiencia digestiva (Troyer, 1984).

La caracterización de la microbiota en las iguanas verdes ha sido explorada en cavidades bucales y cloacales, al comparar las muestras obtenidas por hisopados de estas cavidades y con muestras obtenidas directamente del intestino, reflejan un déficit en la cantidad de bacterias posibles de caracterizar debido posiblemente a las limitadas pruebas bioquímicas que existen actualmente y aunque un gran número de bacterias han sido identificadas, solamente representa una pequeña porción de los posibles microorganismos capaces de colonizar el intestino de esta especie. Organismo como *Clostridium* y *Leuconostoc* han sido identificados como especies dominantes en las iguanas verdes y consideradas principales comensales en la digestión del material vegetal (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014). Diversos estudios han

podido caracterizar bacterias colonias aerobias y anaerobias de diferentes especies de reptiles (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014).

**Tabla 1.1.** Microorganismos aislados de reptiles (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2014)

Característica		Microrganismos
Gram-negativa	Aerobia	<i>Alcaligenes</i> spp.
		<i>Actinobacter</i> spp.
		<i>Flavobacterium</i> spp.
		<i>Pseudomonas</i> spp.
		<i>Salmonella</i> spp.
		<i>Brevundimonas</i> spp.
		<i>Escherichia coli</i>
		<i>Klebsiella</i> spp.
		<i>Shewanella</i> spp.
Gram-positiva	Aerobia	<i>Micrococcus</i> spp.
		<i>Corynebacterium</i> spp.
		<i>Staphylococcus</i> spp.
		<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Stenotrophomas</i> spp.
Gram-negativa	Anaerobias	<i>Kocuria</i> spp.
		<i>Anaerobiospirillum</i> spp.
		<i>Clostridium</i> spp.
Gram-positiva		<i>Eubacterium</i> spp.

*Salmonella* spp., es considerada como una bacteria de alto riesgo biológico ya que podría colonizar la microflora intestinal de los humanos. Más del cincuenta por ciento de los reptiles han sido reportados como portadores asintomáticos de *Salmonella* (Magnino et al., 2009) y actualmente, se ha podido identificar que las iguanas verdes son reservorios naturales de esta especie (Sylvester et al., 2014), por lo que forman parte del grupo de Reptiles Asociados a Salmonelosis (RAS) que es reconocida como una zoonosis emergente que se asocia constantemente a enfermedades invasivas. (Sauteur et al., 2013).

### - ***Salmonella* spp y salud pública**

*Salmonella* es una bacteria Gram-negativa, motil y anaerobia facultativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Se ha reportado que existen más de 2400 serotipos (Mitchell, 2011) y 60 serogrupos (Mermin et al., 2004) causantes de salmonelosis, todos estos son considerados patógenos para los humanos (Mitchell, 2011). La clasificación de este género ha sido reorganizada en los últimos 15 años; la actual categorización comprende 2 especies *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. La subdivisión de la primera categoría agrupa hasta 5 subespecies aisladas del ambiente y en poiquilotermos (Mitchell, 2011).

El 40% de todos los serotipos de *Salmonella* han sido aislados y cultivados de reptiles y raramente aislados de animales o humanos (Mermin et al., 2004), en tal sentido, es importante determinar los serogrupos y serotipos de *Salmonella* presentes en las poblaciones locales de iguanas verdes, los resultados obtenidos podrían servir de base para establecer programas de salud pública enfocados en evitar o disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas (Mitchell, 2011).

A nivel mundial, en el 2001, 60% de enfermedades infecciosas y 75% de enfermedades zoonóticas emergentes fueron reportadas debido al contacto con animales, comida o agua contaminada. En este último grupo de enfermedades, se encuentran los patógenos entéricos: *Cryptosporidium*, *Salmonella* no tifoidea y *Escherichia coli*, generando un alto riesgo para grupos vulnerables como niños y personas con inmunodepresión (Hale et al., 2012). En Estados Unidos de América, se reportan anualmente aproximadamente 1.4 millones de infecciones por *Salmonella* en humanos y alrededor de 600 muertes directamente asociadas a estas infecciones (Mermin et al., 2004).

El *US Center for Disease Control and Prevention* (CDC) ha reportado que las incidencias de los casos ligados a RAS han incrementado dramáticamente en estas últimas décadas (Mitchell, 2011) debido al contacto directo o indirecto con las iguanas, así como también con su comida y agua. (Sauter et al., 2013)

Es importante mencionar que factores como la creciente población de reptiles como la iguana verde, la composición de su microbiota y la incidencia de enfermedades emergentes (Taddei, Dodi, Di Ianni, Cabassi, & Cavarani, 2010) incrementan significativamente el riesgo a la salud humana. En tal sentido, esta especie podría ser usada como modelo para desarrollar métodos que reduzcan y eliminen la transmisión de *Salmonella* spp. por contacto con estos reptiles (Salb et al., 2007).

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

La identificación de los microorganismos aislados fue realizada también mediante una red convolucional algorítmica como una neo alternativa propuesta por (Zieli et al., 2017). La evaluación cualitativa y cuantitativa de la capacidad celulolítica de los aislados promisorios fue realizada siguiendo las especificaciones descritas por (Orozco & Changas, 2014; Gupta, Samant, & Sahu, 2012).

### - Área de estudio

El Parque Seminario se encuentra ubicado en la parroquia Rocafuerte de la ciudad de Guayaquil, entre las calles Chile, 10 de Agosto, Chimborazo y Clemente Ballén. Tiene una superficie total de 5.321 m<sup>2</sup>, incluyendo las áreas verdes y cuerpos de agua artificiales. (Castillo, Duche, & Ramírez, 2010)



Figura 1.1: Vista general del Parque Seminario (Castillo et al., 2010)

La colección de las heces de las iguanas verdes se dio de manera aleatoria dentro del parque en los espacios verdes donde existe mayor concentración de visitantes que interactúan directa e indirectamente con este reptil.

