



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICA,
LIPOLÍTICA, AMIOLÍTICA, CELULOLÍTICA, ANTAGÓNICA Y
RESISTENCIA MICROBIANA DE CEPAS BACTERIANAS DE
INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: FAURI IVÁN ROSERO BENALCÁZAR

DIRECTORA: DRA. ANA KARINA ALBUJA LANDI PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

©2023, Fauri Iván Rosero Benalcázar

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Fauri Iván Rosero Benalcázar, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular: el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 26 de junio del 2023

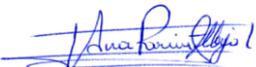


Fauri Iván Rosero Benalcázar

185002581-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICA, LIPOLÍTICA, AMILOLÍTICA, CELULOLÍTICA, ANTAGÓNICA Y RESISTENCIA MICROBIANA DE CEPAS BACTERIANAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO**, realizado por el señor: **FAURI IVÁN ROSERO BENALCÁZAR**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Elizabeth del Rocío Escudero Vilema MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-06-26
Dra. Ana Karina Albuja Landi PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-26
BqCl. Mishell Carolina Moreno Samaniego MSc. ASOSORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-26

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar una etapa más de vida, a todos/as mis amigos que me apoyaron con sus enseñanzas y consejos siendo un sustento moral en esté proceso de ser Bioquímico Farmacéutico. Para mi mami Laura Benalcázar que lucha a diario para poderme brindar un mejor porvenir, al ser el primordial motivo para levantarme día a día y nunca bajar los brazos ante los tiempos difíciles de la vida.

Fauri

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme vida, salud, sabiduría y por ser el mentor espiritual en la formación académica. A mi mamá Laura Benalcázar, que me impulsó a seguir hasta el final de este camino de Bioquímico Farmacéutico, ya que, sin su apoyo incondicional, ni siquiera lo fuera podido soñar. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y puntualmente a la planta docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por ser los encargados de transmitirme sus conocimientos, que servirán de sustento en la vida profesional. A la Dra. Ana Albuja, Bqf. Yolanda Buenaño y a mis compañeros de Bioquímica y Farmacia, por su apoyo incomparable en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Fauri

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	3
1.2.1. Limitaciones.....	3
1.2.2. Delimitaciones	4
1.3. Problema general de la investigación.....	4
1.4. Problemas específicos de la investigación	4
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo general.....	4
1.5.2. Objetivos específicos	5
1.6. Justificación	5
1.6.1. Justificación teórica	5
1.6.2. Justificación metodológica.....	5
1.6.3. Justificación práctica	6

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes de la investigación	7
2.2. Referencias teóricas.....	8
2.2.1. Bacterias	8
2.2.1.1. Características de las bacterias	8
2.2.1.2. Características macroscópicas de las bacterias.....	9
2.2.1.3. Tipos de bacterias	9

2.2.1.4. <i>Bacterias ácido lácticas</i>	10
2.2.2. <i>Nomenclatura bacteriana</i>	12
2.2.3. <i>Patogenia bacteriana</i>	12
2.2.3.1. <i>Tipos de toxinas</i>	12
2.2.3.2. <i>Bacterias saprófitas</i>	13
2.2.4. <i>Análisis microciológico</i>	13
2.2.4.1. <i>Métodos de aislamiento microbiano</i>	13
2.2.4.2. <i>Métodos de conservación bacteriana</i>	14
2.2.4.3. <i>Tinción de gram</i>	15
2.2.4.4. <i>Medios de cultivo</i>	15
2.2.4.5. <i>Pruebas bioquímicas</i>	15
2.2.4.6. <i>Antibiograma</i>	16
2.2.5. <i>Resistencia bacteriana</i>	17
2.2.5.1. <i>Tipos de resistencia bacteriana</i>	17
2.2.6. <i>Actividad biológica de las bacterias</i>	18
2.2.6.1. <i>Actividad proteolítica</i>	18
2.2.6.2. <i>Actividad lipolítica</i>	20
2.2.6.3. <i>Actividad amilolítica</i>	21
2.2.6.4. <i>Actividad celulolítica</i>	22
2.2.7. <i>Cepario</i>	23

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO	24
3.1. Enfoque y diseño de investigación	24
3.2. Nivel de investigación	24
3.3. Diseño de investigación	24
3.3.1. <i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	24
3.3.2. <i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	24
3.4. Tipo de investigación	24
3.5. Polación y planificación	25
3.5.1. <i>Población</i>	25
3.5.2. <i>Muestra</i>	25
3.5.2.1. <i>Criterios de inclusión</i>	25
3.5.2.2. <i>Criterios de exclusión</i>	25
3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	25
3.6.1. <i>Actividad bacteriana</i>	25

3.6.2.	<i>Tinción de gram</i>	26
3.6.3.	<i>Aislamiento de bacterias en medios cultivados</i>	27
3.6.4.	<i>Catalasa</i>	28
3.6.5.	<i>Oxidasa</i>	29
3.6.6.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	30
3.6.7.	<i>Caracterización de bacterias ácido lácticas</i>	31
3.6.8.	<i>Actividad proteolítica</i>	32
3.6.9.	<i>Actividad lipolítica</i>	32
3.6.10.	<i>Actividad amilolítica</i>	33
3.6.11.	<i>Actividad celulolítica</i>	33
3.6.12.	<i>Inhibición a patógenos</i>	33
3.6.13.	<i>Técnicas de conservación bacteriana en glicerol</i>	34
3.6.14.	<i>Resistencia bacteriana</i>	35
3.6.14.1.	<i>Antibiograma</i>	35

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	37
4.1.	Pureza de las bacterias	37
4.2.	Pruebas bioquímicas de confirmación bacteriana	40
4.3.	Actividades enzimáticas a enterobacterias	44
4.4.	Antibiograma a enterobacterias	47
4.5.	Resistencia bacteriana a micrococcus	51
4.6.	Morfología macroscópica y microscópica de BAL	53
4.7.	Caracterización de bacterias ácido lácticas	55
4.8.	Actividades enzimáticas de bacterias ácido lácticas	57
4.9.	Actividad antagonica de bacterias ácido lácticas frente a patógenos	59
4.10.	Resistencia bacteriana de BAL a antimicrobianos	62

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
5.1.	Conclusiones	64
5.2.	Recomendaciones	65

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Métodos de conservación de bacterias	14
Tabla 2-2:	Pruebas bioquímicas para análisis bacteriano	16
Tabla 3-2:	Tipos de proteasas bacterianas	19
Tabla 4-2:	Enzimas lipolíticas bacterianas	20
Tabla 1-4:	Caracterización macro y microscópica de las bacterias identificadas	38
Tabla 2-4:	Pruebas de identificación a enterobacterias.....	41
Tabla 3-4:	Pruebas de identificación en Pseudomonas.....	42
Tabla 4-4:	Pruebas de identificación en Staphylococcus	43
Tabla 5-4:	Actividades enzimáticas de las bacterias identificadas	44
Tabla 6-4:	Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia Enterobacteriaceae	47
Tabla 7-4:	Test de susceptibilidad antibacteriana familia Micrococcaceae	51
Tabla 8-4:	Evaluación micro y macroscópicas de las bacterias ácido lácticas.....	53
Tabla 9-4:	Caracterización de bacterias ácido lácticas	55
Tabla 10-4:	Evaluación de la actividad biológica de las bacterias ácido-lácticas	57
Tabla 11-4:	Porcentaje de inhibición de la actividad antagónica de BAL frente a patógenos ..	60
Tabla 12-4:	Resistencia de bacterias ácido-lácticas a antibióticos.....	62

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-3:	Reactivación de cepas bacterianas.....	26
Ilustración 2-3:	Tinción de las bacterias	27
Ilustración 3-3:	Aislamiento bacteriano.....	28
Ilustración 4-3:	Prueba de catalasa	28
Ilustración 5-3:	Prueba de oxidasa.....	29
Ilustración 6-3:	Pruebas de identificación.....	30
Ilustración 7-3:	Características de BAL.....	31
Ilustración 8-3:	Actividad proteolítica	32
Ilustración 9-3:	Actividad lipolítica	33
Ilustración 10-3:	Técnica de conservación bacteriana en glicerol.....	34
Ilustración 11-3:	Etapas del desarrollo del trabajo de investigación	36

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** TINCIÓN DE GRAM
- ANEXO B:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO C:** CARACTERIZACIÓN DE LAS BAL (BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS)
- ANEXO D:** ACTIVIDADES PROTEOLÍTICA, LIPOLÍTICA, AMIOLÍTICA
CELULOLÍTICA
- ANEXO E:** INHIBICIÓN DE BAL A PATÓGENOS
- ANEXO F:** ANTIBIOGRAMA
- ANEXO G:** ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BAL FRENTE A PATÓGENOS
- ANEXO H:** TEST DE SUSCEPTIBILIDAD FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE
- ANEXO I:** TEST DE SUSCEPTIBILIDAD FAMILIA MICROCOCCACEAE
- ANEXO J:** RESISTENCIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A ANTIBIÓTICOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
AmpC	Betalactamasas cromosómicas
ARCSA	Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria
BAL	Bacterias ácido lácticas
BLEA	Betalactamasas de amplio espectro
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
C	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CRO	Ceftriaxona
E	Eritromicina
HLGR	Resistencia de alto nivel a gentamicina
N	Gentamicina
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
SARM	Staphylococcus aureus resistente a meticilina
SASM	Staphylococcus aureus sensible a meticilina
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TEM	Betalactamasa típica
VRE	Enterococcus resistentes a vancomicina

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar las actividades proteolítica, lipolítica, amilolítica, celulolítica, antagonica y resistencia microbiana de cepas bacterianas de interés biotecnológico, mediante un estudio con diseño no experimental, con diseño observacional analítico de corte transversal. La población de estudio fueron 23 bacterias patógenas, 15 ácido lácticas. Se procedió en cuatro etapas: se identificó la pureza de las bacterias, se realizó los ensayos para identificar las actividades biológicas, se determinó la actividad antagonica de las bacterias ácido lácticas (BAL) y se evaluó la susceptibilidad microbiana. Como resultado se obtuvo bacterias gram negativas como: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, etc., gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y bacterias ácido lácticas como *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus spp.* Al evaluar la actividad biológica se observó: actividad proteolítica en un 100%, lipolítica 73,68%, amilolítica 89,47% y celulolítica 47,37%. En el análisis de la actividad antagonica de las BAL, algunas especies como: *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus spp.*, inhibieron a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*, y se observó una evidente inhibición a *Klebsiella pneumoniae*, en un 75-93,33%. Finalmente, se evaluó la susceptibilidad microbiana, donde las enterobacterias fueron sensibles a gentamicina, fosfomicina y resistentes a diversos betalactámicos, los micrococcus fue resistente a vancomicina y oxacilina, *Staphylococcus saprophyticus* fue resistente a todos los antibióticos empleados y las BAL fueron sensibles a cloranfenicol, eritromicina y ampicilina. Se concluyó que, enterobacterias, micrococcus y BAL presentaron actividad biológica, las BAL mostraron un alto porcentaje de inhibición a patógenos y se verificó resistencia bacteriana a diversos antibióticos. Se recomienda aprovechar la actividad biológica de las bacterias analizadas para utilizarlas en la industria alimentaria, textil, de papel, desinfectantes, etc.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <BACTERIAS>, <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <ACTIVIDAD BIOLÓGICA>, <ACTIVIDAD ANTAGÓNICA>, <SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA>, <CEPARIO>.

1390-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The main objective of this research study was to evaluate the proteolytic, lipolytic, amylolytic, cellulolytic, antagonistic, and microbial resistance activities of bacterial strains of biotechnological interest, employing a non-experimental design study, with a cross-sectional analytical observational design. The study population was 23 pathogenic bacteria and 15 lactic acid bacteria. We proceeded in four stages: the purity of the bacteria was identified, tests were performed to identify the biological activities, the antagonistic activity of the lactic acid bacteria (LAB) was determined and microbial susceptibility was evaluated. As a result, gram-negative bacteria such as: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, etc., were obtained. On the other hand, gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, and lactic acidbacteria such as *Lactococcus cremoris*, and *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus spp.* Evaluating the biological activity, it was observed that 100% proteolytic activity, lipolytic 73.68%, amylolytic 89.47%, and cellulolytic 47.37%. In the analysis of the antagonistic activity of LAB, some species such as *Lactococcus cremoris*, and *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus spp.* inhibited *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus saprophyticus*, and an evident inhibition to *Klebsiella pneumoniae* was observed, in 75-93.33%. Finally, microbial susceptibility was evaluated, where enterobacteria were sensitive to gentamicin, and fosfomicin and resistant to various beta-lactams, micrococci were resistant to vancomycin and oxacillin, *Staphylococcus saprophyticus* were resistant to all antibiotics used and LAB was sensitive to chloramphenicol, erythromycin, and ampicillin. It was concluded that enterobacteria, micrococcus, and LAB showed biological activity, LAB showed a high percentage of inhibition to pathogens, and bacterial resistance to several antibiotics was verified. It is recommended to take advantage of the biological activity of the analyzed bacteriato use them in the food, textile, paper, disinfectant, etc. industries.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <BACTERIA>, <ACID-LACTIC BACTERIA>, <BIOLOGICAL ACTIVITY>, <ANTIBACTERIAL ACTIVITY>, <MICROBIAL SUSCEPTIBILITY>, <CEPARIOUS>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda de bacterias capaces de producir sustancias de interés biotecnológico ha incrementado considerablemente. Hace más de 50 años se descubrieron algunas especies productoras de enzimas, proteínas o simplemente sustancias con la capacidad de degradar ciertos compuestos complejos, siendo de interés el estudio en bacterias de distintos ecosistemas, no sólo para desarrollar investigaciones sino también para elaborar productos derivados de las mismas (Ortiz et al. 2022, p. 2).

En general, se ha evidenciado el interés multidisciplinario del uso de microorganismos en las diferentes áreas; en la industria alimentaria, intoxicación alimentaria, la higiene de alimentos, seguridad alimentaria, industria farmacéutica, biotecnología, resistencia antimicrobiana, entre otras. A nivel de la comunidad científica también se ha enfatizado en tener colecciones microbianas en ceparios, al ser una fuente segura y sustentable para conservar ex situ la diversidad microbiana y realizar el estudio de su actividad biológica, para su aplicación industrial (Cueva y Mayorga 2021, p. 1).

Las bacterias con actividad biológica, en los últimos años han permitido la producción de alrededor de 30000 a 50000 tipos de productos naturales, de los cuales, más de 10000 son compuestos biológicamente activos y 8000 corresponden a antibióticos o medicamentos antitumorales, de gran importancia en medicina (Ortiz et al. 2022, p. 3).

El punto de partida para el aprovechamiento de la biodiversidad microbiana es el aislamiento de los microorganismos nativos que posean actividad biológica ya sea proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica con el fin de obtener nuevos productos y poder optimizar los procesos industriales (Alcarraz 2018, p. 66).

Es importante que se haya ampliado la aplicación de estas bacterias con actividad biológica, abarcando la industria alimentaria, textil, de papel, productos desinfectantes como el detergente y en los últimos años la industria de bioetanol ha usado estos microorganismos como biocatalizadores en procesos productivos. Debido a esto, ha incrementado la demanda de los productos biológicos en el mercado, al facilitar los procesos catalíticos en la industria (Sánchez et al. 2020, p. 36).

Con base en la problemática descrita se ha planteado la presente investigación que busca la identificación de la actividad biológica de las bacterias almacenadas en el cepario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), cuyos objetivos son identificar la pureza de las

bacterias a través de la tinción de gram y pruebas bioquímicas, realizar los ensayos para la identificación de las actividades proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica así como la determinación de la actividad antagonica de las bacterias ácido lácticas (BAL) frente a microorganismos patógenos, finalizando con la evaluación de la susceptibilidad microbiana, mediante el método de difusión en disco.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Las distintas industrias enfrentan varias problemáticas y desafíos en cuanto a la optimización de procesos o a la disminución del impacto ambiental, debido a esto; el uso de microorganismos ha cobrado protagonismo, puesto que las bacterias tienen la capacidad de generar enzimas como las: lipasas, proteasas, amilasas o celulasas, que mejoran los procesos de fabricación, propiedades sensoriales de los productos, reducen costos y sobre todo tienen un bajo impacto ambiental, por lo cual, varias enzimas se utilizan para la biorremediación (Moral et al. 2018, p. 2).

Las bacterias y sus enzimas también constituyen una alternativa a los diferentes métodos químicos realizados a nivel industrial, donde destacan enzimas; proteasas, lipasas, queratinasas, amilasas, xilanasas y quitinasas, convirtiéndose en una alternativa amigable para el medio ambiente, donde, varias industrias tienen un gran impacto en la biodiversidad (Sirvas et al. 2021, p. 2).

A nivel mundial, se estima que las proteasas son el grupo de enzimas más usadas y comercializadas en las industrias de alimentos, farmacéuticas, productos médicos, bebidas y detergentes. El segundo grupo lo constituye, las enzimas lipolíticas, por ser estables, de bajo costo al obtenerse en gran cantidad en microorganismos con exigencias nutricionales simples y un acelerado crecimiento de los mismos. Por el numeroso uso de la diversidad enzimática, han surgido intentos de ampliar la búsqueda de aplicaciones tanto fisiológicas como tecnológicas de las enzimas producidas principalmente en bacterias y hongos (Viguera 2019, p. 2).

Sin embargo, una problemática importante de las bacterias es la resistencia generada a lo largo de los años, provocando amenazas al sector de salud, seguridad alimentaria y al desarrollo. Esto ocasiona la dificultad de tratar ciertas patologías a nivel mundial, incrementando el índice de morbilidad y mortalidad, requiriendo acciones de los gobiernos y la sociedad (Alós 2019, p. 692).

1.2. Limitaciones y delimitaciones

1.2.1. Limitaciones

- Acceso limitado al laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la ESPOCH.
- Falta de disponibilidad de materiales, reactivos y equipos.

- No se cuenta con acceso a pruebas cuantitativas para evaluar la actividad biológica de las bacterias.
- Falta de una asignación presupuestaria para el desarrollo del estudio.

1.2.2. Delimitaciones

- Delimitación espacial: el presente proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Delimitación temporal: se anhelo culminar el proyecto de investigación dentro de un tiempo establecido de cuatro meses.
- Delimitación de contenido: se aplicó un diseño no experimental para la determinación de las actividades proteolítica, lipolítica, amilolítica, celulolítica, antagónica y resistencia microbiana de cepas bacterianas de interés biotecnológico.

1.3. Problema general de la investigación

¿Las bacterias del cepario presentan actividad proteolítica, lipolítica, celulolítica, amilolítica, antagónica y resistencia a antibióticos?

1.4. Problemas específicos de la investigación

- ¿Cuenta con una adecuada pureza las cepas bacterianas del laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la ESPOCH?
- ¿Tiene actividad proteolítica, lipolítica y celulítica en medios enriquecidos, las bacterias puras y aisladas del laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la ESPOCH?
- ¿Manifiestan las bacterias ácido-lácticas una actividad antagónica frente a microorganismos patógenos por medio del método difusión en disco de Kirby Bauer?
- ¿Presenta las bacterias del cepario susceptibilidad microbiana con el empleo del método de difusión en disco de Kirby Bauer?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar las actividades proteolítica, lipolítica, amilolítica, celulolítica, antagónica y resistencia microbiana de cepas bacterianas de interés biotecnológico.