#### - **Métodos microbiológicos y bioquímicos**

La identificación de los aislados bacterianos se realizó mediante métodos microbiológicos y bioquímicos convencionales (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez, & Valdezate, 2011). La identificación fenotípica se fundamentó en características observables de las bacterias en relación con su desarrollo, morfología, propiedades metabólicas y bioquímicas. La elección de los medios de cultivo sigue siendo la principal herramienta para la detección, aislamiento, identificación y sensibilidad a antimicrobianos (Bou et al., 2011).

##### o **Cultivo de medios**

- La preparación de los de cultivo sólidos y líquidos, el procesamiento y el análisis de las muestras de heces, se realizó según lo reportado por (Barazorda-Romero et al., 2015) con ciertas modificaciones. Se realizó un hisopado de las muestras fecales, los hisopos fueron transferidos a fiolas de 250 mL que contenían 100 mL de caldo de enriquecimiento (agua peptonada). Las fiolas fueron incubadas por 24-72 h a 37°C. Posterior a la incubación, se procedió a inocular las muestras mediante extendido con hisopos estériles en medios selectivos agar eosina azul de metileno (EMB) para la detección de coliformes totales y fecales (*E. coli*), agar nutritivo (AN) medio de cultivo que soporta el crecimiento de un gran número de grupos bacterianos, agar Macconkey (MC) para el aislamiento de bacterias Gram-negativas, agar extracto de malta (ME) para el aislamiento de levaduras y mohos. Las colonias que crecieron en estos medios fueron purificadas en AN, las colonias fueron caracterizadas morfológicamente y mediante microscopia (tinción de Gram). Las cepas bacterianas purificadas fueron almacenadas en microtubos de 2 mL que contenían 1 mL de agar nutritivo.

- Para detectar la presencia de *Salmonella* en las muestras de heces fecales de las iguanas, se realizó un hisopado de las muestras fecales, los hisopos fueron transferidos a fiolas de 250 mL que contenían 100 mL de caldo de enriquecimiento (agua peptonada). Las fiolas fueron incubadas por 24-72 h a 37°C. Posteriormente, 100 µL de agua peptonada de cada fiola fueron transferidos a Erlenmeyers de 250 mL que contenían 100 mL de caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis (RPV), las fiolas fueron incubadas por 48h a 42°C. Muestras seleccionadas se inocularon en medio xilosa lisina desoxicolato (XLD) 37°C por 24h (Barazorda-Romero et al., 2015) formando colonias de color negro típicas de *Salmonella* para su posterior conservación en medio AN dentro de tubos de microcentrífuga.
- Para la detección de microorganismos fúngicos a partir de las muestras de heces fecales de la iguana verde se cultivó mediante la técnica de hisopado en medio solidos como papa dextrosa agar (PDA) (Orozco & Changas, 2014) y agar sabouraud dextrosa (SD) (Cushing, Pinborough, & Stanford, 2011). La identificación de estructuras fúngicas fue llevado a cabo a nivel macroscópico y microscópico del micelio superior, inferior y mediante tinción con azul de bromotimol de sus estructuras reproductiva e hifas. Se realizaron monocultivos para la purificación, aislamiento y conservación en medio sólido, PDA.

Para la identificación a nivel bioquímico y metabólico se realizó una serie de baterías denominadas IMVIC, *triple sugar iron* (TSI) y *lysine iron agar* (LIA) para todas las cepas aisladas a excepción de las fúngicas, inoculándolas a 37°C por 24h.

### **Prueba IMVIC**

Este diagnóstico se encuentra compuesto por 4 pruebas: producción de indol, sustancia que logra obtenerse por la desaminación del ácido triptófano sobre el medio de sulfuro para movilidad (SIM) y la producción

de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ). Rojo de metilo donde se originan ácidos estables a través de fermentación de la glucosa mediante un indicador de pH que mide la cantidad de iones de hidrogeno presente en la solución. Voges-Proskauer sugiere la formación de acetoina por procesos de degradación de la glucosa común en el grupo de las enterobacterias y el consumo de citrato como única fuente de carbono del medio, lo que provoca un cambio del pH y un viraje en el color de los medios de cultivo utilizados. Todos los resultados se reportan como positivos (+) o negativos (-) (Muso & Acosta, 2017).

### **Prueba TSI y LIA**

El medio TSI está compuesto por 3 azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) que mediante la presencia de bacterias capaces de fermentar estos grupos provoca el cambio de pH del medio (rojo fenol) a color amarillo, básico a ácido, respectivamente y producción de gas a causa de la reacción de tiosulfato propio del medio. Por otro lado, el medio LIA fundamenta en la reacción de la enzima lisina descarboxilasa con el grupo carbono del aminoácido L-lisina provocando el cambio de pH (púrpura de bromocresol) a amarillo. Además, la reacción con los iones  $Fe^{3+}$  convierten el tiosulfato a ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), que al combinarse con los iones de  $Fe^{3+}$  producen sulfuro de hierro, precipitado negro que se deposita en la base de los tubos y gas.

#### **- Determinación cualitativa de celulasas usando el indicador de pH rojo Congo**

La determinación presuntiva y confirmatoria de microorganismos capaces de sintetizar celulasas en un medio selectivo que contiene 1% de carboximetil celulosa como única fuente de carbono fue realizada siguiendo la metodología descrita por (Orozco & Changas, 2014) con algunas modificaciones que se describen a continuación:

- **Etapa 1: Prueba presuntiva**

Se prepararon cajas Petri con agar nutritivo (AN) suplementado con 1% w/v de carboximetilcelulosa (CMC), las muestras de heces fueron sembradas por extendido en las placas, posteriormente, las placas fueron incubadas a 28°C por 72h en oscuridad. La actividad enzimática de la muestra procesada después de la incubación, se la detectó mediante la adición de una solución de Red Congo (RC) al 0.1% w/v en 20 mL de agua destilada, a la cual se añadieron 4 mL de la solución RC sobre la placa incubada y se dejó reposar por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se descartó el exceso de la solución y se procedió a lavar la superficie con 6 mL de NaCl (0.5 M) de la solución, durante 10 minutos. Las colonias que mostraron resultados para la degradación positiva de celulosa en el medio fueron aisladas en AN e incubadas por 24 h a 37°C.

- **Etapa 2: Aislamiento**

Las colonias aisladas de la Etapa 1, fueron suspendidas en 500 µL de agua destilada estéril, una alícuota de 30 µL fue transferida a una placa con AN suplementada con 1% w/v de CMC y 0.1% w/v de RC. Adicionalmente, se preparó el medio antes mencionado, sustituyendo el RC por el MR. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C por 72 h en la oscuridad. Posterior a la incubación, la actividad enzimática se determinó cualitativamente mediante la observación del cambio de color alrededor de la zona de crecimiento, lo que implica la degradación de celulosa a causa de la producción de celulasas por parte de la colonia inoculada.

- **Etapa: Prueba confirmatoria**

La producción positiva de celulasas por las bacterias degradadoras de celulosa (BDC) donde la preparación, procesamiento, análisis cualitativo y cuantitativo se realizó según el protocolo descrito por (Gupta et al., 2012). Las BDC o microorganismos fúngicos aislados, fueron inoculados en medio Celulosa Red Congo (CRC): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g, celulosa 2 g, agar 15 g, Congo-Red 0.2 g, y gelatina 2 g en 1L de agua destilada con pH de 6.8-7.2. Las colonias potencialmente capaces de decolorar el medio

CRC se tomaron como positivas para la producción de celulasas y posteriormente cultivadas en medio líquido específico para el análisis con espectrofotómetro.

Para la determinación y cuantificación de la actividad enzimática utilizando CMC como única fuente de carbono, se siguió el protocolo descrito por (Alfonse, Negro, Saez, & Martin, 1986).

▪ **Etapa 4: Determinación de la actividad enzimática sobre carboximetil celulosa**

Los reactivos utilizados fueron:

- Carboximetil celulosa (1%)
  - Tampón citrato (TC) 0.05 M pH 4.8
  - DNS
  - Solución de glucosa en tampón citrato (TC) 10 mg/mL
1. La CMC fue disuelta en agua caliente a 50°C, posteriormente se añadieron 0.05 M (v/v, concentración final) de tampón citrato pH 4.8.
  2. A partir de una solución de glucosa (10 mg/mL), se prepararon los siguientes estándares de glucosa 1.0, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL en 0.5 mL de tampón citrato 0.05 M (v/v, concentración final), pH 4.8.
  3. La muestra control y problema fueron calentadas a 50°C durante 30 minutos en baño María. Posteriormente, se adicionaron 0.3 mL de DNS a todos los tubos, muestra, problema, patrón de glucosa y blanco TC.
  4. Los tubos fueron agitados y colocados en baño María por 5 minutos a 95°C, transcurrido ese tiempo, se añadieron 2 mL de agua destilada para detener la reacción y posteriormente se realizó la lectura a 540 nm en un espectrofotómetro.

**Tabla 2.1.** Preparación del reactivo DNS (Alfonse et al., 1986)

<b>Reactivo DNS</b>	
Ácido dinitrosalicílico	1%
Hidróxido Sódico	1%
Sulfito Sódico	0.05%
Sales de Rochelle (Tartrato Na-K)	20%
Fenol destilado	0.2%

**Tabla 2.2.** Preparación del Tampón Citrato 100 mL (1 M) (Advancing Assay & Test Technologies Bioquest, 2019)

<b>Tampón Citrato</b>	
Agua destilada	100 mL
Citrato de Sodio	2.41 g
Ácido Cítrico	0.347 g

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### - Métodos microbiológicos y bioquímicos.

Tabla 3.1 Resultados de pruebas bioquímicas.

Test	Cepa FCV-1	Cepa FCV-2	Cepa FCV-3	Cepa FCV-4	Cepa FCV-5	Cepa FCV-6
TSI	B/A	A	A	A	B/A	B/A
TSI: producción de gas	+	-	+	+	-	+
TSI: producción de H <sub>2</sub> S	+	-	-	-	-	+
LIA	B	B	B	B	A	B/A
LIA: producción de gas	-	-	-	-	-	+
LIA: producción de H <sub>2</sub> S	+	-	-	-	-	+
Citrato	+	-	+	-	-	+
SIM: Motilidad	+	+	+	+	+	+
SIM: Indol	-	-	-	-	-	-
SIM: producción de H <sub>2</sub> S	+	-	-	-	-	-
Metil Red/ Voges Proskauer	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Los resultados de las cepas aisladas de las heces fecales de las iguanas fueron reportados como positivas (+), negativas (-), básico (B) y ácido (A) respectivamente.