1.5.2. Objetivos específicos

- Identificar la pureza de las bacterias existentes en el cepario del laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la ESPOCH, a través de la tinción de gram y pruebas bioquímicas para la afirmación de su identidad.
- Realizar los ensayos para la identificación de las actividades proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica en las bacterias puras y aisladas, a través del cultivo bacteriano en agares enriquecidos.
- Determinar la actividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas (BAL) del cepario frente a microorganismos patógenos por medio del método de difusión en disco de Kirby Bauer.
- Evaluar la susceptibilidad microbiana de las bacterias del cepario, mediante el método de difusión en disco de Kirby Bauer.

1.6. Justificación

1.6.1. Justificación teórica

Las enzimas bacterianas son una alternativa a los métodos químicos utilizados en los diferentes procesos industriales, siendo mayoritariamente usadas en comparación a las proteínas catalíticas provenientes de animales o vegetales, además, son amigables con el medio ambiente. Algunas de estas enzimas poseen características especiales de gran interés industrial como las proteasas, lipasas, queratinasas, amilasas y xilanasas (Navarro 2020, p. 2).

El uso de estas enzimas se evidencia principalmente en el área de alimentos, medicamentos, agricultura y productos químicos, donde, las bacterias se convierten en una fuente de diversidad enzimática para múltiples aplicaciones en el campo biotecnológico (Martinez 2019, p. 4).

1.6.2. Justificación metodológica

Para el desarrollo del trabajo de investigación se utilizó un enfoque cuantitativo con diseño no experimental, de tipo analítico y descriptivo, basado en la determinación de la actividad biológica de las bacterias del cepario de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Se procedió en cuatro etapas: se identificó la pureza de las bacterias del cepario mediante tinción de gram y pruebas bioquímicas, se realizaron los ensayos en agares enriquecidos para evaluar las actividades: proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica, se evaluó la actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas a través de pruebas de crecimiento frente a patógenos por el método de difusión en disco de Kirby Bauer y se realizó un test de susceptibilidad microbiana mediante el mismo

método antes mencionado.

1.6.3. Justificación práctica

En la carrera de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, cuenta con un cepario, que contiene cepas bacterianas aisladas e identificadas, fruto de la ejecución de diferentes investigaciones: experimentales y no experimentales tanto en titulación como trabajos de integración curricular, permitiendo así obtener microorganismos viables para diversos análisis por parte de la comunidad politécnica, docentes investigadores y estudiantes. La ejecución del presente proyecto de investigación es muy relevante, debido a que se evaluó las potencialidades proteolítica, lipolítica, amilolítica, celulolítica de varias bacterias, así como el poder inhibitorio a patógenos de las bacterias ácido-lácticas y su resistencia bacteriana.

Este estudio fue viable, porque se tuvo el acceso al cepario ubicado en el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias, además, se cuenta con equipos, medios de cultivo, reactivos y materiales adquiridos en anteriores proyectos por parte del grupo de investigación LEISHPAREC, con el fin de dar un aporte a futuras investigaciones o aplicaciones en la ESPOCH.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

Las bacterias se caracterizan por tener una amplia versatilidad metabólica, por lo cual, sus enzimas poseen varias ventajas en el uso a nivel industrial y biotecnológico, como mayor especificidad, actúan en diversos rangos de pH, temperatura, de rápida reacción y son amigables con el medio ambiente, por ello, las bacterias se han convertido en una fuente beneficiosa de moléculas bioactivas (Falero 2018, p. 7).

Conforme al Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo N° 1331/2008, se permite la fabricación de productos alimenticios elaborados a partir de enzimas, con la aprobación N° 1334/2008, donde se toma en consideración los beneficios humanos y biotecnológicos (EFSA 2021, p.3). No obstante, en Ecuador, es necesario mantener una normativa sanitaria de suplementos alimenticios nacionales, emitida por el ARCSA (ARCSA 2021, pp. 1-37). Según la OMS, se deben tomar acciones en contra de la resistencia antimicrobiana (RAM), caso contrario, para el año 2050, crecerán las cifras de muertes de forma exponencial hasta los 10 millones por año, ocasionando una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial que prevee un problema al sistema de salud pública (Giono et al., p 1-8).

En Cuba, en el año 2022, en Bahía de la Habana, se investigó sobre la: “Actividad biológica en bacterias heterótrofas procedentes de la Bahía de la Habana”, se conoció que, un 63,2% de las bacterias principalmente las gram positivas, presentaron actividad proteolítica y un 44,8% presentaron actividad hemolítica. También se evaluó la actividad antimicrobiana, observado que el 29,9% inhibieron el crecimiento de cepas bacterianas como *Escherichia. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ortiz et al. 2022, p. 11).

En México, en el año 2018, se ejecutó el análisis de la: “Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos”, se observó que; en 293 cepas, sólo el 24,57% presentaron actividad inhibitoria a patógenos de tipo gram negativo. El 9,72% tuvo actividad contra *Listeria monocytogenes*, ya que, al combinar bacteriocinas con ácido láctico, genera una mayor barrera contra el crecimiento de patógenos, lo cual resultó importante, ya que, es una bacteria causante de infecciones alimentarias violentas, con un índice de mortalidad del 30% (Ramírez 2018, p. 71).

De igual manera, en Uruguay en el año 2018, una observación sobre “Identificación y caracterización de enzimas bacterianas de origen antártico, con potencial aplicación biotecnológica”, determinó la presencia de enzimas como lipasas, proteasas y lacasas, sin embargo, no se evidenció: celulasas, peroxidasas o manganeso peroxidasas. Además, tuvo una correlación de un 40,3% en actividad proteasa y lipasa de las cepas bacterianas, de las cuales el 68% correspondían a *Pseudomonas spp.* (Falero 2018, p. 46).

La aplicación de la actividad biológica de las bacterias tiene gran importancia a nivel ambiental. Un estudio realizado en Ecuador en 2018 sobre “Evaluación prospectiva de la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de los Ilinizas, provincia de Cotopaxi”, mostró que, en los medios de agua termal, existe una alta actividad enzimática tanto proteolítica como lipolítica, lo cual comprueba la existencia de factores que favorecen el crecimiento bacteriano, aislando 48 colonias bacterianas y un grupo de bacterias psicrofílos facultativos, de las cuales 3,86% tuvieron actividad proteolítica y 2,33% presentaron actividad lipolítica. Los principales géneros aislados fueron: *Haemophilus*, *Gardnerella*, *Proteus*, *Plesiomonas*, *Campylobacter* *Psychrobacter* y *Micrococcus* (López y Soria 2018, p. 57).

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. Bacterias

Se denomina bacterias a aquellos microorganismos procariotas, que poseen en su estructura membrana citoplásmica, diversidad metabólica y en su mayoría pared celular, además, se encuentran ampliamente dispersas en el planeta y muchas causan enfermedades a otros organismos, al ser patógenos. Las diferentes especies bacterianas pueden vivir en todas las condiciones ambientales, adaptándose incluso a: altas temperaturas, acidez, en medios reactivos, entre otros. En el ser humano también conviven bacterias, como por ejemplo, en la piel, boca, vías respiratorias, aparato digestivo, urinario y reproductivo, sin causar daño, ya que, son bacterias propias de la flora saprófita o microbiana (Caycedo et al. 2021, p. 54).

2.2.1.1. Características de las bacterias

A nivel general las bacterias presentan las siguientes características (López 2019, p. 2):

- Se clasifican por género y especie
- Carecen de núcleo
- Tienen forma variada
- Son unicelulares

- Tamaño entre 0,5-10 micras
- Pueden presentar ciertas estructuras como fimbrias, flagelos, etc.
- Algunas bacterias poseen cápsula
- Por lo general poseen pared celular
- Son bacterias gram positivas o gram negativas
- Algunas bacterias producen esporas que le confieren cierta resistencia ambiental
- Según su necesidad nutricional y energética pueden ser: heterótrofas, fotoautótrofos y quimioautótrofos
- Algunas bacterias son parte de la microbiota
- Otras bacterias son patógenas

2.2.1.2. Características macroscópicas de las bacterias

Las bacterias pueden presentar ciertas variaciones morfológicas (forma de estrella, planas, rectangulares, alargadas o formando pedúnculos no celulares). Las células pueden ser observadas macroscópicamente cuando se encuentran en grupos, mientras que las colonias celulares son agrupaciones formadas por la reproducción de las bacterias incubadas alrededor de 24 horas aproximadamente.

El tamaño de las colonias puede variar desde 0,5 a 4,0 milímetros de diámetro llegando a tener una forma: circular, puntiforme, irregular, rizoide o filamentosas; el borde puede ser: suave, irregular, lobulado, rizoide, dentada u ondulado; respecto a la elevación puede ser plana, convexa, elevada, acuminada, umbonada y la textura se puede clasificar en: suave, rugosa, seca, cremosa y mucoide (Vargas y Kuno 2019, p. 25-94).

2.2.1.3. Tipos de bacterias

Las bacterias se pueden clasificar según el orden de los esquizomicetos o según su morfología. De acuerdo con el orden se pueden clasificar de la siguiente forma: eubacterias, actinomycetos, chlamydobacterias, micobacterias, tiobacterias y espiroquetas (Ridlon 2019, p. 1312).

Según la morfología, las bacterias al ser vistas al microscopio pueden presentar tres formas. Los cocos son esféricos y pueden ser gram positivos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, etc., o gram negativos como *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, etc. Los bacilos tienen forma alargada, como bastones y pueden ser gram positivos como *Bacillus*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, etc., o gram negativos como *Brucella*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *Vibrio*, entre otros. Las espiroquetas tienen forma espiral y destacan los géneros *Treponema*, *Leptospira* y *Borrelia*. (Vargas y Kuno 2019, p. 2595).

- *Cocos*

Son bacterias esféricas y se pueden agrupar de forma homogénea, el tamaño va desde 0,8 a 1,0 micras, además, tienen la tendencia a mantener unidas y pueden presentar las siguientes formas: los diplococos son aquellos que tras la división permanecen en pares, los estreptococos permanecen en cadenas de cuatro tras la división, las tétradas se agrupan entre cuatro células, formando una disposición cuadrada, las sarcinas se agrupan entre ocho células y los estafilococos se agrupan sin seguir un patrón regular, generalmente en forma de racimos (Chávez 2019, p.28).

- *Bacilos*

Son bacterias heterogéneas ya que tienen amplia variedad morfológica, pueden presentarse como bastones largos o cilindros, además, en sus extremos pueden variar entre redondos, rectos o afilados y se observan en el microscopio, en las siguientes formas: cocobacilos, diplobacilos, estreptobacilos, filamentosas y bacilos fusiformes (Chávez 2019, p.29).

- *Bacterias en forma espiral*

Existen bacterias que tienen una morfología de bacilos largos y espirales, como, por ejemplo: vibriones, espirilos y espiroquetas (Chávez 2019, p.29).

- *Otras morfologías*

También existen otras bacterias que exponen diferentes morfologías como, por ejemplo: bacterias con forma de estrella (bacteria *Stella*), bacterias planas o rectangulares (bacterias *Haloarcula*), bacterias triangulares, bacterias en forma de pera o alargadas (bacteria *Hyphomicrobium*) y bacterias que se encuentran formando pedúnculos: bacteria *Gallionella* (Chávez 2019, p.30).

2.2.1.4. *Bacterias ácido lácticas BAL*

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias gram positivas, ya sean cocos o bacilos no esporulados, que tienen determinadas características metabólicas, morfológicas y fisiológicas. Se caracterizan por ser anaerobios facultativas o aerotolerantes de longitud variable, tienen la capacidad de transformar alimentos ligados al proceso de la fermentación, además, sintetizan metabolitos importantes como: ácido láctico y ácido péptido. A nivel del laboratorio carecen de catalasa y citocromo. En cuanto a la taxonomía pertenece al filo Firmicutes, al cual, pertenecen tres especies agrupados según los criterios de biología molecular (Saenz y Gorbeña 2018, p. 54).

- *Genómica de las bacterias ácido lácticas*

Históricamente, las BAL se han agrupado en tres grupos sobre la base del metabolismo de los azúcares: las homofermentativas obligadas, las heterofermentativas facultativas y las heterofermentativas obligadas. Sin embargo, el uso masivo de secuencias de ADN que codifican el ARNr 16S ha llevado a un aumento impresionante en el número de especies de BAL reconocidas. Como ejemplo, el número de especies en el género *Lactobacillus* se ha duplicado, luego de la introducción del rRNA 16S como marcador taxonómico (Vinderola et al. 2019, p. 2).

- *Clasificación de las bacterias ácido lácticas*

Dentro de las bacterias ácido lácticas destacan las siguientes especies como se indica a continuación (Vinderola et al. 2019, p. 2):

- *Lactobacillus spp*: en este grupo se resaltan las siguientes bacterias: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, y *Lactobacillus salivarius*
- *Lactococcus spp*: en este grupo se encuentran bacterias como: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus hirilactis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus nasutitermitis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus petauri*, *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus reticulitermitis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus plantarum*, y *Lactococcus laudensis*.
- *Streptococcus spp*: dentro de este grupo están las bacterias: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus neumoniae*
- *Enterococcus spp*: en este grupo se presentan las siguientes bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* y *Enterococcus gallinarum*.

- *Tipos de bacterias ácido lácticas según su fermentación*

Las bacterias ácido lácticas incluyen alrededor de 20 géneros, destacando los *Lactobacillus*. De acuerdo con la fermentación pueden ser homofermentativas o heterofermentativas. Las homofermentativas utiliza la ruta de la glucólisis al convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, produciendo más del 85% de ácido láctico, dentro de este grupo destacan las siguientes batrias: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono a partir de glucosa, además, usan la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, por lo que generan únicamente la mitad de la energía del grupo homofermentativo. Dentro de este grupo se encuentran: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc spp.* (Parra 2018, p. 96).

2.2.2. Nomenclatura bacteriana

Para nombrar las bacterias se usa el esquema binomial donde el nombre de la bacteria está constituido por dos palabras: la primera es una palabra en latín o latinizada, escrita con la primera letra en mayúscula para indicar el género (usualmente esta palabra proviene del nombre del descubridor o describe la morfología del microorganismo). La segunda palabra indica la especie que es escrita en minúsculas y es usualmente descriptiva, es decir, se refiere al color, origen, patogenicidad, etc. Además, los nombres científicos de las bacterias deben ser escritos en letra cursiva o en su defecto cada palabra debe ser subrayada con el fin de seguir los lineamientos y reglas del sistema de nomenclatura bacteriana que se encuentran en el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (UCV 2020, p. 7).

2.2.3. Patogenia bacteriana

Es una infección, es decir, es el ingreso, desarrollo o multiplicación de un agente infeccioso en el organismo lo que puede provocar una enfermedad. Los factores de virulencia son el patógeno, la patogenicidad, la enfermedad y la virulencia. Dentro de los mecanismos de patogenia bacteriana se encuentran: las toxinas bacterianas que son sustancias tóxicas (proteínas con elevado peso molecular y antigenicidad), la invasión y destrucción de tejidos, donde las especies patógenas colonizan un epitelio, lo invaden extendiéndose a los tejidos adyacentes y provocan una invasión cada vez más extensa y también puede darse un mecanismo combinado, que engloba los dos procesos mencionados anteriormente (Umaran et al. 2020, p. 3).

2.2.3.1. Tipos de toxinas

Las endotoxinas son lipopolisacáridos, cuya estructura está compuesta por complejos de lípidos y azúcares. Se liberan por bacterias gram negativas con el fin de mantener la integridad de la pared celular y los efectos biológicos son fiebre, leucopenia, mitogenicidad, hipotermia, necrosis de médula ósea, coagulación diseminada, entre otros. Por otro lado, las exotoxinas son proteínas solubles excretadas por bacterias con efectos tóxicos para algunas células del huésped. Muchas bacterias patógenas, tanto gram positivas como gram negativas, pueden producir una o varias

exotoxinas diferentes y en ocasiones, son el principal factor de virulencia de estos microorganismos (Umaran et al. 2020, p. 9).

2.2.3.2. Bacterias saprofitas

Un saprófito es un organismo heterótrofo que obtiene su energía de materia orgánica muerta o de los detritos desechados por otros seres vivos, extrayendo compuestos orgánicos que requiere nutrientes. En este grupo destacan bacterias y hongos que se caracterizan por secretar enzimas que hidrolizan las moléculas orgánicas de los residuos, liberando de este modo, biomoléculas solubles que son absorbidas a través de sus cubiertas celulares (pared celular y membrana plasmática) (Ramos et al. 2019, p. 43).

La flora saprófita es una mezcla de bacterias, arqueas, protistas, hongos y virus que conforman un ecosistema microbiano complejo dentro de nuestro cuerpo. Esta flora ayuda a descomponer las partículas de los alimentos, para producir vitaminas y nutrientes. Las bacterias saprofitas se pueden encontrar a nivel de la piel, boca, nariz, oídos, ojos e intestinos, ayudan al organismo a combatir las infecciones peligrosas a través de la fabricación de anticuerpos (proteínas) llamadas inmunoglobulinas, que se encargan de atacar cualquier sustancia extraña que entre al torrente sanguíneo (Ramos et al. 2019, p. 43).

2.2.4. Análisis microbiológico

2.2.4.1. Métodos de aislamiento microbiano

Para el análisis de muestras contaminadas o que presentan cultivos mixtos, se debe realizar el aislamiento bacteriano. Existen diversos métodos para conseguir esta separación, que se basan en inmovilizar las células microbianas en la superficie de los medios de cultivo sólido (Sanz 2020, p. 28).

- Aislamiento por agotamiento por estría: método basado en el agotamiento progresivo del inóculo sobre un medio sólido, la técnica consiste en tomar un inóculo de la muestra y extender sobre el medio formando estrías juntas (Sanz 2020, p. 28).
- Aislamiento por diluciones sucesivas: se basa en realizar diluciones de la muestra bajo condiciones estrictas de esterilidad para sembrar cantidad conocidas sobre las placas Petri, de modo que, se dé el crecimiento de colonias separadas (Sanz 2020, p. 28).

2.2.4.2. Métodos de conservación bacteriana

Para estudiar las bacterias primero se aíslan de su ambiente natural, luego se conservan en colecciones de cultivos para estudios futuros. Este tipo de conservación ex situ requiere de un servicio de conservación experimentada, que sea de rápido acceso y que, además, provisione cepas de referencias únicas (Arencibia 2018, p. 2).

A continuación, en la Tabla 1-2 se presentan los métodos de conservación de las bacterias:

Tabla 1-2: Métodos de conservación de bacterias

Conservación	Método	Características
CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO	Conservación por congelación	Se congelan con un agente crioprotector todas las células en suspensión y luego se almacenan a temperaturas menores a 0°C. Factores que influyen en la viabilidad de las bacterias: temperatura, velocidad de congelación y empleo de agentes crioprotectores.
	Conservación por liofilización	La liofilización tiene por objetivo eliminar el agua de la sustancia congelada a través de la sublimación del hielo. Existen tres fases en este proceso: pre congelación, secado primario y secado secundario donde se remueve el agua que queda ligada.
CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO	Conservación por subcultivo	La cepa microbiana es guardada en el medio de cultivo donde creció y se transfiere a un medio de cultivo fresco con el fin de asegurar la viabilidad del mismo.
	Conservación por suspensión en agua destilada	Consiste en suspender en agua destilada y estéril unas células del cultivo en criotubos, obteniendo altos porcentajes de viabilidad.
MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONSERVACIÓN	Desecación sobre sustancias inertes	Consiste en la separación del agua y a la vez se previene la rehidratación.
	Desecación en papel filtro	Se impregna la solución en papel absorbente, dejando secar al aire bajo condiciones estériles.
	Desecación en sílica	Se añaden las células al sílica gel para protegerse.