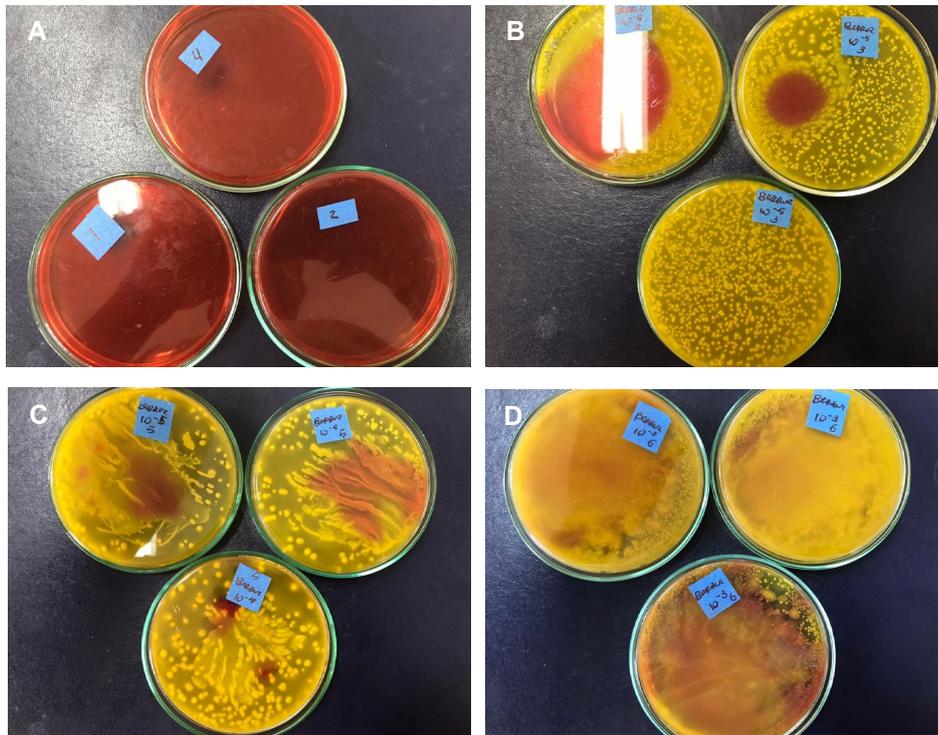
Las 6 cepas analizadas mediante pruebas bioquímicas (Tabla 3.1), reaccionaron en medio TSI siendo FCV-2, FCV-3 y FCV-4 capaces de utilizar lactosa, glucosa y sacarosa como fuentes de carbono, como consecuencia el pH del medio de cultivo disminuyó y provocó que el indicador de pH (rojo fenol) vire de rojo a amarillo (pH < 6.2). FCV-1, FCV-5 y FCV-6 degradaron al menos uno de estos carbohidratos por lo que el viraje de color fue parcial, rojo y amarillo, básico/ácido respectivamente. La producción de gas a causa de la fermentación o degradación de carbohidratos se presentó en FCV-3, FCV-4 y FCV-6. Adicionalmente, FCV-1 y FCV-6 fueron capaces de convertir el tiosulfato a ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), que al combinarse con los iones de Fe<sup>3+</sup> produjeron sulfuro de hierro, precipitado negro que se depositó en la base de los tubos. En la prueba bioquímica de LIA, solamente la cepa FCV-5 fue capaz

de metabolizar la glucosa, como consecuencia el pH del medio de cultivo disminuyó y provocó que el indicador de pH (púrpura de bromocresol) vire de púrpura a amarillo. Las cepas FCV-1 y FCV-5, reaccionaron con los iones  $Fe^{3+}$  fueron capaces de convertir el tiosulfato a ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), que al combinarse con los iones de  $Fe^{3+}$  produjeron sulfuro de hierro, precipitado negro que se depositó en la base de los tubos. La producción de gas fue observada en las cepas FCV-1, FCV-2, FCV-3, FCV-4 y FCV-5. En el medio de cultivo sólido citrato de Simmons, las cepas FCV-1 y FCV-6 fueron capaces de sintetizar la enzima citrato permeasa lo que les permitió utilizar el citrato como única fuente de carbono, la degradación del citrato fue detectada mediante el viraje de color del indicador de pH (azul de bromotimol) de verde a azul (pH > 7.8). El medio SIM, se determinó la motilidad de todas las cepas y la reacción negativa al reactivo de Kovac's que indica indol negativo, es decir, las cepas no fueron capaces de producir la enzima triptofanasa que desamina el triptófano del medio. Se reportó para la prueba MRVP, positivo y negativo, coloración roja a causa de la presencia de ácidos y la ausencia de acetyl methyl carbinol (acetoina) sin color, respectivamente para todas las muestras.

**Tabla 3.2 Micromorfología.**

Microorganismo	Características		
<b>CEPA FCV-1</b>			
<b>CEPA FCV-2</b>			
<b>CEPA FCV-3</b>	Aerobias	<i>Bacillus</i>	Gram-positivos
<b>CEPA FCV-4</b>			
<b>CEPA FCV-5</b>			
<b>CEPA FCV-6</b>		<i>Staphylococcus</i>	

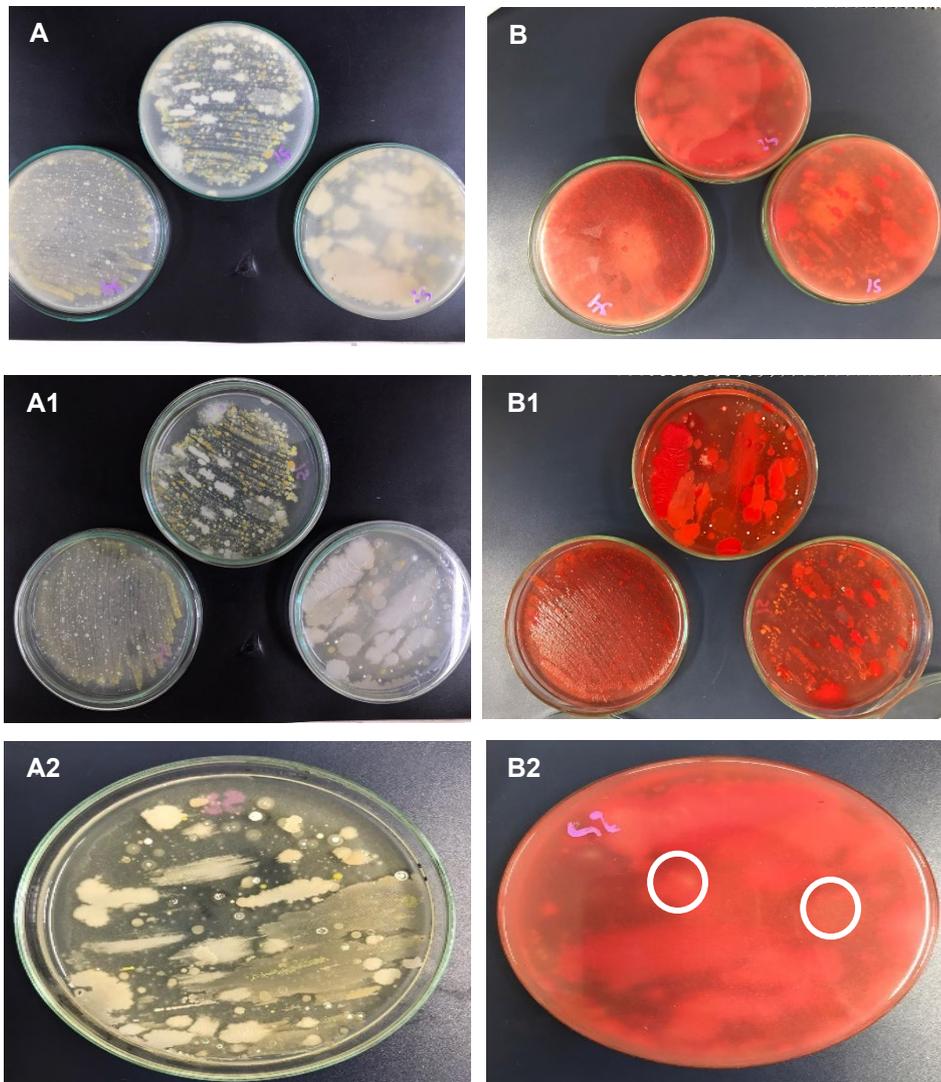
Colonias aisladas de las 6 cepas aisladas, fueron transferidas placas porta objetos y teñidas por tinción de Gram, las placas fueron observadas en el microscopio óptico, se determinó la morfología de las cepas (*Bacillus* y *Staphylococcus* Gram-positivos). Las fotografías fueron tomadas únicamente con el lente objetivo 100x.



**Figura 3.1 Detección y cuantificación de *Salmonella*.**

Se realizaron diluciones seriadas a las muestras positivas para los medios específicos, caldo RPV, de detección de *Salmonella*. Los resultados obtenidos en el medio XLD (Figura 3.1), sugieren la ausencia de *Salmonella* en las 6 muestras de heces fecales analizadas, ya que no se observaron en ninguna de las placas sembradas, colonias negras redondeadas, característica morfológica típica de este género.

- Diagnóstico de celulasas utilizando RC

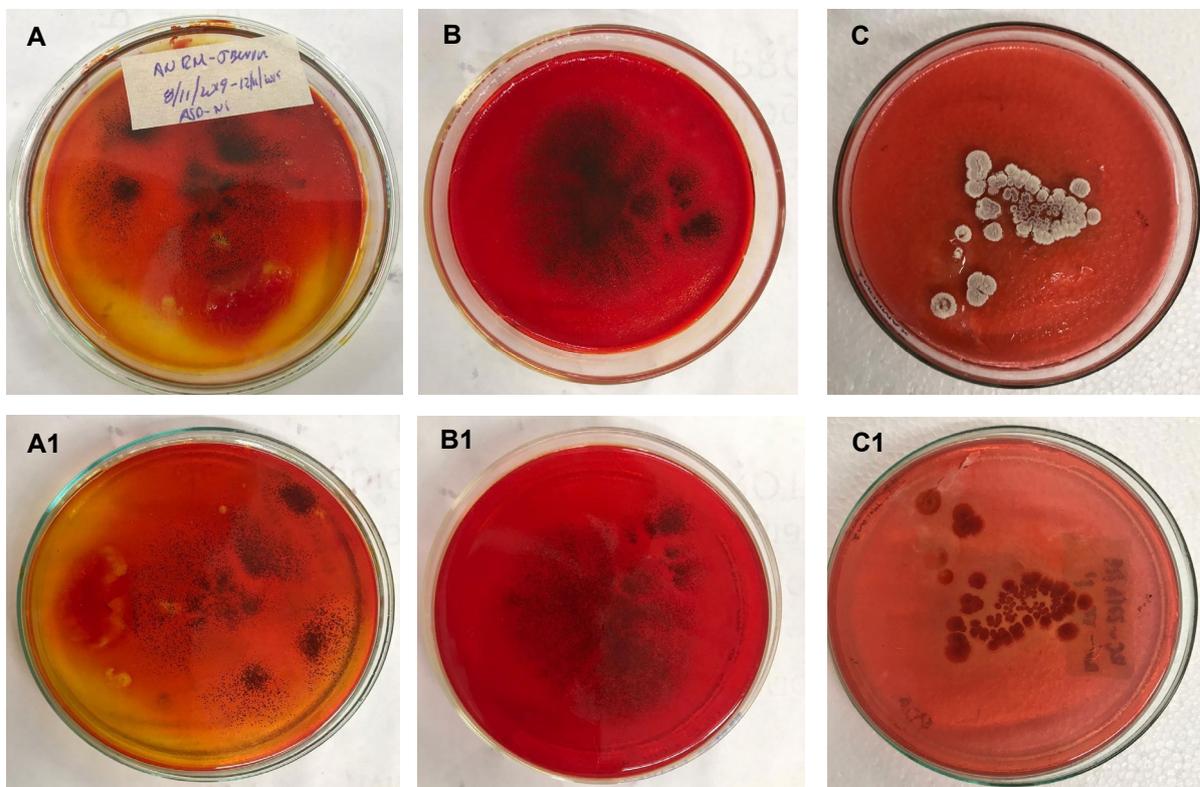


**Figura 3.2 Prueba presuntiva de detección de celulasas con RC**

Placas sin el colorante vista posterior y frontal, A y A1, respectivamente. Placas con el colorante Rojo Congo, vista posterior y frontal, B y B1, respectivamente. Los círculos blancos en la imagen B2, indican las zonas (translucidas) en las cuales se detectó la posible presencia de celulasas.