Fuente: (Arencibia et al. 2018, p. 2).

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

2.2.4.3. Tinción de gram

La tinción de gram es una técnica bacteriológica que fue descubierta en el año 1880 por Hans Christian Gram cuando observó tejido pulmonar en unos pacientes con neumonía. Esta técnica permite diferenciar a las bacterias en dos categorías según su coloración. Las bacterias que adquieren tonalidad azul o violeta se denominaban gram positivas y las que tenían tonalidad rosa eran gram negativas.

Además, estas bacterias presentan diferencias en su estructura como se indica a continuación: (Rodríguez y Arenas 2018).

- Las bacterias gram positivas presentan coloración azul violeta frente a la tinción de gram, la pared celular es gruesa, hay ausencia de lipopolisacáridos y presenta ácidos teicoicos y lipoproteínas.
- Las bacterias gram negativas presentan coloración rosa frente a la tinción de gram, la pared celular es delgada, presentan lipopolisacáridos y no tienen ácidos teicoicos y lipoproteínas a nivel de la pared bacteriana.

2.2.4.4. Medios de cultivo

Son un conjunto de nutrientes que crean condiciones óptimas y facilitan el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las bacterias (Ortega et al. 2019, p.4).

Dentro de los tipos de medios de cultivo se pueden encontrar: los generales que facilitan al crecimiento de varios tipos de bacterias como el caldo nutritivo, los medios de enriquecimiento son medios que permiten el crecimiento de ciertas bacterias, sin inhibir de forma total a los demás microorganismos como el agar sangre, MacConkey, Chocolate, Sabouraud, los medios selectivos son medios que permiten el crecimiento de bacterias específicas, inhibiendo así el desarrollo de los demás microorganismos como el agar eosina-azul de metileno y los diferenciados tienen la capacidad de determinar las propiedades específicas de un microorganismo como el agar sangre o el caldo rojo de fenol (Galindo 2022, p. 3).

2.2.4.5. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son ensayos que permiten determinar aquellas características metabólicas de los microorganismos, además, sirven de apoyo en el diagnóstico de las infecciones bacterianas. Algunas de las pruebas de identificación más empleadas se muestran en la Tabla 2-2 (Cercenado 2018, p. 6):

Tabla 2-2: Pruebas bioquímicas para análisis bacteriano

Categoría	Prueba bioquímica	Características
Pruebas para identificación preliminar	Catalasa	Las bacterias que sintetizan esta enzima, hidrolizan el peróxido de hidrógeno y forman burbujas.
	Oxidasa	El sistema citocromo oxidasa activa la oxidación del citocromo, a su vez es reducido en agua o peróxido de hidrógeno.
Pruebas rápidas (lectura < 6 horas)	Aminopeptidasa	Se detecta pirronidil peptidasa a través del sustrato L-pirronidil-B-naftilamida, y se utiliza para reconocer <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Enterococcus spp.</i>
	Ureasa	La bacteria descompone la urea en amoníaco, es característico de los <i>Proteus</i> .
	Indol	Se degrada el triptófano y se detecta la liberación de indol.
Pruebas lentas (lectura 18-48 horas)	Rojo de metilo	Capacidad de la bacteria de mantener estables los productos terminales de tipo ácido.
	Fermentación de azúcares	Las bacterias anaerobias pueden fermentar los hidratos de carbono y genera gas.
	Coagulasa	Determina la capacidad de coagular el plasma. Diferencia a <i>Staphylococcus aureus</i> de otros <i>Staphylococcus</i> .
	Citrato	Determina si la bacteria usa citrato como su única fuente de carbono y se alcaliniza el medio

Fuente: (Cercenado 2018, p. 6).

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

2.2.4.6. Antibiograma

Es un método microbiológico que permite identificar el grado de sensibilidad a nivel *in vitro* de las bacterias frente a los antibióticos. Se coloca un inóculo bacteriano a una determinada concentración frente a un grupo antimicrobiano en un medio de cultivo, siendo el de elección agar Mueller Hinton. Los resultados del antibiograma se clasifican de la siguiente forma: sensibles, moderadamente sensibles y resistentes (Ortega et al. 2009, p.4).

Es importante poder determinar el grado de resistencia antimicrobiana que presentan las bacterias, ya que la resistencia o multirresistencia dificulta el tratamiento de patologías, incrementar costos en la salud, ocasionar la muerte del paciente, etc., (OMS 2020, p.10).

2.2.5. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es la supervivencia de las bacterias gracias a diferentes mecanismos desarrollados en presencia de una presión selectiva negativa (antibiótico, antiséptico, desinfectante, anticuerpos, complemento, células macrófagas, metales pesados) que desarrollan las bacterias, las cuales, son naturalmente resistentes a varios antibióticos (Quizhpe, 2018, p.5).

2.2.5.1. Tipos de resistencia bacteriana

La resistencia intrínseca es una propiedad natural de cada grupo bacteriano, por ejemplo, la resistencia propia de ciertas bacterias gram negativas frente a la vancomicina. Mientras que, la resistencia adquirida es variable y puede estar presente en una cepa bacteriana de una especie determinada, por ejemplo, la resistencia de cepas de estafilococos frente a la metilina. La resistencia adquirida es un rasgo que está en función directa de la variabilidad genética bacteriana y puede deberse a mutaciones de genes cromosómicos existentes y a la adquisición de material genético externo (Baires 2020, p. 160).

2.2.5.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana tanto natural como adquirida se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad (Perez y Robles 2018, p. 189).

Acción de los plásmidos: los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable. Algunos plásmidos y transposones poseen elementos genéticos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una cepa 14 multirresistente (Perez y Robles 2018, p. 189).

Inactivación del antibiótico: el fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación

de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las betalactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico (Perez y Robles 2018, p. 189).

Alteración del sitio blanco del antibiótico: consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras. En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal, los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S, los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas (Perez y Robles 2018, p. 190).

Alteración de las barreras de permeabilidad: este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula (Perez y Robles 2018, p. 190).

Bombas de eflujo: en la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo provee resistencia antimicrobiana tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias gram negativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula (Perez y Robles 2018, p. 191).

2.2.6. Actividad biológica de las bacterias

Las bacterias tienen la capacidad de producir metabolitos como es el caso de enzimas extracelulares, las cuales tienen como función la degradación de ciertos compuestos orgánicos complejos, para transformarlos en sustancias más simples y metabolizables, como es el caso de proteasas, lipasas, hidrolasas, amilasas, celulasas y quinasas (Centeno y Rodríguez, 2018, p.5).

2.2.6.1. Actividad proteolítica

Las bacterias proteolíticas son aquellas que poseen enzimas proteasas que catalizan la reacción

de hidrólisis de los enlaces peptídicos, las cuales participan en todo el ciclo de vida de los complejos proteicos desde su síntesis, activación y degradación. Estas bacterias proteolíticas tienen amplia aplicación en el área farmacéutica, médica, industria de alimentos y de detergentes. Además, se ha ligado el uso de este grupo de bacterias a los fines ambientales, ya que optimizan el uso de agentes químicos a nivel industrial (Hernández et al. 2017, p. 95).

A nivel general se muestra la clasificación de las enzimas proteolíticas en la Tabla 3-2 (Vigueras 2019, p. 4):

Tabla 3-2: Tipos de proteasas bacterianas

Familia	Cofactor	Sitios activos característicos	Intervalo de pH óptimo	Inhibidores	Fuente	Aplicaciones industriales
Serin-proteasas	Ca ²⁺	Asp, Ser, His	7-11	PMSF EDTA Fenol Ácido triaminoacético	Bacilo <i>Aspergillus</i> Tejido animal (intestino)	Detergentes, médica y farmacéutica.
Metaloproteasas	Zn ²⁺ Ca ²⁺	Glu, Try	7-9	Agentes quelantes como: EDTA, EGTA.	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	Alimenticia, médica y farmacéutica.
Proteasa de cisteína	ND	Cys, His, Asp	2-3	Indoacetamida p-CMB	<i>Aspergillus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Clostridium</i>	Alimenticia, médica y farmacéutica.
Proteasas aspárticas	Ca ²⁺	Asp, Asp	2,5-7	Pepstatin EPNP DAN	<i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i> <i>Penicillium</i> , tejido animal (estómago)	Alimentos y bebidas.

Fuente: Vigueras et al., 2019.

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

- *Estudio sobre la actividad proteolítica de las bacterias*

Una investigación realizada en México sobre las proteasas que degradan proteínas séricas humanas, determinó que, algunas cepas de *Escherichia coli* secretan peptidasas como Pic, Pet y TsH, cuyos genes se localizan a nivel de los plásmidos. Además, estas proteasas se caracterizan por ser estables a un amplio rango de temperatura de 28-55°C y pH de 5.6-9.5, sin embargo, en

temperaturas extremas como la congelación, pueden perder su actividad proteolítica en 24 horas mediante un proceso de autoproteólisis. Al evaluar sus factores de virulencia, se identificó la existencia de determinados genes que le dan resistencia a las sulfas, mercurio, antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, confirmando de este modo, su carácter de multirresistencia (Nájera 2018, p. 74).

Un estudio sobre la evaluación de la actividad proteolítica de bacterias del género *Staphylococcus*, proveniente de aguas residuales del cantón Shushufindi en Ecuador, señalo que, estas bacterias tienen la capacidad de degradar la caseína, obteniendo un valor de 2,8 sobre el índice de potencia de actividad proteolítica, por lo cual, se debería fomentar su aplicación a nivel de procesos industriales en el área alimentaria, para obtener un mayor beneficio a un menor costo (Soria 2020, p. 362).

2.2.6.2. Actividad lipolítica

Las bacterias con actividad lipolítica presentan enzimas que biocatalizan las reacciones de biosíntesis, intercambios de grupos químicas en sustancias oleosas, en la hidrólisis de enlaces tipo éster formados entre un ácido graso y un alcohol. A nivel general estas enzimas bacterianas se dividen en lipasas y esterasas, según la especificidad del sustrato y la sensibilidad a ciertos inhibidores bacterianos. Estas enzimas han sido agrupadas en ocho familias como se observa a continuación en la Tabla 4-2 (Navarro 2020, p. 46):

Tabla 4-2: Enzimas lipolíticas bacterianas

Familia	Cepa bacteriana	No. Acceso
I	<i>Pseudomonas aeruginosa (LipA)</i>	D50587
	<i>Burkholderia glumae</i>	X70354
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D11455
	<i>Bacillus subtilis (LipA)</i>	M74010
	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715
	<i>Propionebacterium acnés</i>	X99255
II (GDSL)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014
	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	M86351
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114
	<i>Moraxella spp.</i>	X53053
IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835
	<i>Pseudomonas spp. BII-I.</i>	AF034088

	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704
VI	<i>Synechocystis spp.</i>	D90904
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S79600
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842
	<i>Pseudomonas fluorescens SIK WI-</i>	AAC60471

Fuente: Navarro, M, 2020.

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

- Estudio sobre la actividad lipolítica de las bacterias

En Guatemala, en una evaluación sobre el aislamiento y caracterización de bacterias lipolíticas en aguas residuales de una planta de tratamiento de la Universidad de San Carlos, detectaron que, las bacterias *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron actividad lipolítica en el agar tributirina mediante la formación de halos de lipólisis. En los análisis se utiliza ampliamente este medio de cultivo, al ser un triglicérido formado por glicerol y ácido butírico y se distingue el proceso de lipólisis cuando se forma una zona clara alrededor de la colonia bacteriana en un agar turbio (Lickes 2019, p. 31).

Un estudio realizado en Colombia sobre la actividad lipolítica de *Serratia marcescens* en aguas residuales contaminadas con grasas, determinó que, esta bacteria es capaz de producir enzimas lipolíticas en un rango de temperatura de 30-50°C, siendo una enzima funcional y estable en pH alcalino en la hidrólisis de grasas. Al realizar el análisis de purificación de la enzima por electroforesis en gel, se observaron bandas que correspondieron a la enzima de interés, con un peso molecular de alrededor de 66 kDa, lo que coincide con bibliografía. Todas estas características de la enzima favorecen su aplicación tanto en la industria de detergentes como en los procesos de biorremediación de ambientes con elevados contenidos grasos (Pedroza et al, 2019, p. 43).

2.2.6.3. Actividad amilolítica

Las bacterias amilolíticas son aquellas que poseen enzimas que fermentan los hidratos de carbono

como el almidón y generan principalmente un compuesto llamado propionato (Barua et al. 2021, p. 6).

La amilasa es una enzima de gran utilidad en la industria alimentaria, almidonera, textil, de medicamentos, productos farmacéuticos, productos químicos y en la elaboración de la cerveza, por lo cual, se requiere de enzimas que tengan resistencia a condiciones como altas temperaturas y en la licuefacción del almidón (Ferrer et al. 2018, p. 65).

Además, bibliográficamente se conocen algunos ejemplos de bacterias con actividad amilolítica como las Pseudomonadaceae (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas otitidis*, *Pseudomonas guezenei*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas furukawai*, *Pseudomonas hunanensis*, etc.), Enterobacteriaceae (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*) y Moraxellaceae (*Acinetobacter johnsoni* y *Acinetobacter gyllenbergui*) (Barau et al., 2020).

- *Estudio sobre la actividad amilolítica de las bacterias*

Un análisis realizado en Argentina sobre el aislamiento e identificación de bacterias amilolíticas y tolerantes a cianuro procedente de las industrias almidoneras, determinó que los microorganismos *Acinetobacter oryzae* y *Acinetobacter johnsonii*, tienen la capacidad de degradar almidón y crecer en medios ricos en cianuro, ya que lo utilizan como fuente de nitrógeno. Es importante considerar que estas bacterias son abundantes en la naturaleza, por lo cual, tienen potencial en las actividades de biorremediación como el tratamiento de aguas residuales (Barua et al. 2021, p. 11).

En Colombia, en una investigación sobre la caracterización de microorganismos amilolíticos de residuos orgánicos de la planta *Ecosangil* del municipio de San Gil, Santander, determinó que las bacterias del género *Streptococcus spp.*, tienen actividad amilolítica, mediante la prueba cualitativa con lugol 1% y se observaron colonias pequeñas, irregulares, elevadas, de tono beige y el tamaño del halo fue de aproximadamente 7 mm (Gómez et al. 2018, p. 33).

2.2.6.4. *Actividad celulolítica*

La mayoría de las enzimas celulolíticas usadas en la industria provienen de hongos. Sin embargo, varias bacterias productoras de este tipo de enzimas presentan alta especificidad y efectividad. La aplicación de celulasas es amplia en la degradación de la celulosa presente en residuos orgánicos, en la industria de alimentos, azúcares fermentables, ácidos orgánicos, pulpas, bebidas, etanol, detergentes, textiles y tintas para papel (Viteri et al. 2018, p. 363).

Dentro de las bacterias productoras de celulasas se encuentran las siguientes: *Cellulomonas spp.*, *Cellvibrio spp.*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora spp.*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium thermocellum*, *Bacillus subtilis* (Ovando y Waliszewski 2017, p. 113):

- *Estudios sobre la actividad celulolítica de las bacterias*

En una observación ejecutada en España sobre las bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas con características probióticas, determinó a 9 bacilos celulolíticos gram negativos, con halos de degradación de hasta 12 o 14 mm de diámetro y mediante pruebas bioquímicas se identificó que pertenecen al género *Enterobacter aerógenes*, ya que degrada la fibra vegetal del pasto. Se analizó, además, su capacidad probiótica y de degradación del pasto, determinando que esta bacteria es capaz de crecer a temperaturas de 38-42°C, a pH entre 5-7, no se ve afectada por sales biliares y se adapta a condiciones de salinidad, sin embargo, puede llegar a afectar el crecimiento de *Escherichia coli* (Lara y Acosta 2019, p. 15).

En Perú una investigación sobre el aislamiento y evaluación de la actividad celulolítica de las bacterias rizosféricas del distrito de Bagua del Amazonas, determinó que, las bacterias de los géneros *Pseudomonas spp.*, y *Bacillus spp.*, reportaron actividad celulolítica, lo que puede deberse a que estas bacterias se encuentran en la rizosfera, donde hay materia orgánica en abundancia en comparación con suelos eriazos del mismo distrito, además, se debe tomar en cuenta que existen factores del medio ambiente que influyen en la actividad celulolítica como: nivel de nitrógeno, temperatura, pH, aireación, presencia de otros carbohidratos, humedad y la cantidad relativa de lignina a nivel de los restos vegetales (Lara y Acosta 2019, p. 15).

2.2.7. Cepario

Los ceparios son centros donde se preservan los microorganismos, para garantizar su disponibilidad, ya sea en actividades de investigación, docencia o comerciales, estos centros son el sitio de depósito de los microorganismos aislados, identificados y caracterizados a partir de diferentes muestras, que se han realizado en distintos períodos de tiempo. Además, en el cepario se debe garantizar los siguientes aspectos: preservación de los microorganismos, mantener la viabilidad de los microorganismos, conservar la pureza y homogeneidad y asegurar la estabilidad bioquímica, microscópica, fisiológica y genética (Gutiérrez et al. 2019, p. 96).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque y diseño de investigación

El presente trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo con diseño no experimental, de tipo analítico y descriptivo, de corte transversal, basado en la determinación de la actividad biológica de las bacterias que se encontraban previamente aisladas e identificadas en el cepario de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

3.2. Nivel de investigación

Este estudio tuvo un nivel de investigación descriptivo y analítico, debido a que se determinó la pureza de las bacterias del cepario, se confirmó su identidad mediante pruebas bioquímicas y se evaluó la actividad proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica.

3.3. Diseño de investigación

3.3.1. *Según la manipulación o no de la variable independiente*

Diseño no experimental. En las fases del estudio no existió manipulación de variables y se realizó el análisis e identificación de las bacterias del cepario, con el fin de conocer las actividades biológicas (proteolítica, lipolítica, celulolítica, amilolítica), actividad antagónica y susceptibilidad microbiana.

3.3.2. *Según las intervenciones en el trabajo de campo*

Diseño de corte transversal, el análisis se realizó en el período de septiembre 2022 – febrero 2023, en el que se evaluó la actividad biológica de las bacterias del cepario.

3.4. Tipo de estudio

El proyecto de investigación fue de campo, ya que la identificación y análisis de las bacterias del cepario, se desarrolló en el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, para evaluar la pureza de las bacterias, confirmar su identidad, su actividad biológica, actividad antagónica y la susceptibilidad microbiana.

3.5. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de muestra

3.5.1. Población

La población de estudio fueron 23 bacterias patógenas y 15 ácido lácticas que se encontraban aisladas e identificadas en el cepario ubicado en el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

3.5.2. Muestra

Para la selección de la muestra de estudio, se realizó un muestreo no probabilístico a conveniencia, considerando las bacterias que cumplieron con los criterios de inclusión.