Los resultados presuntivos se mostraron mediante la tinción con Rojo Congo (Figura 3.2), donde las colonias con capacidad de producir celulasas reaccionan con el colorante, esto se debe que la estructura química del RC se acopla con la enzima, dando un color más claro que el resto del medio (ver imágenes A2 y B2). Las colonias

que mostraron un halo de inhibición alrededor de la zona de crecimiento fueron seleccionadas para determinar de forma cuantitativa la producción de celulasas.

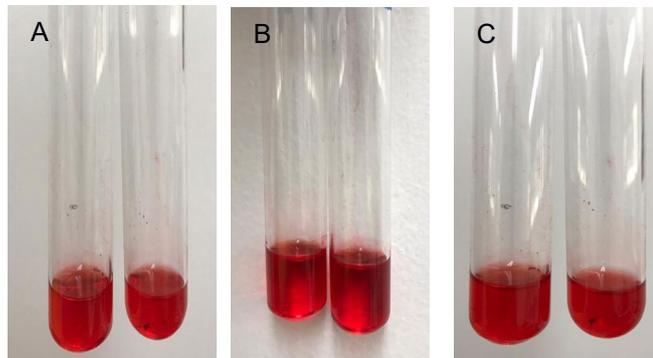


**Figura 3.3 Prueba confirmatoria de detección de celulasas en medio CRC y Rojo Metilo**

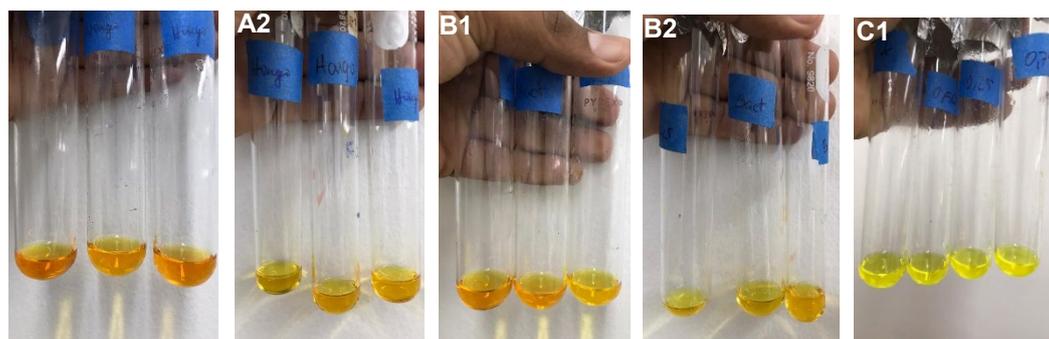
Las colonias aisladas fueron sembradas en medio CRC (B, B1, C, C1) y Rojo Metilo (A y A1) para la detección cualitativa y confirmatoria de la producción de celulasas, vista frontal y posterior, respectivamente.

El hongo *Aspergillus niger* fue sembrado en los dos medios selectivos (Figura 3.3), y fue utilizado como control positivo de crecimiento y de producción de celulasas. El crecimiento del hongo en los medios RM y CRC (A1 y B1) produjo la decoloración del medio, lo cual es una confirmación de su alta capacidad productora de celulasas. Por otro lado, en el medio RM no hubo crecimiento de la bacteria problema, C2, esto puede deberse a la afinidad que pudiese tener la bacteria en el medio con el colorante específico y el pH que necesita para su crecimiento, mientras tanto en el medio CRC, C1, la bacteria problema creció en un periodo de 72 h decolorando el

medio, indicativo de producción de celulasas.



**Figura 3.4 Medio CRC líquido, inoculados con muestra control y BDC, 48 h, 72 h y 96 h, respectivamente**



**Figura 3.5 Diluciones de la muestra control, BDC y estándares de glucosa**

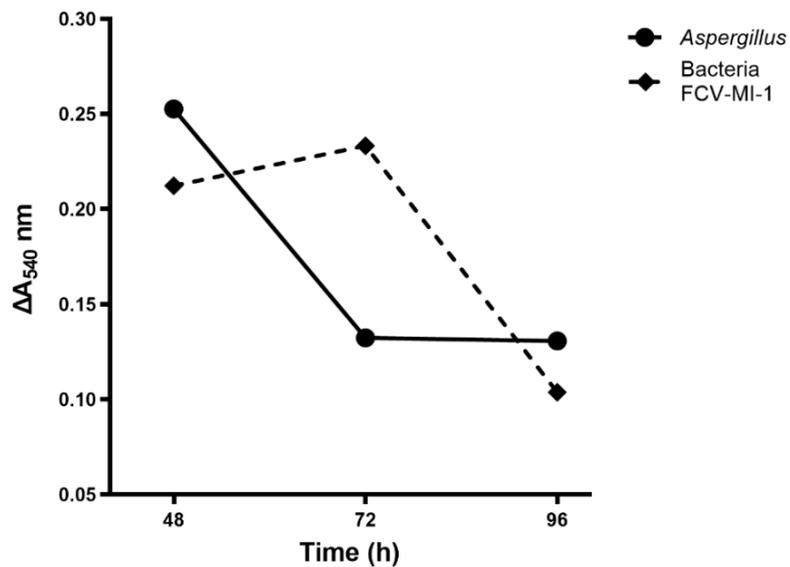
El grupo control y la BDC fueron inoculados en 3 mL de medio CRC líquido e incubados a 28°C y 37°C respectivamente (Figura 3.4). A partir de esto, se procedió a la realización de las diluciones, para cada grupo. Se utilizaron distintas concentraciones de glucosa para establecer una curva patrón (Figura 3.4). Para las muestras A1 y B1 (Figura 3.5) la intensidad de DNS del control era mucho mayor a la de BDC por lo que es un indicativo de alta producción de celulasas a las 48 h, sin embargo, en el tiempo de 72 h la concentración de celulasas para el control era menor, A2, que la de BDC, B2. Lo que sugiere un incremento de producción de celulasas por parte de la bacteria problema.