3.5.2.1. Criterios de inclusión

- Bacterias con potencialidades
- Bacterias que bibliográficamente posean actividad biológica
- Tubos de recolección de muestra de 1mL-2mL, con muestras no contaminadas
- Bacterias que muestren pureza a la tinción de gram
- Bacterias que muestren confirmación a pruebas bioquímicas

3.5.2.2. Criterios de exclusión

- Bacterias contaminadas
- Tubos de recolección de muestra de 1mL o 2mL, con cepas bacterianas contaminadas
- Muestras en microtubos graduados, no viables
- Muestras que presenten mezclas de bacterias en la tinción de gram
- Bacterias que no confirmen pruebas bioquímicas completas

3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.6.1. Activación bacteriana

Para promover una reactivación bacteriana, se llevó a cabo el siguiente procedimiento, como se indica en la Ilustración 1-3:

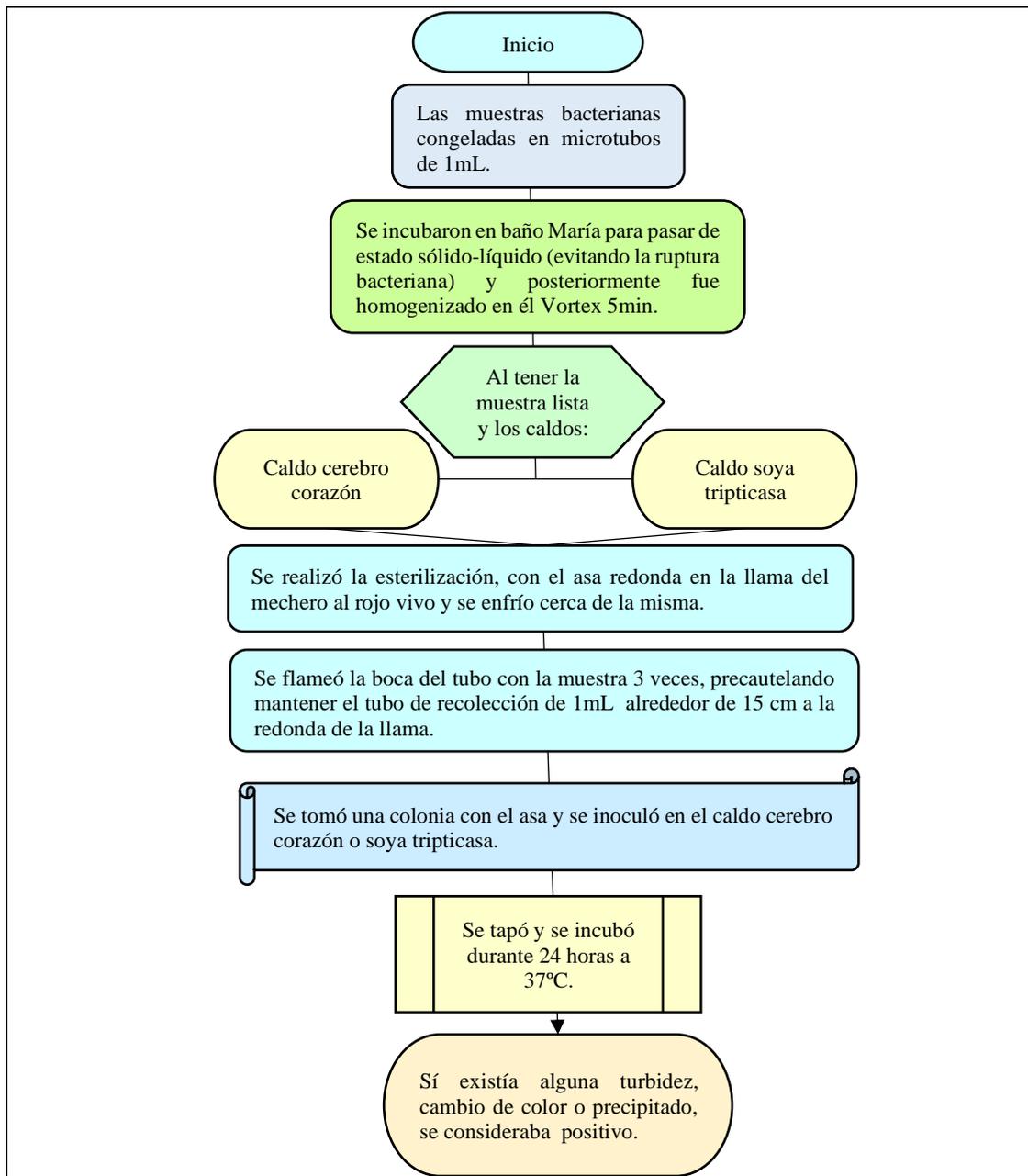


Ilustración 1-3: Reactivación de cepas bacterianas

Fuente: (Hernández 2022, p.13)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.2. Tinción de gram

Para realizar la tinción de gram de las bacterias aisladas, se procedió de la siguiente manera, como se observa en la Ilustración 2-3:

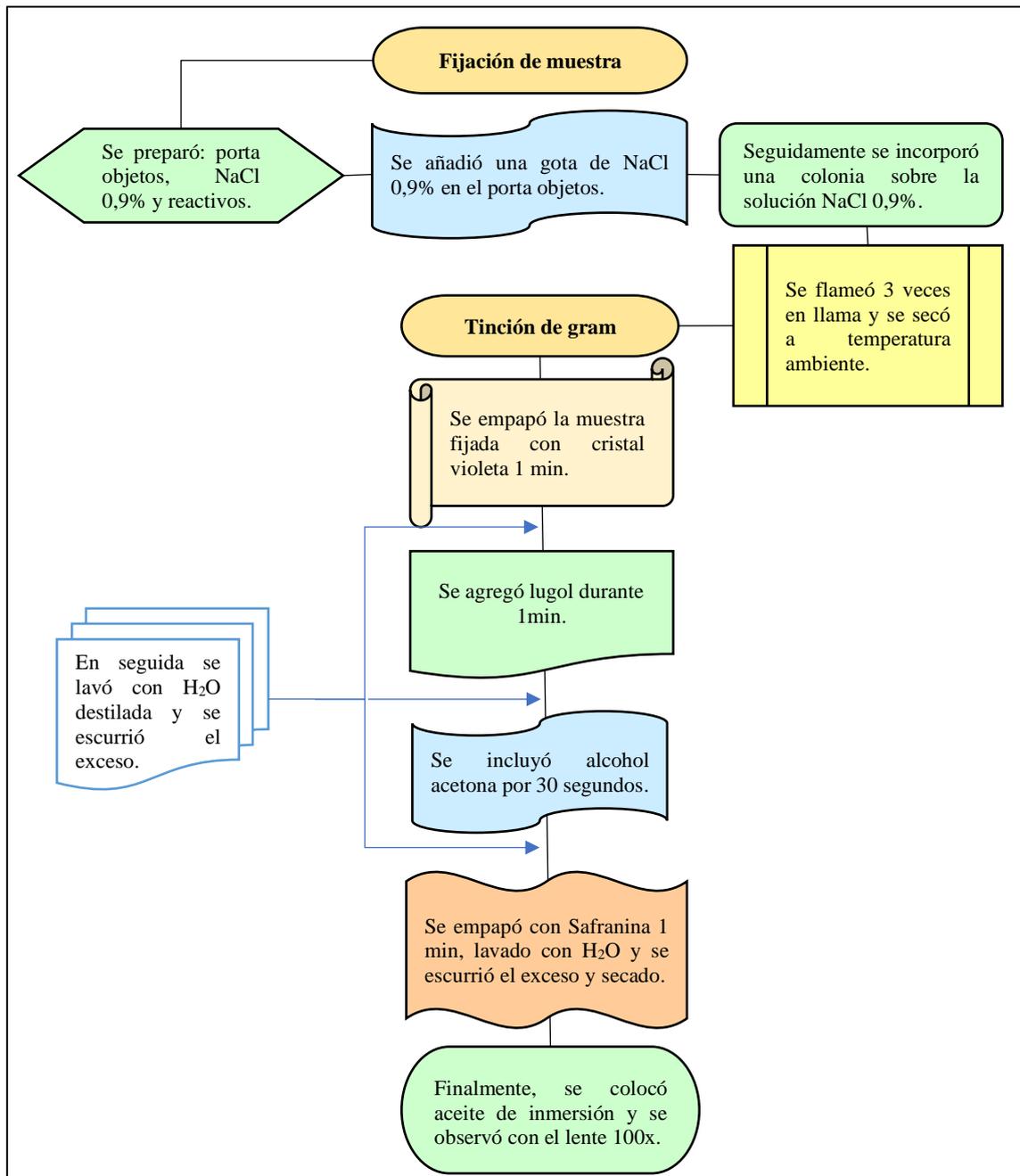


Ilustración 2-3: Tinción de las bacterias

Fuente: (Jimena y Bado, 2022)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.3. Aislamiento de bacterias en medios de cultivo

Para poder purificar las muestras se aplicó el siguiente proceso, como se indica en la Ilustración 3-3:

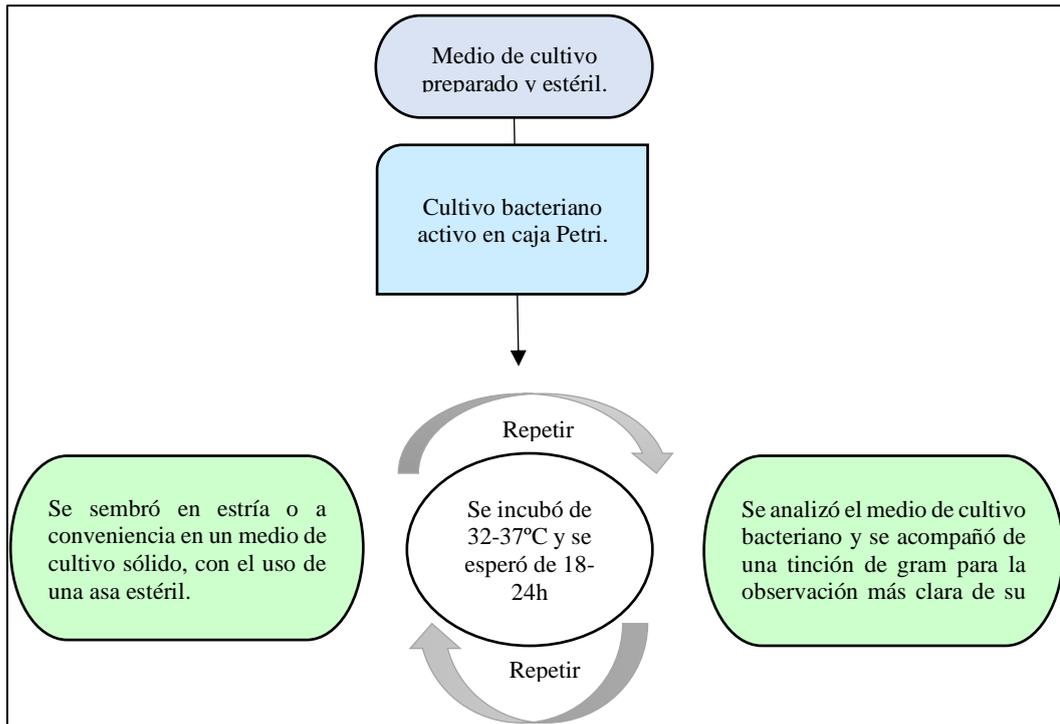


Ilustración 3-3: Aislamiento bacteriano

Fuente: (Jimena y Bado, 2022)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.4. Catalasa

Con el objetivo de diferenciar algunas bacterias se realizó el test de aislamiento de catalasa y oxidasa como se observa en la Ilustración 4-3:

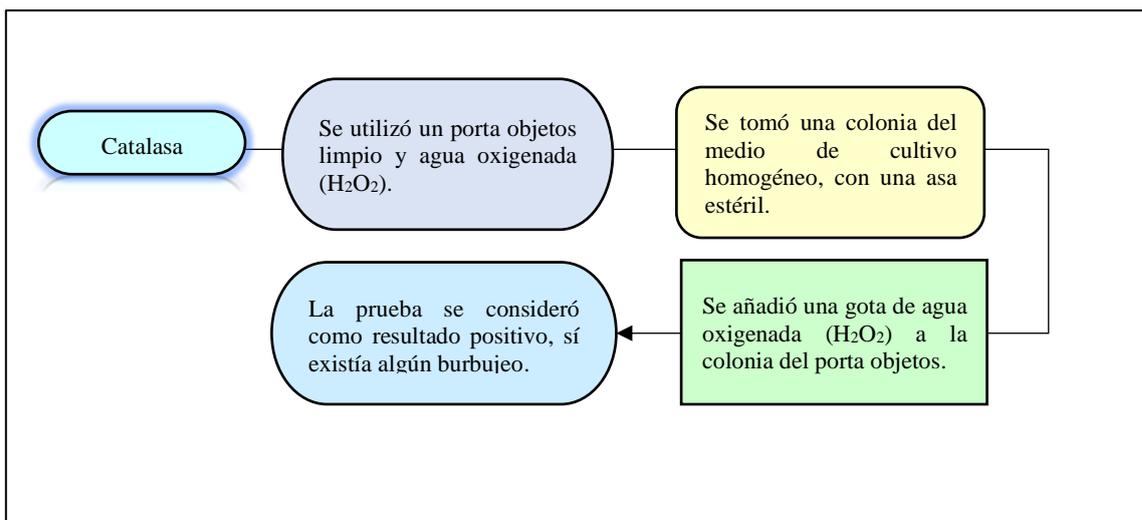


Ilustración 4-3: Prueba de catalasa

Fuente: (Castellanos y Pérez, 2020, pp. 87-88)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.5. Oxidasa

Con la finalidad de presenciar la reducción del citocromo-oxidasa de algunas especies bacterianas, se llevó a cabo el siguiente ensayo conforme a la Ilustración 5-3:

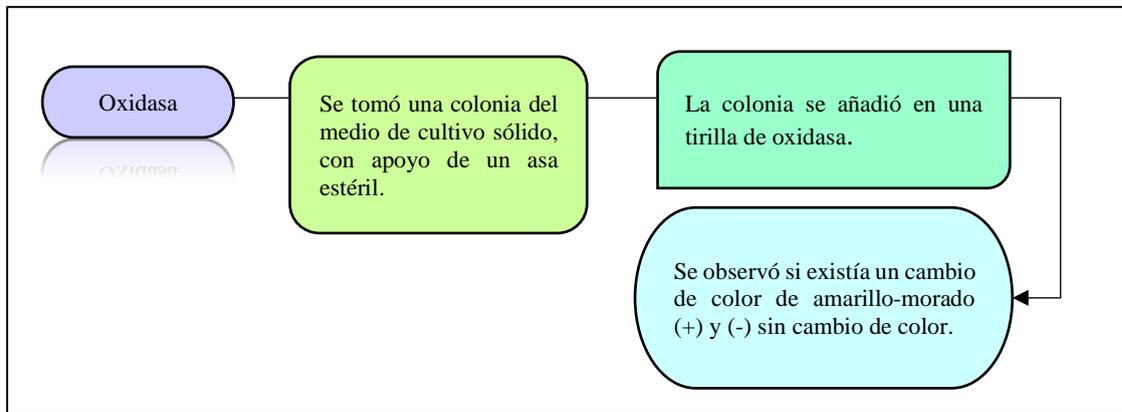


Ilustración 5-3: Prueba de oxidasa

Fuente: (Castellanos y Pérez, 2020, pp. 87-88)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.6. Pruebas bioquímicas

Para confirmar el género y especie de las bacterias, se realizó las siguientes pruebas bioquímicas, como se indica en la Ilustración 6-3:

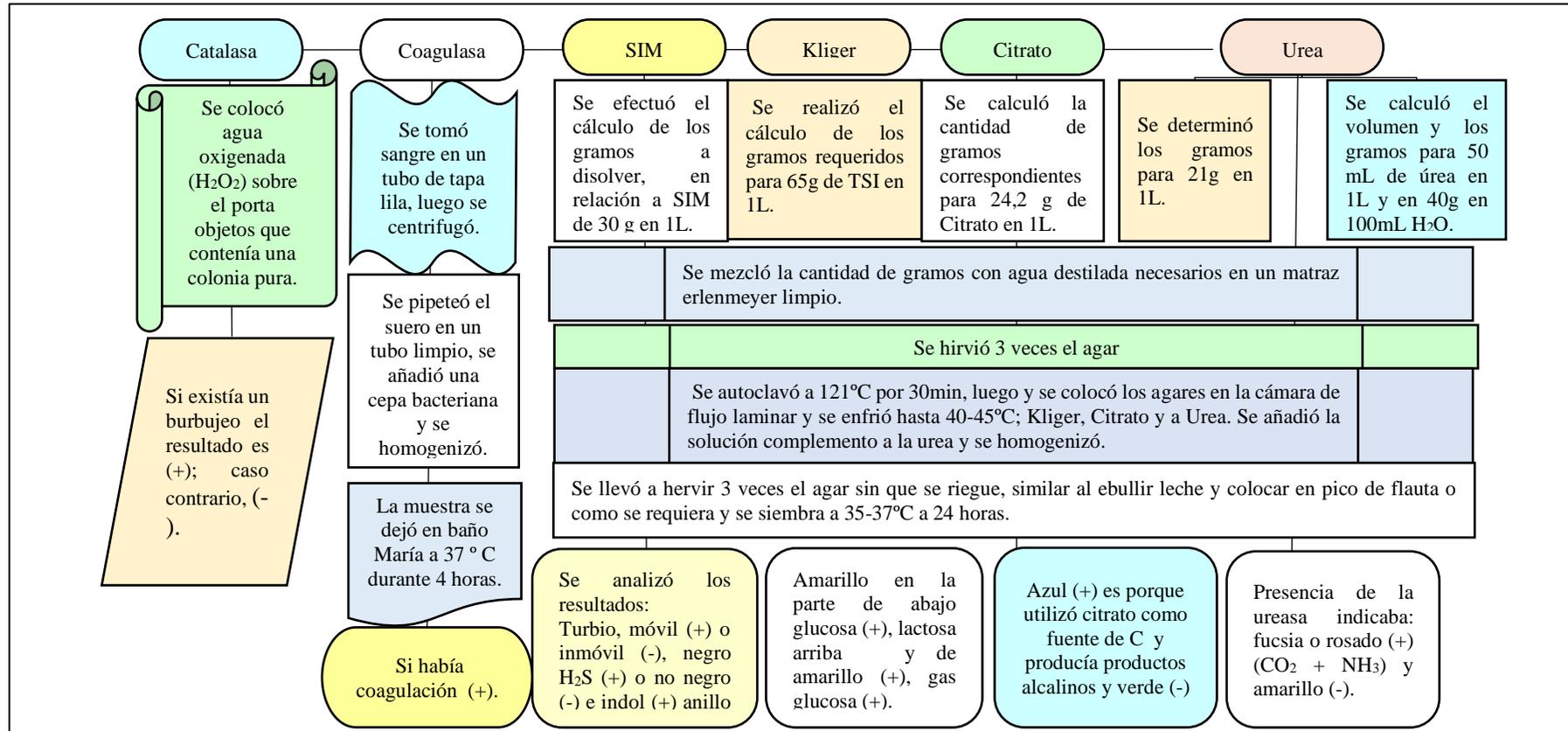


Ilustración 6-3: Pruebas de identificación

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.7. Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para demostrar la existencia de bacterias ácido lácticas se utilizaron las pruebas de caracterización como se expone en la Ilustración 7-3:

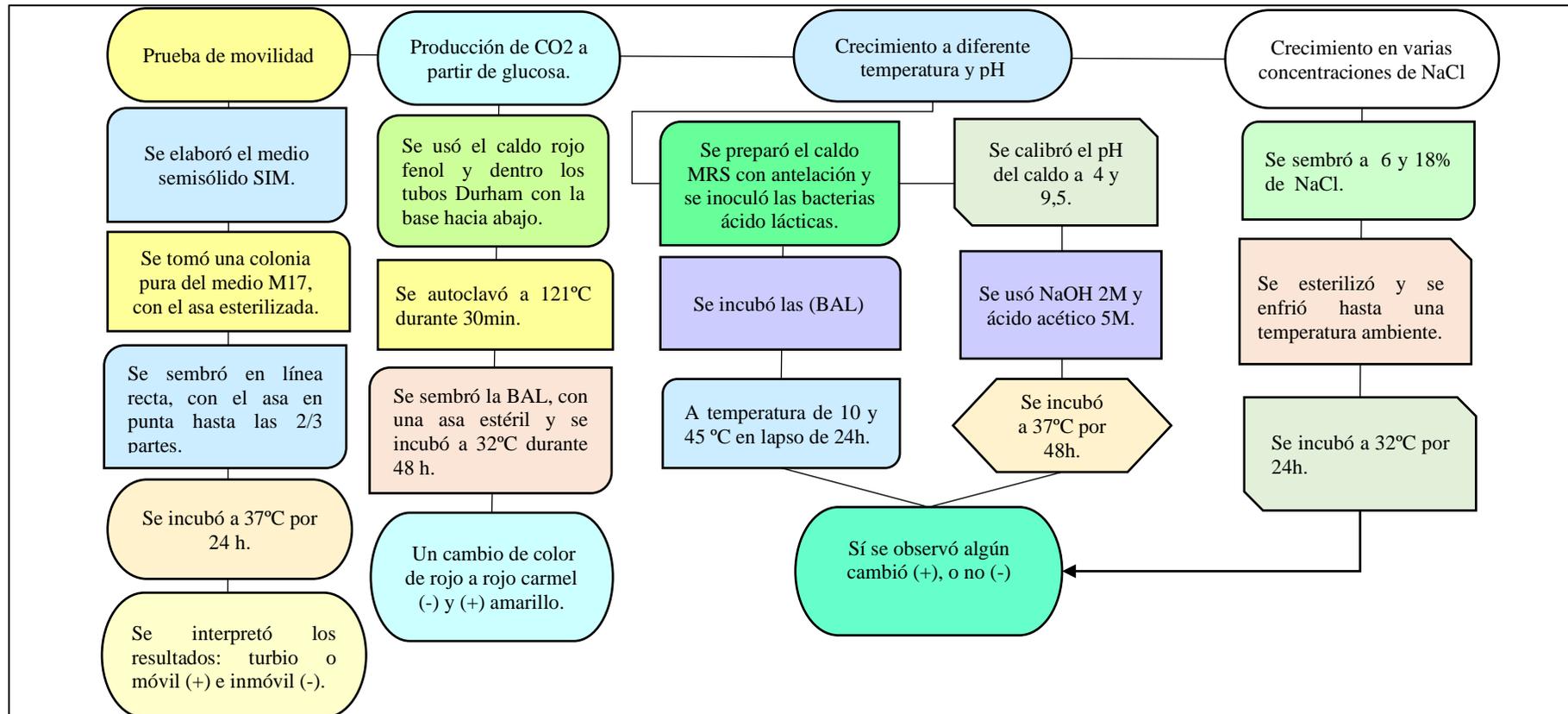


Ilustración 7-3: Características de BAL

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.8. Actividad proteolítica

Para determinar la actividad proteolítica se usó la siguiente técnica como se señala en la Ilustración 8-3:

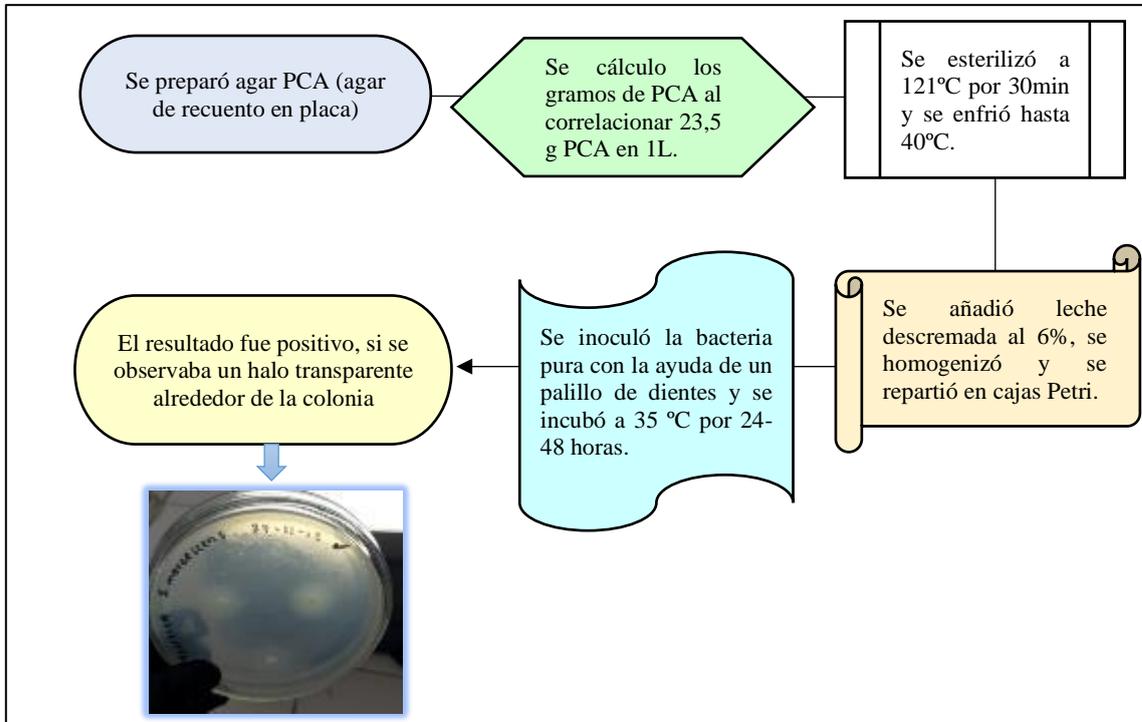


Ilustración 8-3: Actividad proteolítica

Fuente: (Camacho 2018, p. 30).

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.9. Actividad lipolítica

Para evaluar la actividad lipolítica se empleó la siguiente metodología, como se indica en la Ilustración 9-3:

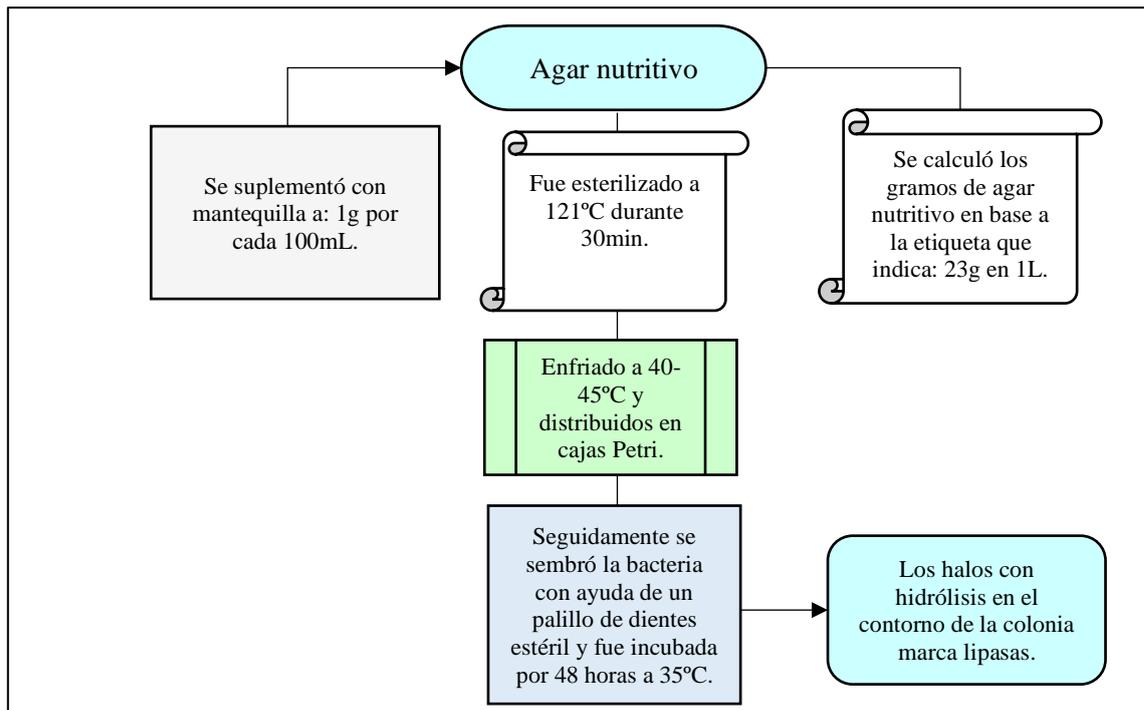


Ilustración 9-3: Actividad lipolítica

Fuente: (Soria y López 2020, p. 1097).

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.10. Actividad amilolítica

La evaluación se ejecutó en el medio de cultivo Patata Dextrosa, se sembró en picadura la cepa bacteriana purificada y se procedió a incubar por un día a 35°C. Al finalizarse dicho tiempo se añadió una capa de lugol y si mostraba un repentino aclaramiento alrededor de las colonias, se consideraba un resultado positivo (Valencia et al. 2011, p. 148).

3.6.11. Actividad celulolítica

Se preparó en agar nutritivo suplementado de CMC al 1 por ciento (p/v), (auto-clavado a 121°C hasta 15 minutos, dejado enfriar y vertido en placas Petri). Se inoculó y se incubó por 35°C durante 24 horas, más adelante se incorpora el revelador de rojo congo al 1 por ciento (p/v), pasado 15 minutos, se elimina el exceso y se incorpora NaCl 1 M, y se espera 15 minutos adicionales para visibilizar los halos hidrolizados, que alude positivo (Gaitán 2007, p. 21).

3.6.12. Inhibición a patógenos (antagónica)

Se empleó el método Kirby Bauer de difusión en disco, se inoculó el/los microorganismos patógenos de interés en agar MRS, posteriormente se agregó el disco de control de gentamicina

10 ug, luego se depositaron los discos en blanco e impregnados con la solución de (*Lactobacillus spp.* de 1.5×10^8 células/ml, con la técnica de McFarland) y se incubó a 37 °C por 24 horas. Al finalizar se midieron los halos de inhibición que determina la sensibilidad y el porcentaje de inhibición (halo *Lactobacillus spp.* - halo blanco/ halo Gentamicina - halo blanco) x 100 por ciento, de *Lactobacillus spp.* frente a bacterias investigadas (Churqui 2018, p. 34).

3.6.13. Técnica de conservación bacteriana en glicerol

Con la finalidad de haber mantenido la diversidad biológica de las bacterias evaluadas en: 10 bacterias patógenas y 9 BAL, se conservaron de forma ex situ en caldos: cerebro corazón y MRS, más un crioprotector de glicerol al 30% y se colocaron a temperatura de (-2 a -20 °C), como se menciona en la Ilustración 10-3:

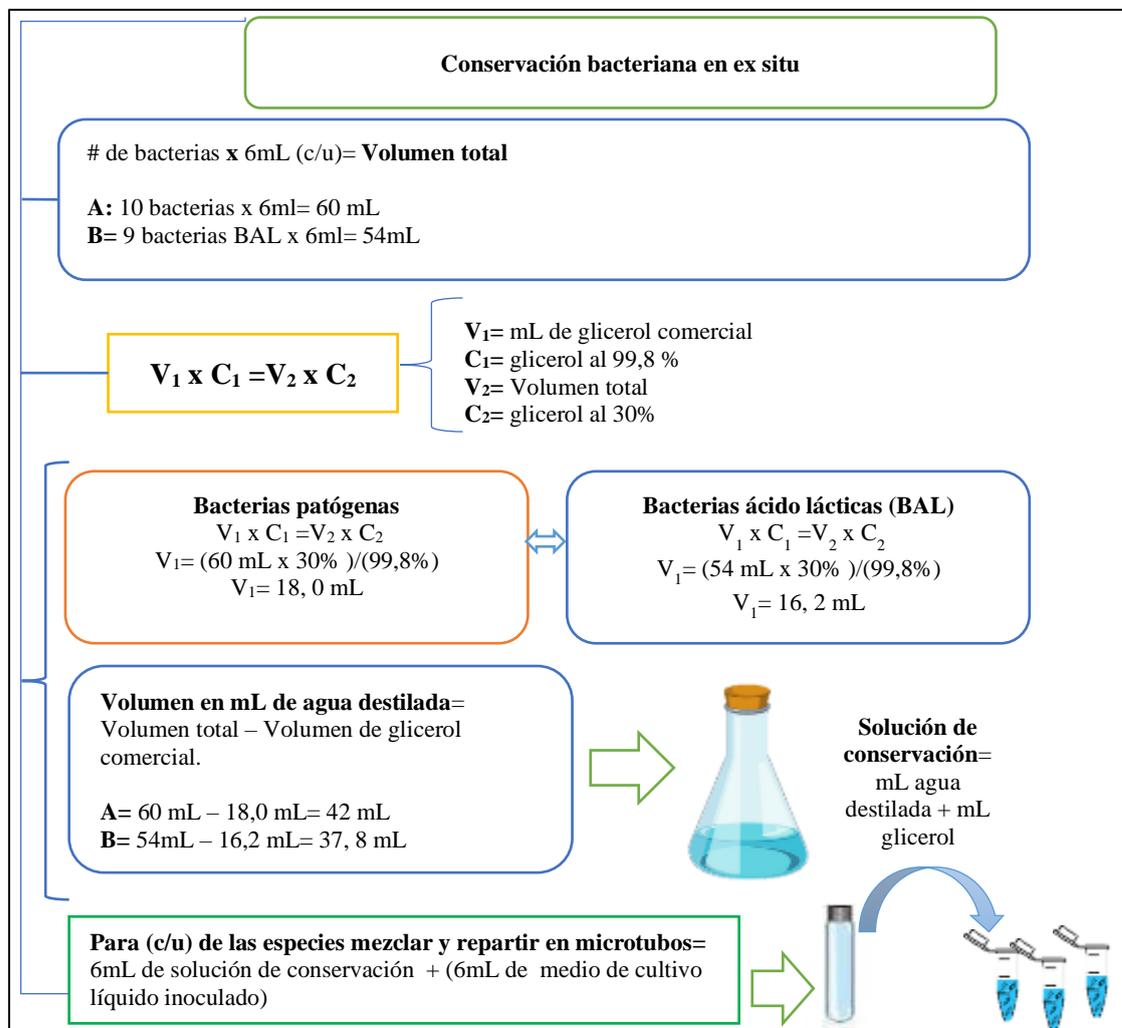


Ilustración 10-3: Técnica de conservación bacteriana en glicerol

Fuente: (Cueva y Mayorga 2021, pp. 46-47)

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

3.6.14. Resistencia microbiana

3.6.14.1. Antibiograma

Se usó el método difusión en disco de Kirby y Bauer. Se preparó una solución estandarizada McFarland que contenía las bacterianas estudiadas por agotamiento en agar Müller Hinton en caso de enterobacterias, MRS para BAL y se colocó los discos de susceptibilidad. Se midieron los halos de inhibición resultantes en mm con una regla y se comparó con la tabla de criterios (CSLI-NCCLE, 2021), que definió si era sensible o resistente a los distintos antibióticos empleados (Toroco, 2000).

Para desarrollar el trabajo de investigación se procedió en tres etapas:

Fase I: Identificar la pureza de las bacterias del cepario mediante tinción de gram y pruebas bioquímicas

Fase II: Realizar los ensayos para determinar la actividad proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica de las bacterias.

Fase III: Evaluar la actividad antagónica mediante pruebas de crecimiento frente a patógenos

Fase IV: Realizar el test de susceptibilidad microbiana a las bacterias aisladas por el método de difusión en disco.

El proceso general se resume a continuación en la Ilustración 11-3:

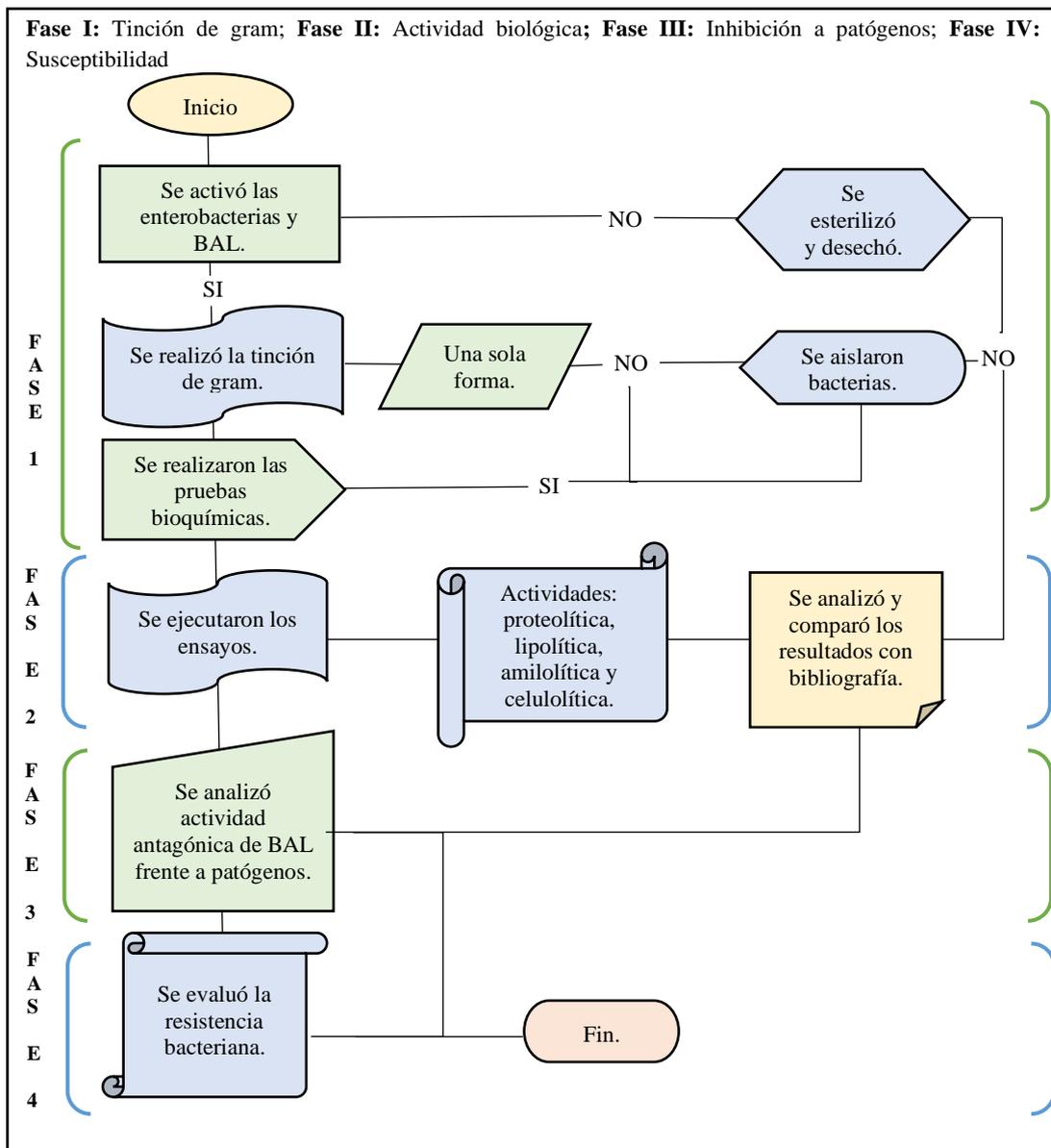


Ilustración 11-3: Etapas del desarrollo del trabajo de investigación

Realizado por: Rosero Fauri, 2023.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para determinar la actividad biológica de las bacterias del cepario, ubicado en el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, se realizó el aislamiento y pruebas bioquímicas que confirmaron la identidad de las bacterias en género y especie. A continuación, se evaluó las actividades: proteolítica, lipolítica, celulolítica, amilolítica, antagonica de las BAL frente a patógenos y se completó con la prueba de susceptibilidad microbiana a este grupo de bacterias, obteniendo los siguientes resultados:

4.1. Pureza de las bacterias

Más adelante, en la Tabla 1-4 se muestran las características morfológicas de las bacterias como el tamaño, color, textura, forma, margen y la elevación, mientras que, a nivel microscópico se evaluó la cepa bacteriana a través de la tinción de gram y su morfología.