**Tabla 3.3 Resultados de espectrofotometría a 540nm por triplicado**

- **Cuantificación de celulasas por espectrofotometría**

<b>Bacteria FCV-MI-1</b>					<b><i>Aspergillus niger</i></b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Absorbancia</b>			<b>Promedio</b>	<b>Absorbancia</b>			<b>Promedio</b>
<b>48 h</b>	0,211	0,224	0,202	0,212	0,200	0,288	0,270	0,253
<b>72 h</b>	0,230	0,250	0,220	0,233	0,121	0,149	0,127	0,132
<b>96 h</b>	0,101	0,115	0,095	0,104	0,132	0,131	0,129	0,131

**Cellulase production *Aspergillus* and bacteria FCV-MI-1**



**Figura 3.6 Producción de celulasas *Aspergillus niger* vs Bacteria FCV-MI-1 medidas a 540nm**

Se tomaron 1000 µL de la muestra con DNS y se cuantifico la producción de celulasas con un espectrofotómetro (*SPECTRONIC®*, *GENESYS 5*) a 540 nm, se obtuvieron 3 mediciones por muestra en periodos de 48 h, 72 h y 96 h. La curva se construyó con el promedio de las absorbancias medidas en cada una de ellas (Figura 3.6). Siendo la mayor actividad enzimática promedio de 0.253 U/mL en 48 h por el hongo *Aspergillus niger* y 0.233 U/mL en 72 h por parte de la bacteria FCV-MI-1 (Tabla 3.3). Esto sugiere que la máxima capacidad enzimática del hongo ocurre en los primeros 2 días a escala de laboratorio en comparación con la bacteria problema, en 3 días.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- Las 6 cepas analizadas comparten características similares como forma, tamaño y color que dificultan su identificación morfológica. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas indican que las cepas metabolizan de manera diferente los compuestos de carbono y nitrógeno que contienen estas pruebas, por consiguiente, se puede inferir que las cepas pertenecen a grupos bacterianos distintos y probablemente a géneros diferentes. Por consiguiente, para complementar la caracterización de las cepas, pruebas moleculares utilizando el gen ribosomal 16s rRNA deben ser realizadas para determinar la diversidad filogenética de los aislados.
- Los resultados obtenidos sugieren que las muestras fecales de 6 iguanas no poseen cepas de *Salmonella*. Para confirmar la ausencia de esta bacteria en la población de iguanas del Parque Seminario, se recomienda incrementar el número de organismos analizados ya que algunos miembros de esta población podrían poseer una microbiota intestinal distinta. Los resultados generados en este estudio pueden ser utilizados por organismos de control sanitario para determinar el potencial riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas de las iguanas verdes a los turistas y trabajadores que están en contacto directo con estos animales.
- Aun cuando la bacteria FCV-MI-1 produce 17% menos celulasas que el control positivo (*Aspergillus niger*), los resultados obtenidos a nivel de laboratorio son prometedores y mediante un estudio de factibilidad económico, se determinó que esta bacteria podría ser utilizada en industrias biotecnológicas para producir celulasas a mediana escala (200 L), aportando al mercado industrial biotecnológico con un producto nacional y basado en un microorganismo aislado de ambientes poco explorados.

- Se tomaron ciento veinte y ocho micrografías de cepas tipo conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Técnicas Moleculares: *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudonoma aeruginosa*, *Micrococcus* sp., *Klebsiella aerogenes*, *E. coli*, *Basillus* sp., y *Staphylococcus aureus*. Las micrografías fueron utilizadas para entrenar un algoritmo de reconocimiento que coteja la información mediante una red convolucional. Posteriormente, se incluyeron 72 fotografías de las 6 cepas aisladas de las muestras de heces fecales de iguanas verdes, como prueba de concepto se comprobó que el algoritmo diseñado es capaz de establecer un porcentaje de similitud entre las muestras de las iguanas con las fotografías de las cepas tipo. En total 200 micrografías fueron generadas y almacenadas a la base de datos.

### **Recomendaciones**

- Se recomienda realizar las pruebas de detección de *Salmonella* con un mayor número de muestras fecales de iguanas verdes para descartar la presencia de esta bacteria patógena en la población de iguanas del Parque Seminario.
- Es importante que la base de datos de las micrografías sea actualizada constantemente para que algoritmo continúe su proceso de entrenamiento de cotejar las micrografías en la red convolucional e incrementen las probabilidades de encontrar similitudes entre las muestras a analizar y las fotografías almacenadas en la base de datos. Futuros proyectos de investigación podrían ser realizados utilizando la información y los datos generados en este estudio.
- Se recomienda que proyectos de investigación, se lleven a cabo por un mínimo de 2 términos académicos, ya que la falta de tiempo implica que algunos objetivos, como la identificación molecular, no sean alcanzados ni incluidos en el documento final.