Tabla 1-4: Caracterización macro y microscópica de las bacterias identificadas

Características macro y microscópica de las bacterias											
N° bacteria	Medio	Fermentación	Morfología macroscópica de la colonia						Morfología microscópica		Nombre científico
			Tamaño	Color	Textura	Forma	Margen	Elevación	Gram	Morfología	
1	MacConkey	Positivo	Colonias pequeñas a medianas	Café translúcidas	Suave	Circular	Entera	Convexa	Negativo	Cocobacilos	<i>Serratia marcescens</i>
	EMB	Positivo	Colonias pequeñas	Blanco translucido							
2	MacConkey	Negativo	Colonias pequeñas	Ámbar translúcidas	Suave	Irregular	Ondulado	Elevada	Negativo	Bacilos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	MacConkey	Positivo	Colonias medianas	Ámbar translúcidas	Suave cremosa	Irregular	Ondulada	Elevada	Negativo	Diplobacilos	<i>Proteus mirabilis</i>
	EMB	Positivo	Colonias pequeñas	Blancas transparentes	Suave						
4	MacConkey	Positivo	Colonias medianas	Rosadas pálidas	Cremosa	Circular	Entera	Puntiforme	Negativo	Cocobacilos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	EMB	Positivo	Colonias pequeñas	Ámbar translúcidas	Suave						
5	EMB	Positivo	Colonias pequeñas	Rosadas pálidas	Suave	Circular	Entera	Convexa	Negativo	Cocobacilos	<i>Enterobacter aerogenes</i>
6	MacConkey	Positivo	Colonias medianas	Café translúcidas	Cremosa	Irregular	Ondulada	Elevada	Negativo	Diplobacilos	<i>Enterobacter cloacae</i>
7	MacConkey	Positivo	Colonias pequeñas	Rosadas translúcidas	Cremosa	Circular	Entera	Convexa	Negativo	Diplobacilos pequeños	<i>Yersinia enterocolitica</i>

	EMB	Positivo	Colonias medianas								
8	MacConkey	Negativo	Colonias medianas	Rosadas intensas	Cremosa	Irregular	Ondulada	Elevada	Negativo	Bacilos individuales	<i>Escherichia coli</i>
	EMB	Positivo	Colonias pequeñas	Verde metálico brillante	Rugosa						
9	Manitol	Positivo	Colonias pequeñas	Amarillas	Suave	Circular	Convexa	Entera	Positivo	Diplo y tetra cocos	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Sangre	Positivo	Colonias medianas	Amarillas con Hemólisis beta.	Suave						
10	Manitol	Negativo	Colonias pequeñas	Blancas traslucidas	Suave	Circular	Convexa	Entera	Positivo	Cocos en racimos de uvas	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	Sangre	Positivo	Colonias pequeñas	Blancas con Hemólisis gama	Suave						

Fuente: Alvarez et al, 1995

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se ve en la Tabla 1-4, con el fin de caracterizar a las bacterias gram-positivas, se utilizó el medio manitol salado, un agar diferencial que posee una alta concentración salina, siendo de elección para bacterias que crecen en medios de altas concentraciones de sal, producen ácidos, causando la fermentación de manitol, modifican el pH del medio y dando un viraje de color de rojo a amarillo. El medio manitol es recomendado para aislar colonias de estafilococos que se pueden encontrar en alimentos, cosméticos, muestras clínicas, etc., (Britania 2021, p. 1). Con este medio de cultivo fue posible identificar de cepas de: *Staphylococcus aureus* que fermentaron el medio manitol y se visualizaron colonias amarillas, mientras que, *Staphylococcus saprophyticus* no fermentó manitol permaneciendo el color rojo, con colonias traslucidas y redondeadas.

Para identificar bacterias gram negativas, se utilizó el medio de cultivo Agar MacConkey - Becton Dickinson, el cual, tiene lactosa como hidrato de carbono fermentable, además, posee sales biliares y cristal violeta, que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas (UCV 2018, p. 2). Este medio es idóneo para aislar Enterobacterias, causando que las colonias adquieran una tonalidad rosa-rojiza y, además, pueden presentar un halo de precipitación biliar, destacando las siguientes bacterias: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli*, mientras, que las bacterias que no fermentan lactosa permanecen incoloras como *Pseudomonas aeruginosa*.

De igual forma, el agar EMB permitió confirmar el crecimiento de enterobacterias, bacilos gram negativos, entre otros. Este medio posee indicadores como el azul de metileno y la eosina, que inhibieron el crecimiento de cepas gram positivas, por lo cual, las colonias fermentadoras de sacarosa o lactosa como *Escherichia coli*, presentaron colonias azuladas o verde brillo metálico, sin embargo, ciertas bacterias como *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*, se caracterizan por presentar colonias incoloras (Britania 2021, p. 2).

4.2. Pruebas bioquímicas de confirmación bacteriana

Una vez aisladas las bacterias del cepario, se empleó las pruebas bioquímicas para garantizar la autenticidad bacteriana, como se indica a continuación en la Tabla 2-4, Tabla 3-4 y Tabla 4-4.

Tabla 2-4: Pruebas de identificación a enterobacterias

Pruebas bioquímicas para enterobacterias.										
N	SIM		Kliger				Citrat o	Urea	Oxidasa	Nombre científico
	Movilidad	Indol	Glucosa	Gas	Lactosa	H ₂ S				
1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2	+	-	+	+	+	-	+	V (-)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
3	V (+)	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>
4	-	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	+	-	+	V(+)	-	+	V(+)	+	-	<i>Proteus mirabilis</i>
6	-	V (-)	+	-	-	-	-	V (-)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>
7	+	-	+	V (+)	-	-	+	V (-)	-	<i>Serratia marcescens</i>

Fuente: Álvarez et al, 1995

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se indica en la Tabla 2-4, se determinó que el mayor porcentaje de patógenos aislados correspondieron a la familia de las Enterobacterias, que son bacterias gram negativas.

Al realizar las pruebas bioquímicas, se observó que, el medio SIM permitió evaluar la producción de indol y la movilidad. En cuanto a la movilidad, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*, presentaron resultado positivo debido a la presencia de enturbiamiento en el medio de cultivo y en cuanto a la producción de Indol, se observó que, únicamente *E. coli* presentó un resultado positivo al colocar el reactivo de Kovacs, debido a la acción enzimática de la triptofanasa que degrada al aminoácido para formar indol. En un estudio sobre “Evaluación del medio de cultivo motilidad-indol modificado en COHEM de Guantánamo”, se determinó que, el triptófano es un aminoácido que forma la tripteína y es metabolizado por diversas bacterias que forman el indol. En este proceso participan las enzimas triptofanasa, de modo que, el indol producido se combina con el reactivo de Ehrlich o de Kovacs, con el fin de originar un compuesto rojo fenol (Expósito et al. 2019, p.2).

También se evaluó la capacidad de fermentar carbohidratos como la glucosa y lactosa, conociendo que, todas las bacterias degradaban glucosa, mientras que, la lactosa fue degradada por las enterobacterias analizadas excepto *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica* y *Serratia marcescens*.

Además, en cuanto a la producción de ácido sulfhídrico, únicamente *Proteus mirabilis* dio un resultado positivo. Un artículo sobre “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología”, menciona que, la actividad de las bacterias sobre ciertos aminoácidos que tienen en su composición azufre ocasiona de forma frecuente la liberación de ácido sulfhídrico, al emplear sales de metales pesados, como, por ejemplo, el hierro, de modo que, el ácido reacciona con los metales y se produce una coloración oscura en el medio (Bou et al. 2018, p. 8).

Algunas enterobacterias tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, ocasionando la alcalinización en el medio, dando un viraje de color azul, excepto casos como *Escherichia coli* y *Yersenia enterocolítica*. Además, al evaluar la producción de ureasa se observó que, únicamente *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* dieron positivo, siendo una prueba que permite diferenciar a estas especies bacterianas dentro del grupo de las Enterobacterias. Una investigación constato que, las enzimas de tipo ureasa con alto contenido de nitrógeno orgánico, están presentes en las bacterias: *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, que descomponen el nitrógeno orgánico al hidrolizar la enzima ureasa y producir amoníaco y agua (Pérez et al. 2018, p. 41).

Para identificar bacterias del género *Pseudomonas* se realizaron las pruebas de confirmación descritas en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Pruebas de identificación en *Pseudomonas*

Pruebas para <i>Pseudomonas</i>									
SIM		Kliger				Citrato	Urea	Oxidasa	Nombre científico
Movilidad	Indol	Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	H2S				
+	-	+	-	-	-	+	V (+)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fuente: Álvarez et, al, 1995

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se indica en la Tabla 3-4, mediante las pruebas de identificación fue posible determinar que, *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por ser una bacteria gramnegativa, de tipo aeróbica y que presenta motilidad por los flagelos polares en su estructura (Paz et al. 2019, p. 180).

Esta bacteria dio positivo en movilidad, fermenta glucosa, citrato y oxidasa. Un estudio sobre *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y de los medicamentos de resistencia, mencionó que, esta bacteria se caracteriza por ser aerobia estricta en un medio de oxidación/fermentación que es suplementado con glucosa, además, presentan una reacción positiva a oxidasa, reducen los nitratos a nitrógeno, causan una fluorescencia en el medio y utilizan citrato y urea, aunque en ocasiones pueden arrojar resultados como variable positiva (Ruiz 2018, p. 49).

Para identificar bacterias del género *Staphylococcus* se realizaron las pruebas de confirmación descritas en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Pruebas de identificación en *Staphylococcus*

Pruebas para <i>Staphylococcus</i>					
Nº. De bacteria	Catalasa	Coagulasa	Resistencia a novobiocina	Oxidasa	Nombre científico
9	+	+	-----	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	+	-	Resistente	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Fuente: Álvarez et al, 1995

Realizado por: Rosero Fauri, 2023

Como se indica en la Tabla 4-4, con las pruebas bioquímicas también se identificaron dos especies de cocos como: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*.

En los resultados obtenidos, mostró que, *Staphylococcus aureus* dio una reacción positiva a catalasa y coagulasa, mientras que, *Staphylococcus saprophyticus* fue coagulasa negativa. Un análisis sobre “Características generales de *Staphylococcus aureus*”, menciona que, la mayor parte de estafilococos son catalasa positiva, que es una enzima capaz de romper la molécula de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre, además, esta característica sirve para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*, al ser catalasa negativa (Cervantes et al. 2018, p. 28).

En el caso de las bacterias que no causan coagulación del plasma, destacan *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* (Fariña et al. 2018, p. 480).

Al evaluar la resistencia a la novobiocina y teniendo de referencia un estudio sobre: “*Staphylococcus saprophyticus* como agente etiológico de la infección urinaria”, se concluyó que, dentro de los criterios para diferenciar esta bacteria de los demás *Staphylococcus*, se encuentra:

coagulasa negativa y resistencia a la novobiocina, que es un antibiótico aminocumarina (Estrada et al. 2018, p. 293).

4.3. Actividades enzimáticas a enterobacterias

Se realizó los ensayos para las actividades: proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica a las bacterias, obteniendo los resultados descritos en la Tabla 5-4:

Tabla 5-4: Actividades enzimáticas de las bacterias identificadas

Presencia o ausencia de las actividades					
N.	Proteolítica	Lipolítica	Amilolítica	Celulolítica	Bacteria
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Enterobacter cloacae</i>
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
3	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>Escherichia coli</i>
	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
4	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
5	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	<i>Proteus mirabilis</i>
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
6	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
7	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Serratia marcescens</i>
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
9	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
10	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	

	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
--	----------	----------	----------	----------	--

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se observa en la Tabla 5-4, con el análisis de las actividades enzimáticas, se encontró que: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*, presentaron los cuatro tipos de actividades: proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica. En una observación sobre “Mecanismos de patogénesis de *Serratia marcescens*”, se evidenció que, esta bacteria posee una actividad lipolítica gracias a la acción de la lipasa extracelular (LipA), que es un sitio activo de la serinas esterasas, mientras que, la actividad proteolítica se debe a que secreta hasta cuatro proteasas; sin embargo, la serralisina y la metaloproteasa (PrtA), son las más activas (Venanzio 2018, p. 22).

Todas las bacterias analizadas mostraron actividad proteolítica, que se evidenció por la formación de un halo transparente alrededor de las colonias. Además, es importante aportar un dato adicional, que, al medir los halos de las actividades, *Pseudomonas aeruginosa*, presentó halos de mayor tamaño, es decir, fue la bacteria con mayor actividad lipolítica. Una investigación sobre “Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas aeruginosa*”, determinó que, las bacterias a nivel industrial tienen ventajas en la producción de proteasas por su rápido crecimiento y por la manipulación del material genético, por lo que, bacterias como *Serratia spp.*, *Aeromonas spp.*, *Enterobacter spp.* y *Pseudomonas spp.*, se caracterizan por producir proteasas alcalinas, termoestables, con variedad de sustratos y con potencial biotecnológico (Paredes 2018, p. 450).

Al evaluar la actividad lipolítica, se observó que las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus saprophyticus*, no presentaron esta actividad, porque no se formaron halos de hidrólisis en el contorno de las colonias, mientras que, *Escherichia coli*, fue la bacteria con mayor actividad lipolítica, al haberse hallado, un halo más pronunciado. En un análisis sobre “Enzimas lipolíticas bacterianas”, se evidenció que, estas enzimas poseen ventajas como su bajo costo, una obtención en gran cantidad, son estables y se producen fácilmente en los medios de cultivo. Algunas bacterias productoras de estas enzimas son: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Maraxella spp.*, entre otros (Navarro 2020, p. 49).

En cuanto a la actividad amilolítica, las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fueron las únicas especies que no presentaron dicha actividad, ya que, al añadir lugol al medio, no se evidenció un aclaramiento alrededor de las colonias. Por otro lado, *Klebsiella pneumoniae* mantuvo un halo más pronunciado en comparación a las demás bacterias, lo que indicó una alta actividad amilolítica.

Al evaluar la actividad celulolítica resultó que, todas las bacterias analizadas presentaron esta actividad biológica excepto *Staphylococcus saprophyticus*, ya que no se visualizó un halo en el medio de cultivo de papa dextrosa. Asimismo, al realizar la medición de los halos, se observó que *Klebsiella pneumoniae*, presentó un halo de mayor diámetro, siendo un indicativo que la bacteria presenta una alta actividad celulolítica. Un estudio sobre “Evaluación de la sacarificación de residuos cítricos empleando microorganismos productores de celulosomas”, evidenció que, las bacterias *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*, mostraron actividad celulolítica, al darse de cuenta, de la existencia fuentes de carbono complejas como: celobiosa y carboximetilcelulosa (López 2019, p.74).

4.4. Antibiograma a enterobacterias

Tabla 6-4: Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia Enterobacteriaceae

N.º		1	2	3	4	5	6	7	8	
Nombre científico		<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Serratia marcescens</i>	
Antimicrobianos	AMP	10 ug	R	I	I	S	R	I	S	I
	C	30 ug	I	I	R	I	I	I	R	I
	CIP	10 ug	R	R	I	S	R	R	I	R
	CN	25 ug	S	S	I	S	I	I	S	S
	CRO	5 ug	R	R	S	S	S	I	S	I
	FF	200 ug	S	S	S	R	S	S	R	S
	K	30 ug	R	S	R	I	R	I	R	I
	SXT	30 ug	R	R	R	S	R	R	S	R
<p>AMP; Ampicilina, C; Cloranfenicol, CIP; Ciprofloxacina, CN; Gentamicina, CRO; Ceftriaxona, FF; Fosfomicina, K; Kanamicina SXT; Trimetoprim-sulfametoxazol, S: Sensible, R; Resistente, I; Resistencia intermedia.</p>										

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se observa en la Tabla 6-4, al llevar a cabo, la prueba de resistencia bacteriana se determinó que, *Enterobacter aerogenes* fue sensible a: gentamicina, fosfomicina, intermedicamente sensible a: cloranfenicol, ciprofloxacina y mostró resistencia a: ampicilina, ciprofloxacina, kanamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Por otro lado, *Enterobacter cloacae*, mostró sensibilidad a: gentamicina, fosfomicina y kanamicina, intermedicamente resistente: ampicilina, cloranfenicol, ceftriaxona y una resistencia a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol.

En base al Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CSLI), se recomienda que los antibióticos apropiados para conocer la resistencia bacteriana en enterobacterias sean: ampicilina, cefazolina, gentamicina y tobramicina. Sin embargo, al presentar resistencia a dichos antibióticos, se aconseja conocer la susceptibilidad con: amikacina, azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, imipenem, trimetoprim-sulfametoxazol, entre otros (CSLI 2021, p. 21).

Los resultados obtenidos pueden deberse a que el género *Enterobacter*, tiene una resistencia intrínseca a los generadores de betalactámicos como; amoxicilina, ampicilina, cefalosporinas tanto de primera generación: cefapirina, cefazolina y tercera generación: ceftriaxona, debido a la expresión de la enzima betalactamasa cromosomal AmpC (González et al. 2018, p. 193). Además, en un estudio, sobre la: “Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias”, se evidenció un resultado similar al presentar *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* resistencia a ceftriaxona, nitrofurantoína, amoxicilina más sulbactam y ampicilina (Navarro, Miró y Mirelis 2019, p. 640).

En el caso de *Escherichia coli*, indicó una sensibilidad a: ceftriaxona, fosfomicina, medianamente sensible: ampicilina, ciprofloxacina y gentamicina y mostró resistencia a kanamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. En una investigación, observaron que, esta bacteria posee resistencia a los betalactámicos, no obstante, ha desarrollado una barrera de evasión y de producción de: betalactamasas de amplio espectro (BLEA), así como también, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (García 2018, p. 4).

De manera similar, en un análisis sobre el “Perfil microbiológico de microorganismos aislados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del hospital Lambayeque en Perú del año 2019-2020”, definieron que, *E. coli*, es generalmente resistente a los productores de betalactamasas: ampicilina y diaminopiridina: trimetoprim-sulfametoxazol, debido a los factores de resistencia como plásmidos codificadores de BLEE, los mismos que avanzan hacia penicilinas, cefalosporinas de primera-segunda generación y tetraciclinas. Inhabilitándoles su acción y ocasionando que las bacterias evadan este mecanismo, por ello, la resistencia bacteriana continuará evolucionando y generando problemas, siendo necesario la búsqueda de nuevas alternativas de antibióticos para

este tipo de bacterias (Chilon, Muñoz y Silva 2022, p. 335-343).

Es importante resaltar otro artículo de “*Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario en un centro provincial de higiene y epidemiología de Guantamo en el año 2019”, donde se expresó, resistencia a la ampicilina 61%, cefalosporinas: cefaxolina 17%; aminoglucósidos: gentamicina y kanamicina en un 16% y 9% respectivamente; quinolonas: ciprofloxacino 17 %, recalcando, no sólo número de bacterias investigadas, sino más bien, un necesario cálculo de los porcentajes mostrados con antelación (Expósito et al. 2019, pp. 1-10).

En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, ha adquirido resistencia a varios grupos terapéuticos, principalmente a los betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Sin lugar a duda, una de las causas para que *Klebsiella pneumoniae*, esté más propensa a burlar los mecanismos de otros grupos de antibióticos, han sido los factores de resistencia como la multiplicación de carbapenemasas o BLEE y en el caso de fluoroquinolonas se debe a la codificación de las topoisomerasas del ADN (Morosini 2018, pp. 1-41).

Se analizaron cuantitativamente las sustancias productoras de *Klebsiella pneumoniae*, en el artículo sobre “Las infecciones nosocomiales del hospital Monte Sinai de Cuenca, en los años 2018-2020”, donde los resultados arrojaron que, las enzimas que les proveen resistencia bacteriana son las betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. De igual manera, se habría realzado el reconocimiento de antimicrobianos en las infecciones ocasionales de vías urinarias, septicemia, entre otras, identificando que, los antibióticos más usados fueron la colistina y tigeciclina, no obstante, presentó sensibilidad a gentamicina, ciprofloxacina, ceftriaxona, fosfomicina, ampicilina más sulbactam en porcentajes de 77,4%, 61,3%, 63,9%, 87,2% y 55,8% respectivamente (Merchan y Gerardo 2021, pp 1-14).

En cuanto a *Proteus mirabilis*, la bacteria fue sensible a ceftriaxona y fosfomicina, presentó resistencia intermedia a cloranfenicol, gentamicina y resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, kanamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Esta bacteria se caracteriza por no sintetizar naturalmente betalactamasas, además, su resistencia adquirida a la ampicilina, por sintetizar una betalactamasa típica (TEM-1), mientras que, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se dio por las BLEE (Cantón y Sánchez 2019, p. 5). Una investigación sobre “*Proteus mirabilis* productor de AmpC plasmídica en el área sanitaria de Santiago de Compostela”, determinó que, esta bacteria era sensible al antibiótico amikacina y resistente a azitromicina, nitrofurantoína y amoxicilina más sulbactam (Treviño et al. 2019, p. 122).

Pseudomonas aeruginosa, tuvo sensibilidad únicamente a fosfomicina, resistencia media en

ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, ceftriaxona, kanamicina y una resistencia a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol. Esta bacteria se caracteriza por presentar resistencia intrínseca a diversos antibióticos (penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación), a causa de una baja permeabilidad de su membrana externa y la producción de betalactamasas cromosómicas (AmpC), mientras que, con el tiempo ha adquirido resistencia a carbapenémicos como el imipenem, debido a la combinación de AmpC con la pérdida de porinas OprD (Martínez y Pascual 2018, p. 3). Según el CSLI, para evaluar la resistencia bacteriana de *P. aeruginosa* se recomienda el uso de antibióticos como ceftazidima, gentamicina, tobramicina, piperacilina más tazobactam, amikacina y para una posible resistencia se usa ciprofloxacino, kanamicina. Además, se caracteriza por presentar resistencia a gentamicina, por lo que, puede decirse, que se ocuparon antibacterianos ideales para esta investigación (CSLI 2021, p. 104).

En cuanto a *Yersinia enterocolitica*, presentó sensibilidad en ampicilina, gentamicina, ceftriaxona, trimetoprim-sulfametoxazol; sensibilidad mediana a: ciprofloxacina, mientras que, mostró resistencia a cloranfenicol, fosfomicina y kanamicina. La bacteria produce betalactamasas cromosómicas de clase A y C, como penicilinasas y cefalosporinasas inducibles que vuelven a *Yersinia enterocolitica* resistente a cefalosporinas de primera y segunda generación, ampicilina, gentamicina, ceftriaxona (Oliver y Cantón 2018, p. 1). Un artículo de: “Control de calidad de bacteriología, del programa de control de calidad SEIMC, año 2018”, se observó que, *Yersinia enterocolitica* mostró sensibilidad a ceftriaxona, mientras que, fue resistente a kanamicina, fosfomicina y cloranfenicol (Torró 2018, p. 4).

La última bacteria evaluada dentro de este grupo fue *Serratia marcescens*, que manifestó sensibilidad a: gentamicina, fosfomicina, sensibilidad intermedia a ampicilina, cloranfenicol, ceftriaxona, kanamicina y resistencia a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol. Su resistencia intrínseca a diversos antibióticos como aztreonam y cefalosporinas de tercera generación se debe a la producción de betalactamasas de espectro extendido, mientras que, la resistencia adquirida a quinolonas surge por mutaciones a nivel de los genes que codifican la DNA-girasa, causando una reducción de la afinidad de estos antibióticos a la sub-unidad A. Además, para tratar a *Serratia marcescens* se recomienda la combinación de aminoglicósidos con quinolonas o cefalosporinas de tercera generación, para prever una mejor efectividad terapéutica (Ledermann et al. 2018, p. 235). Una investigación de: “Infecciones intrahospitalarias de *Serratia marcescens*” determinó que, esta bacteria tenía resistencia intermedia a cloranfenicol y era resistente a amoxicilina, ampicilina, nitrofurantoina, cefoxitina y cefalosporinas de primera generación (Ledermann et al. 2018, p. 235).

4.5. Resistencia bacteriana a micrococcus

Tabla 7-4: Test de susceptibilidad antibacteriana familia Micrococcaceae

Antibiograma			Familia: Micrococcaceae	
N°			1	2
Nombre científico			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Antimicrobianos	AMC	30 ug	S	R
	EM	15 ug	S	R
	DA	2 ug	S	R
	ME	5 ug	S	R
	VA	30 ug	R	R
	OX	1 ug	R	R
AMC; Amoxicilina más ácido clavulánico, EM; Eritromicina, DA; Clindamicina, ME; Meticilina, VA; Vancomicina, OX; Oxacilina, S; Sensible, R; Resistente es igual a 6 mm del diámetro disco de antibiótico; I; Resistencia intermedia				

Fuente: CLSI-NCCL, 2021

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se indica en la Tabla 7-4, al evaluar la susceptibilidad antibacteriana de las bacterias de la Familia Micrococcaceae, se determinó que, *Staphylococcus aureus*, fue sensible a amoxicilina más ácido clavulánico, eritromicina, clindamicina y metilina, mientras que, presentó resistencia a vancomicina y oxacilina.

En un estudio similar sobre “La guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*”, se evidenció que, la variabilidad de *S. aureus* va desde *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) y *Staphylococcus aureus* sensible a metilina (SASM), en la que detalla el uso de: clindamicina, amoxicilina más ácido clavulánico, cefalexina para (SASM) y en el caso de SARM, se usa clindamicina y las combinaciones de vancomicina con fosfomicina o rifampicina (Mensa et al. 2018, pp. 45-47). A pesar de ello, es indispensable precisar que, a pesar de la sensibilidad a metilina, esta bacteria tiene un igual potencial infeccioso en los individuos (Camarena y Sánchez 2018, pp. 1-5).

En un artículo de “Diseminación de cepas *Staphylococcus aureus* sensible a metilina (SASM) relacionadas genéticamente, perteneciente al CC45, en Medellín-Colombia”, se avaló la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a la metilina, con la circulación de varios clones de la bacteria, comprobando que, existe un gran porcentaje de pacientes pediátricos del sexo masculino que disponían de cepas de interés, que correspondían a un complejo clonal por encima del 50% y se hallaban en padecimientos de impétigo y forunculosis (Rodríguez et al. 2019, pp. 159-165).

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena tanto a nivel comunitario y hospitalario. En un análisis sobre la “Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del hospital clínico Viedma”, se evidenció una resistencia significativa a: amoxicilina, oxacilina, sultamicilina (resistencia cromosómica por receptores PBP2), no obstante, tuvo sensibilidad a vancomicina en un 100%, por lo cual, fue el antibiótico más útil para combatirlo (Lazo et al. 2018, p. 17).

En el caso de *Staphylococcus saprophyticus*, dio resistencia a todos los antibióticos evaluados. Esta bacteria es iniciadora de las infecciones de vías urinarias no complicadas en mujeres jóvenes y en ocasiones causa uretritis, pielonefritis aguda y epididimitis. Una investigación sobre “Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* en un hospital público”, determinó que, la bacteria era resistente en: 100% a amoxicilina más ácido clavulánico, 50% a piperacilina, 50% a ciprofloxacino, 33,3% a levofloxacino, 75% a la ceftriaxona, 100% a tobramicina y 75% a sulfametoxazol, mientras que, es sensible a la amikacina y al imipenem, que son antibióticos de amplio espectro, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio (Raraz et al. 2021, p. 636).

4.6. Morfología macroscópica y microscópica de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Tabla 8-4: Evaluación micro y macroscópicas de las bacterias ácido lácticas

N°	Nombre científico	Código	Cepas	Medio	Morfología macroscópica de la colonia						Caracterización microscópica	
					Tamaño	Color	Textura	Forma	Margen	Elevación	Tinción de gram	Morfología
1	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO 26	CO#1	M 17	Pequeña	Blanca	Suave Cremosa	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
2	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CO 28	BA#2	M 17	Mediana	Blanca	Suave	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CO 39	CO#3	M 17	Pequeña	Blanca	Suave	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
4	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	C0 47	BA#4	M 17	Pequeña	Blanca	Suave	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BAL 15	BA#5	M 17	Pequeña	Blanca	Suave	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
6	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BAL 18	BA#6	M 17	Pequeña	Blanca	Suave	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
7	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO26	CO26	M 17	Pequeña	Blanca	Suave Cremosa	Irregular	Ondulada	Convexa	Positiva	Cocos
8	<i>Enterococcus faecium</i>	CA5	CA5	M 17	Pequeña	Blanca	Rugosa	Circular	Entera	Convexa	Positiva	Cocos
9	<i>Lactococcus spp.</i>	BA 20 4	BA 20 4	M 17	Mediana	Blanca	Suave	Circular	Entera	Elevada	Positiva	Cocos
				MRS								

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se observa en la Tabla 8-4, para la evaluación de las características micro y macroscópicas de las bacterias ácido lácticas se utilizó el agar M17 para: *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Enterococcus faecium*. El medio sólido M17 posee propiedades nutritivas como: peptona, extracto proteico de carne y levadura, además, la adición de gliceraldehído de sodio, le prevé una capacidad de mantener el pH aproximadamente menor a 5,7 y una energía proveniente del hidrato de carbono de lactosa, siendo condiciones oportunas de crecimiento, aislamiento y de recuento para el género: *Lactococcus* etc. Por otro lado, está el caldo y agar MRS, que, al relacionar con la composición de M17, son similares, pero varían en ciertos aspectos: no se agrega gliceraldehído, tiene magnesio para un mejor crecimiento y citrato de amonio, el cual, inhibe el crecimiento de las bacterias gram negativas y evita un secado excesivo de la superficie del medio, ya que es viable la manifestación de acetato de sodio y el mismo prohíbe el desarrollo de *Lactobacillus spp.* (Britania 2018, p. 1).

Las BAL en cuanto a su morfología macroscópica fueron cocos gram positivos, que formaron colonias pequeñas y medianas, blancas, de textura suave y cremosa, de forma irregular excepto *Enterococcus faecium* y *Lactococcus spp.*, que presentaron colonias circulares y, además, la mayoría fueron colonias convexas, excepto en el caso de *Lactococcus spp.*, que muestran colonias elevadas.

Las BAL son un grupo de bacterias que están relacionadas por la producción de ácido láctico como su principal metabolito o como su producto de fermentación. En un estudio, llevado a cabo en Cuenca sobre “Identificación bioquímica y evaluación de la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas aisladas de quesillos“, se evidenciaron diversas características macroscópicas, entre las cuales están: la formación de colonias pequeñas, dispersas, cremosas, puntiformes, de superficie convexa, con bordes irregulares, consistencia húmeda y además, poseían un olor ácido, que son características similares a las reportadas en este estudio (Méndez 2018, p. 51).

4.7. Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL)

Tabla 9-4: Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL)

N°	Nombre científico	Cepa	Pruebas bioquímicas		Hemólisis en agar sangre	SIM	Producción de CO ₂ a partir de glucosa	Crecimiento a diferente temperatura		Crecimiento en diverso pH		Crecimiento a concentraciones de NaCl	
			Catalasa	Oxidasa				10°C	45°C	4	9,6	6%	18%
1	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO#1	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
2	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	BA#2	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CO#3	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
4	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#4	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#5	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
6	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#6	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
7	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO26	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
8	<i>Enterococcus faecium</i>	CA5	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
9	<i>Lactococcus spp.</i>	BA 20 4	Negativo	Negativo	Gamma	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

En la Tabla 9-4 se observan las características de las bacterias ácido-lácticas y se determinó que todas las BAL dieron como resultado catalasa y oxidasa negativo, además, presentaron hemólisis gamma en agar sangre y dieron positivo para crecimiento a diferente temperatura (10 y 45°C), crecimiento a distinto pH (4 y 9,5) y crecieron a una concentración de 6% de NaCl mientras que, a concentraciones altas (18%) no se observó el crecimiento de ninguna de las bacterias analizadas.

Se considera que, algunas bacterias patógenas tienen la capacidad de producir hemólisis que causan la lisis de los glóbulos rojos en el medio de cultivo agar sangre, pero, las bacterias ácido-lácticas, difieren de éstas, al carecer de una enzima llamada hemolisina, no ocasionan la ruptura de los hematíes. En el Salvador se realizó un análisis sobre “Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas obtenidas de tilapias cultivadas en el Lago Ilopango” y se determinó que, las BAL presentaron una hemólisis gamma, es decir, son microorganismos no patógenos, ya que no producen la lisis de las células sanguíneas del medio de cultivo, por lo que fueron consideradas como alternativa para probióticos, debido a que, dentro de los requisitos de una bacteria probiótica se encuentran: gram positivas, hemólisis gamma, amplia tolerancia a cambios de pH y debe tener una actividad antibacteriana mediana o alta (Palacios 2019, p. 51).

Este grupo de bacterias también se caracteriza por mostrar una tinción de gram positiva al ser homofermentativas, puede crecer a diferentes temperaturas, altas concentraciones de sal y tiene tolerancia alcalina o ácida. (Ramirez et al. 2018, p. 3). En Perú, se realizó un estudio sobre: “Producción y evaluación de inóculos lácteos probióticos del lechón” donde se evaluó la tolerancia al pH (2,5, 3,5 y 4.5), tolerancia a la sal (5%, 9% y 13%) y la tolerancia a las sales biliares (1%, 5% y 10%) de siete cepas de BAL. Como resultados se obtuvo que, *Lactobacillus reuteri* y *Enterococcus faecium* fueron tolerantes a todos los rangos evaluados de pH, sal y sales biliares, lo que indica que, este grupo de bacterias tiene la capacidad de crecer en condiciones complejas (Rojas et al. 2021, p. 126).

Una investigación realizada en Colombia sobre “Bacterias ácido-lácticas: papel funcional en los alimentos”, determinó que, las BAL se clasifican en mesófilas o termófilas, de acuerdo a su temperatura ideal de crecimiento. Las mesófilas son bacterias que pueden crecer de 20-25°C con una acidez final de 0,8% de ácido láctico (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*), mientras que, las bacterias termófilas se caracterizan por crecer de 40-45°C y con una acidez final de 0,9% de ácido láctico (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus casei*). Esto indica que, los bacilos toleran de mejor forma las temperaturas elevadas de incubación, mientras que, los cocos crecen a temperaturas menores a 25% (Parra 2017, p. 97).

Un artículo sobre la “Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el Estado de Hidalgo”, para evaluar las cepas a través de pruebas bioquímicas, utilizaron cepas congeladas en caldo MRS y para la evaluación bioquímica usaron la ficha técnica API 50 CHL, observando que, los bacilos, cocos y cocobacilos gram positivos dieron negativo para las pruebas de catalasa (no produjeron gas tras la adición de peróxido de hidrógeno) y oxidasa (no se observó viraje en la coloración tras la adición de clorhidrato de tetrametil p-fenil endiamina) (Ortíz 2019, p. 33).

4.8. Actividades enzimáticas de bacterias ácido lácticas

Se determinó cualitativamente las actividades: proteolítica, lipolítica, amilolítica y celulolítica, en las bacterias ácido-lácticas, obteniendo los resultados descritos en la Tabla 10-4.

Tabla 10-4: Evaluación de la actividad biológica de las bacterias ácido-lácticas

Presencia o ausencia de enzimas en bacterias ácido lácticas (BAL)						
N.º de bacteria	Nombre científico	Código	Proteolítica	Lipolítica	Amilolítica	Celulolítica
1	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO#1	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
2	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#2	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CO#3	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
4	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#4	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#5	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
6	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#6	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
7	<i>Lactococcus cremoris</i>	CO26	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
8	<i>Enterococcus faecium</i>	CA5	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
9	<i>Lactococcus</i> <i>spp.</i>	BA 20 4	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se observa en la Tabla 10-4, se realizó la evaluación de la actividad biológica de las bacterias ácido-lácticas y se determinó que, todas las bacterias evaluadas presentaron actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica, mientras que, ninguna BAL tuvo actividad celulolítica.

Las bacterias con actividad proteolítica tienen la capacidad de degradar las proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos libres, mientras que, la actividad lipolítica, se debe a biocatalizadores que actúan sobre los enlaces éster de los triacilgliceroles presentes en las grasas (Rodríguez y Chávez 2018, p. 50). En el caso de las bacterias ácido-lácticas, su actividad proteolítica y lipolítica influye en la capacidad de formar compuestos de aroma y sabores típicos, debido a la presencia de ácidos grasos, transformaciones enzimáticas de los aminoácidos, ácidos orgánicos y dióxido de carbono (Parra 2017, p. 95).

Un estudio desarrollado en México sobre “Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso”, realizó el análisis de la actividad proteolítica en agar Litmus milk BD y de la actividad lipolítica en agar con 1% de nata añadida (36% de grasa), determinando que, las bacterias *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* presentaron actividad proteolítica, mientras que, *Lactobacillus acidophilus* fue la única bacteria ácido láctica que presentó actividad lipolítica (Ramírez y Vélez 2018, p. 120).

En cuanto a la actividad amilolítica de las bacterias ácido-lácticas se ha observado la capacidad de ciertas bacterias de producir ácido láctico a partir de la fermentación del almidón, para lo cual, se deben considerar tres medios de cultivo con alto, medio y bajo contenido nutricional (Tejada 2019, p. 23).

De acuerdo a un análisis sobre “Evaluación de bacterias ácido-lácticas en las propiedades sensoriales, reológicas, fisicoquímicas y microbiológicas de masas ácidas”, se determinó que, las bacterias *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus sanfranciscensis* son las BAL más utilizadas para la hidrólisis del almidón, influyendo en las propiedades reológicas (extensibilidad, elasticidad y textura) y sensoriales de los alimentos (olor y sabor) (León et al. 2018, p. 3).

4.9. Actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas frente a patógenos

Se ejecutó el ensayo de inhibición a patógenos por parte de las bacterias ácido-lácticas (BAL) mediante la valoración de los diámetros de las bacterias, el control positivo (gentamicina 10 ug) y el control negativo (disco en blanco más agua estéril). Los resultados obtenidos se describen a continuación en la Tabla 11-4.