# BIBLIOGRAFÍA

- Advancing Assay & Test Technologies Bioquest. (2019). Citrate Buffer (pH 3.0 to 6.2) Preparation and Recipe. Retrieved from <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/carbonate-bicarbonate-buffer-ph-9-2-to-10-6>
- Alcaldía de Guayaquil. (2019). Flora y Fauna. Retrieved November 13, 2019, from Guayaquil es mi Destino website: <https://www.guayaquilesmidestino.com/es/naturaleza/flora-y-fauna/laguana>
- Alfonse, M., Negro, M. J., Saez, R., & Martin, C. (1986). Actividad enzimática del complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei*. Hidrólisis enzimática de la celulosa. In *Centro de Investigaciones Energéticas, medioambientales y tecnológicas*.
- Barazorda Romero, S., Čížek, A., Masaříková, M., & Knotek, Z. (2015). Choanal and cloacal aerobic bacterial flora in captive green iguanas: A comparative analysis. *Acta Veterinaria Brno*, 84(1), 19–24. <https://doi.org/10.2754/avb201584010019>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Castillo, L., Duche, K., & Ramírez, V. (2010). *Evaluación del uso turístico del Parque Seminario de la ciudad de Guayaquil*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Cushing, A., Pinborough, M., & Stanford, M. (2011). Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *Veterinary Record*, 169(15), 390. <https://doi.org/10.1136/vr.d4636>
- Díaz-Figueroa, O., & Mitchell, M. A. (2014). Gastrointestinal Anatomy and Physiology Morphology and Physiology. In *Reptile Medicine and Surgery* (Second Edn). <https://doi.org/10.1016/B0-7216-9327-X/50016-X>
- Guerra, E., & Rodríguez, A. (2019). Reptiles del Ecuador. Retrieved November 17, 2019, from Bioweb website: [https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Iguana iguana](https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Iguana%20iguana)
- Gupta, P., Samant, K., & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Hale, C. R., Scallan, E., Cronquist, A. B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., ... Clogher, P. (2012). Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 54(SUPPL.5). <https://doi.org/10.1093/cid/cis051>
- Magnino, S., Colin, P., Dei-Cas, E., Madsen, M., McLauchlin, J., Nöckler, K., ... Van Peteghem, C. (2009). Biological risks associated with consumption of reptile products. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.001>

- McBee, R., & McBee, V. (1982). Volatile fatty acid production in the green iguana, *Iguana iguana*. *Iguanas of the World: Their Behavior, Ecology, and Conservation*, 2, 77–83. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.1146/annurev.es.02.110171.001121>
- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., ... Angulo, F. J. (2004). Reptiles, Amphibians, and Human *Salmonella* Infection: A populationbased, case-control study. *Clinical Infectious Diseases*, 38(s3), S253–S261. <https://doi.org/10.1086/381594>
- Mitchell, M. A., & Shane, S. M. (2000). Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas (*Iguana iguana*) and their environment. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(3–4), 297–304. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00124-0)
- Mitchell, Mark A. (2011). Zoonotic Diseases Associated with Reptiles and Amphibians: An update. *veterinary clinics of North America-exotic animal practice*, 14(3), 439–456. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.05.005>
- Mitchell, Mark A, & Shane, S. M. (2001). Epidemiology of *Salmonella* in the green iguana (*Iguana iguana*). *LSU Historical Dissertations and Theses*, 3016562, 162. Retrieved from <http://0-search.proquest.com.wam.leeds.ac.uk/docview/275855717?accountid=14664%0Ahttp://openurl.ac.uk/?genre=dissertations+%26+theses&issn=&title=Epidemiology+of+Salmonella+in+the+green+iguana+%28Iguana+iguana%29&volume=&issue=&date=2001-01-01&atitle=&spa>
- Muso, E., & Acosta, C. (2017). *Evaluación de bioaerosoles asociados en el sitio de disposición final de residuos sólidos en la Empresa Pública de Aseo y Gestión Ambiental del Cantón Latacunga (EPAGAL)*. Universidad Técnica De Ambato Facultad De Ciencia E Ingeniería En Alimentos Carrera De Ingeniería Bioquímica.
- Orozco, S., & Changas, A. (2014). Screening and detection of extracellular cellulases ( endo- and exo-glucanases ) secreted by filamentous fungi isolated from soils using rapid tests with chromogenic dyes. *African Journal of Biotechnology*, 13(52), 4694–4701. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14221>
- Reynolds, R. G., & Riggs, B. M. (2011). *Iguana iguana* (common green iguana). *Herpetological Review*, 42(2), 241.
- Salb, A., Mitchell, M. A., Riggs, S., Diaz-Figueroa, O., & Roy, A. (2007). Characterization of intestinal microflora of captive green iguanas, *Iguana iguana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 17(1), 12–15. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.17.1.12>
- Sauteur, P. M., Really, C., Hug, M., Wittenbrink, M., & Berger, C. (2013). Risk factors for invasive reptile-associated *Salmonellosis* in children. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(6), 419–421. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1133>
- Sylvester, W. R. B., Amadi, V., Pinckney, R., Macpherson, C. N. L., & Mckibben, J. S. (2014). Prevalence, serovars and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. from wild and

- domestic Green Iguanas ( *Iguana iguana* ) in Grenada , West Indies. *Zoonoses and Public Health*, 61, 436–441. <https://doi.org/10.1111/zph.12093>
- Taddei, S., Dodi, P. L., Di Ianni, F., Cabassi, C. S., & Cavirani, S. (2010). Conjunctival flora of clinically normal captive green iguanas (*iguana iguana*). *Veterinary Record*, 167(1), 29–30. <https://doi.org/10.1136/vr.b4868>
- Troyer, K. (1984). Behavioral acquisition of the hindgut fermentation system by hatchling *Iguana iguana*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14(3), 189–193. <https://doi.org/10.1007/BF00299618>
- Troyer, K. (1987). Small differences in daytime body temperature affect digestion of natural food in a herbivorous lizard (*Iguana iguana*). *Pergamon Journals Ltd*, 87A(3), 623–626.
- Vasco, K., Graham, J. P., & Trueba, G. (2016). Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4218–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.00795-16>. Editor
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., & Bertrand, S. (2016). Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes in Ecuadorian broilers at slaughter age. *PLOS ONE*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>
- Zieli, B., Plichta, A., Misztal, K., Spurek, P., Brzychczy-włoch, M., & Ocho, D. (2017). Deep learning approach to bacterial colony classification. *PLOS ONE*, 12(9), 14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184554>