Tabla 11-4: Porcentaje de inhibición de la actividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas (BAL) frente a patógenos

Actividad antagónica de las bacterias ácido-lácticas a patógenos											
Fórmula		Porcentaje (%) de inhibición= $(\Phi \text{ halo } Lactococcus \text{ spp.} - \Phi \text{ halo blanco} / \Phi \text{ halo Gentamicina} - \Phi \text{ halo blanco}) \times 100 \%$									
Cepa	N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Nombre científico	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
CO#1	<i>Lactococcus cremoris</i>	0,00%	0,00%	52,94%	80,00%	71,42%	76,92%	0,00%	0,00%	52,63%	50,00%
BA#2	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	93,33%	84,61%	88,23%	82,35%	76,47%	85,71%	92,85%	82,35%	59,09%	64,28%
CO#3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	68,75%	56,25%	52,94%	87,50%	78,57%	80,00%	0,00%	75,00%	70,00%	62,50%
BA#4	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	78,57%	66,66%	88,23%	93,33%	85,71%	84,61%	64,28%	92,85%	57,89%	57,14%
BA#5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	68,75%	0,00%	58,82%	81,25%	64,28%	80,00%	75,00%	75,00%	55,00%	50,00%
BA#6	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	92,85%	68,75%	70,58%	80,00%	92,85%	92,30%	85,71%	85,71%	57,89%	0,00%
CO26	<i>Lactococcus cremoris</i>	68,75%	56,25%	52,94%	75,00%	71,42%	80,00%	0,00%	75,00%	60,00%	50,00%
CA5	<i>Enterococcus faecium</i>	73,33%	69,23%	70,58%	82,35%	64,70%	57,14%	78,57%	88,23%	54,54%	50,00%
BA 20 4	<i>Lactococcus spp.</i>	80,00%	61,53%	82,35%	82,35%	64,70%	71,42%	0,00%	70,58%	59,09%	57,14%

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Fuente: (Churqui 2018, p. 34).

Como se observa en la Tabla 11-4, al evaluar las nueve cepas de bacterias ácido lácticas, se determinó que, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus spp.*, inhibieron el crecimiento de *Enterobacter aerógenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*, Mientras que, *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus spp.* no inhibieron a *Yersinia enterocolítica* (0%).

Las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por su capacidad de producir diversas sustancias con poder antimicrobiano como, por ejemplo: ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, las cuales actúan como control biológico frente a cepas de bacterias patógenas (Rojas et al. 2018, p.6).

También se analizó el porcentaje de inhibición de las BAL y se observó que, estas bacterias presentaron la menor actividad antagónica frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus* (50-70%), mientras que, el mayor porcentaje de inhibición fue para *Klebsiella pneumoniae* (75-93,33%).

Un artículo sobre “Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos”, determinó que, el *Lactococcus lactis* produce la bacteriocina nisina contra los patógenos y al evaluar su actividad antagónica, se observó que, inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus beta hemolítico*, sin embargo, no se observó inhibición contra bacterias gram negativas como *Salmonella* o *P. aeruginosa* (Martín et al. 2018, p.10).

Otra investigación sobre “Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales frente a *Escherichia coli*”, analizó tres cepas de BAL y determinó que, se inhibió a *Escherichia coli* en un 75% con diámetros de 10-17,7 mm, esto puede deberse a la presencia de componentes celulares, la exclusión competitiva por los nutrientes y presencia de ácido láctico, que son sustancias activas a pH bajo (Rojas et al. 2018, p.6).

En cuanto a la actividad antagónica de *Enterococcus faecium*, en un estudio sobre “Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos en Argentina”, se aislaron 92 cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, donde se determinó que, *Enterococcus faecium* alcanzó una actividad antagónica de 640 a 163840 UA/ ml, contra *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*, mientras que, no inhibieron a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolítica*, difiriendo con los resultados obtenidos en este estudio (Parada et al. 2018, p. 458).

4.10. Resistencia de las bacterias ácido-lácticas a antimicrobianos

Tabla 12-4: Resistencia de bacterias ácido-lácticas a antibióticos

N.º		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Código		CO#1	BA#2	CO#3	BA#4	BA#5	BA#6	CO26	CA5	BA 20 4	
Nombre científico		<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus spp.</i>					
Antimicrobianos	CN	120 ug	R	R	S	I	R	I	R	R	I
	C	30 ug	S	R	S	S	R	S	R	R	S
	E	15 ug	S	I	S	S	R	S	I	R	I
	CIP	5 ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	CRO	30 ug	R	R	I	I	R	I	R	R	R
	AMP	10 ug	R	R	S	S	R	S	R	R	R
	SXT	25 ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CN; Gentamicina, C ; Cloranfenicol, E ; Eritromicina, CIP ; Ciprofloxacina, CRO ; Ceftriaxona, AMP ; Ampicilina, SXT ; Trimetoprim-sulfametoxazol, S : Sensible, R ; Resistente, I ; Resistencia intermedia.											

Realizado por: Rosero, Fauri, 2023.

Como se indica en la Tabla 12-4, al cuantificar la susceptibilidad antibacteriana de las BAL, se determinó que, *Lactococcus cremoris* fue sensible a cloranfenicol y eritromicina, en el caso de *Lactococcus lactis*, dos cepas fueron resistentes a todos los antibióticos usados, mientras que, las tres cepas restantes fueron sensibles al cloranfenicol, eritromicina y ampicilina y además, mostraron sensibilidad intermedia a la gentamicina y ceftriaxona. En el caso de *Enterococcus faecium* fue resistente a todos los antibióticos y *Lactococcus spp.* fue sensible únicamente al cloranfenicol.

De acuerdo con el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI), para evaluar la susceptibilidad antibacteriana de los *Lactococcus spp.*, se recomienda el uso de antibióticos como penicilina, ampicilina, ceftriaxona, meropenem, vancomicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, levofloxacino y sulfametoazol + trimetoprim (CLSI 2015, p. 40).

En Colombia un grupo de investigadores realizó la evaluación de la “Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico”, reportando que, estas bacterias tienen susceptibilidad intrínseca a ciprofloxacino y vancomicina, por lo que, al evaluar la susceptibilidad bacteriana, determinó que, *Lactococcus spp.*, era resistente a dicloxacilina (halo de 8 mm), cefepima (10 mm) y cefalotina (8 mm) y presentó sensibilidad a ciprofloxacino, gentamicina, eritromicina y penicilina (Jurado y Jarrín 2019, p. 54).

Para el análisis de *Enterococcus spp.*, se recomienda el uso de antibióticos como la penicilina, ampicilina, linezolid, vancomicina y gentamicina (CSLI 2021, p. 21). De acuerdo con un artículo sobre: “Susceptibilidad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* en un hospital de tercer nivel, al evaluar la bacteriemia asociada a esta bacteria, se observó un alto índice de mortalidad en los pacientes. Al detectarse que, *Enterococcus faecium* fue resistente a ampicilina en un 83,3%, vancomicina en un 51,5%, ampicilina más estreptomina en un 75,7% y gentamicina con 69,6%. Además, el 36,2% de estas bacterias no tuvieron un mecanismo de resistencia específico, mientras que, el 37,2% presentaron resistencia HLGR o VRE, que obliga a usar antibióticos de mayor espectro para su tratamiento (Arredondo et al. 2018, p. 60).

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se identificó la pureza de las bacterias del cepario, mediante la caracterización macro-microscópica de las colonias y se confirmó mediante pruebas bioquímicas, determinando bacterias gram negativas como *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Y. enterocolítica*, *E. coli*; gram positivas como *S. aureus*, *S. saprophyticus*, y dentro de las ácido lácticas: *L. cremoris*, *L. lactis subsp.lactis*, *E. faecium*, *Lactococcus spp.*
- Para reconocer las actividades biotecnológicas de las bacterias, se utilizaron agares enriquecidos, determinando actividad: proteolítica en el 100% de las bacterias analizadas, lipolítica en el 73,68% (excepto *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolítica*, *S. saprophyticus*), amilolítica en el 89,47% (excepto *E. coli*, *S. aureus*) y celulolítica en el 47,37% de las bacterias (excepto las BAL y *S. saprophyticus*).
- En cuanto al análisis de la actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas frente a patógenos, se detectó que, algunas especies como: *L. cremoris*, *L. lactis subsp lactis*, *E. faecium*, *Lactococcus spp.*, inhibieron el crecimiento a patógenos de: *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *S. aureus* y *S. saprophyticus*, mientras que, *L. cremoris* y *Lactococcus spp.*, no presentaron actividad contra *Y. enterocolítica*. Además, se observó una evidente inhibición a *K. pneumoniae*, que va desde un 75-93,33%.
- Se evaluó la susceptibilidad microbiana, determinando que, la familia *Enterobacteriaceae* fueron sensibles a gentamicina, fosfomicina y resistentes a diversos betalactámicos, por su resistencia intrínseca a la betalactamasa cromosomal AmpC. En el caso de la familia *Micrococcaceae*, *S. aureus* fue resistente a vancomicina y oxacilina, mientras que, *S. saprophyticus* mostró resistencia a amoxicilina + ácido clavulánico, eritromicina, clindamicina, meticilina, vancomicina y oxacilina, mientras las BAL, denotan una resistencia considerable a excepción de sensibilidad de: *L. cremoris* (CO#1); *L. lactis subsp. lactis*: (CO#3), (BA#4), (BA#6) a cloranfenicol, eritromicina y ampicilina.

5.2. Recomendaciones

- Continuar investigando sobre las actividades biológicas de las bacterias analizadas para aprovechar su potencial a nivel de la industria alimentaria, textil, de papel, productos desinfectantes, entre otros.
- Ampliar el estudio sobre las BAL para identificar su potencial probiótico y aprovechar su poder antagónico contra otras bacterias patógenas, que causan diversos cuadros patológicos.
- Utilizar técnicas moleculares para la identificación de las cepas de BAL en especial *Lactococcus spp.*, para conocer su especie y aprovechar su potencial biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

ALCARRAZ, M. *Evaluación de la actividad proteolítica y lipolítica de cepas para el tratamiento de efluentes de curtiembre.* *Industrial Data*, vol. 17, no. 2018. p.66.

ALÓS, J. *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global.* *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 33, no. 10. 2019. p.692.

ARCSA. *Normativa sanitaria para control de suplementos alimenticios-arcsa.* [en línea]. 2021. Disponible en: www.lexis.com.ec.

ARENCIBIA, D et al. *Métodos generales de conservación de microorganismos* *Métodos generales de conservación de microorganismos.* *ResearchGate*. 2018, p.2.

ARREDONDO, J et al. *Susceptibilidad antimicrobiana de Enterococcus faecalis y faecium en un hospital de tercer nivel.* *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, vol. 31, no. 2, 2018. p.60.

BAIRES, A. *Resistencia antibiótica.* *Farmacología terapéutica.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.berri.es/pdf/FARMACOLOGIA%20Y%20TERAPEUTICA/9786077743484>

BARUA, R et al. *Aislamiento e identificación de microorganismos amilolíticos y tolerantes a cianuro de efluentes de la industria almidonera.* *Revista de Ciencia y Tecnología*, no. 35, 2021, p.6.

BOU, G. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* 2018. p.8.

BRITANIA. *Cultivo MRS.* *Laboratorios Britania S.A,* [en línea] 2018. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf

BRITANIA. *Agar Manitol.* *Laboratorios Britania S.A,* [en línea] 2021. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf

BRITANIA. *E.M.B. Agar.* *Laboratorios Britania S.A,* [en línea]. 2021. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf

CAMACHO, C. *Caracterización y evaluación de bacterias para producción de bioplástico de*

origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea, 2015. p.30.

CAMARENA, J y SÁNCHEZ, R. *Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina*. 2018. pp.1-5.

CANTÓN, R. y SÁNCHEZ, M. *Proteus penneri*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 24, no. 2019. p.5.

CASTELLANOS, J et al. *Biodiversidad bacteriana del queso Paipa, selección de bacterias ácido lácticas y caracterización de sus compuestos antibacterianos*. [en línea] 2020. Disponible en: https://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/1145/1/CASTELLANOS_ROZO_TESIS.pdf.

CAYCEDO, L et al. *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química*. [en línea] 2021. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v19n36/1794-2470-nova-19-36-49.pdf>

CERCENADO, E. *El antibiograma. Ecografía en diagnóstico prenatal*, vol. 7, no. I. 2018. p.6.

CERVANTES, E et al. *Características generales del Staphylococcus aureus*. *Medigraphic*, vol. 11, no. 4, 2018. p.28.

CHÁVEZ, A et al. *¿Cómo funcionan los microbios?* 2019. p.28.

CHILON, M et al. *Microbiological profile of isolated microorganisms from patients in intensive care units of a Hospital in Lambayeque, Peru, 2019-2020*. *Revista de la Facultad de Medicina Humana* [en línea] 2022. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rfmh/v22n2/en_2308-0531-rfmh-22-02-335.pdf.

CHURQUI, J. *Bacterias ácido lácticas aisladas con capacidad antagónica de cepas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de puno*. 2018. p.34.

CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 2015.

CSLI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2021. p.21.

CUEVA, D. y MAYORGA, N. *Aislamiento, identificación y conservación de cepas bacterianas encontradas en muestras de ceviche de chochos.* [en línea]. 2021. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14773/1/56T01006.pdf>.

ESTRADA, S et al. *Staphylococcus saprophyticus como agente etiológico de la infección del tracto urinario.* *Acta médica colombiana*, vol. 15, no. 5, 2018. p.293.

EXPÓSITO, L et al. *Evaluación De Medio De Cultivo Motilidad – Indol Modificado En Cphem De Guantánamo.* , vol. 70, no. 2, 2019. p.2.

EXPÓSITO, L et al. *Resistencia bacteria de Escherichia coli en pacientes con infección del tracto urinario.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://orcid.org/0000-0002-0233-7294>.

FALERO, E. *Identificación y caracterización de enzimas bacterianas.* 2018.

FARIÑA, N et al. *Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia.* *Revista Chilena de Infectología*, vol. 30, no. 5, 2018.

FERRER, C et al. *Caracterización de la enzima amilasa de la bacteria termófila Bacillus licheniformis BA-3 aislada de los géiseres de Candarave (Tacna-Perú).* 2018. p.65.

GAITÁN, D. *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora).* 2007. p.21.

GALINDO, A. *Catálogo oficial de medios de cultivo.* [en línea] 2022. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/791017/Cat_logo_oficial_de_medios_de_cultivo.pdf

GARCÍA, C. *Resistencia antibiótica de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Proteus sp., en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenang.* *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, 2018. p.4.

GIONO, S et al. *Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla.* 2020.

GÓMEZ, S et al. *Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil, Santander.* *Revista*

Matices Tecnológicos, vol. 5, no. 5, 2018. p.33.

GONZÁLEZ, E et al. *Resistencia a Cefepime en Aislamientos de. Revista de salud pública de Colombia*, vol. 8, 2022. p.193.

GUTIÉRREZ, J et al. *Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 35, no. 1, 2019. p.96.

HERNÁNDEZ, M. et al. *Aislamiento de enzimas proteolíticas a partir de restos de cosecha de piña.* 2017. p.95.

JIMENA, M. y BADO, C. *Importance of a correct Gram Stain in Identifying Bacteria.* 2022.

JURADO, H. y JARRÍN, V. *Cinética de crecimiento de Lactobacillus lactis y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. Biosalud*, vol. 14, no. 2, 2019. p.54.

LARA, C. y ACOSTA, R. *Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (Nasutitermes nigriceps) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 15, no. 1, 2019. p.15.

LAZO, G et al. *Sensitivity and resistance on the antibiogram of Staphylococcus aureus in patients of the Hospital Clinical Viedma Correspondencia a. Rev Cient Cienc Med*, vol. 16, 2018. p.17.

LEDERMANN, G et al. *Infecciones Intrahospitalarias Por Serratia Marcescens. Revista Chilena de Pediatría*, vol. 45, 2017. p.235.

LEÓN, A et al. *Evaluación de Bacterias Acido Lácticas Colombianas en las Propiedades Sensoriales, Reológicas, Fisicoquímicas y Microbiológicas de Masas Acidas de Pan. Revista CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 36, 2018. p.3.

LICKES, S. *Aislamiento y caracterización de bacterias lipolíticas en aguas residuales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Agua, Saneamiento & Ambiente*, vol. 14, no. 1, 2019. p.31.

LÓPEZ, B. *Las Bacterias* [en línea] 2019. Disponible en: <http://www.bio->

nica.info/biblioteca/bacterias.pdf

LÓPEZ, C. *Evaluación de la sacarificación de residuos cítricos empleando microorganismos productores de celulosomas.* 2019. p.74.

LÓPEZ, J. y SORIA, L. *Evaluación prospectiva de la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de los Ilinizas, provincia de Cotopaxi.* 2018. p.57.

MARTÍN, C et al. *Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos.* *e-Gnosis*, vol. 6, 2018. p.10.

MARTÍNEZ, L. y PASCUAL, Á. *Mecanismos de resistencia las carbapenemas en Pseudomonas aeruginosa.* *Control de Calidad SEIMC*, 2018. p.3.

MÉNDEZ, M. *Identificación bioquímica y evaluación de la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas aisladas de quesillos.* 2018. p.51.

MENSA, J et al. *Guía de tratamiento de la infección por Staphylococcus aureus.* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2013/01/guia.pdf>.

MERCHAN, J. y GERARDO, J. *Mecanismos de resistencia en aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae.* *Revista Vive*, vol. 4, no. 12, 2021. pp.1-14.

MORAL, S et al. *Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos.* *Revista Iberoamericana de Ciencias*, vol. 2, no. 3, 2018. p.2.

MOROSINI, M. *Detección de mecanismos de multirresistencia Antibiograma informado.* 2018. pp.1-41.

NÁJERA, S. *Estudio de proteasas que degradan proteínas séricas humanas en cepas de bacterias gram negativas resistentes a antimicrobianos.* 2018. p.74.

NAVARRO, F et al. *Interpretive reading of enterobacteria antibiograms.* *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 28, no. 9, 2019. p.640.

NAVARRO, M. *Characterization, classification and uses of lipase enzymes in industrial production.* *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, vol. 39, no. 4, 2020. p.2.

OLIVER, A. y CANTÓN, R. *Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido.* *Control Calidad SEIMC*, 2018. p.1.

OMS. *Resistencia a los antimicrobianos.* 2020. p.10.

ORTEGA, M et al. *Preparación de Medios de Cultivo.* *Universidad Tecnológica Nacional.* 2019. p.4.

ORTIZ, E et al. *Actividad biológica en bacterias heterótrofas procedentes de Bahía de La Habana.* 2022. p.11.

ORTÍZ, M. *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo.* 2019. pp.2-3.

OVANDO, S et al. *Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos.* *Microbiology*, vol. 21, no. 42, 2017.

PALACIOS, J.. *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido-lácticas (bal) obtenidas de *Oreochromis niloticus* (tilapia) cultivadas en jaulas flotantes en el lago de Ilopango el Salvador.* 2019. p.51.

PARADA, R et al. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from marine invertebrates of Chubut coast (Patagonia - Argentina).* *Bionatura*, vol. 2, no. 4, 2018. p.458.

PAREDES, L et al. *Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas spp. m211* en fermentación sumergida.* *revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 83, no. 4, 2018. p.450.

PARRA, R. *Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos.* *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, vol. 8, no. 1, 2017. p.95

PARRA, R. *Bacterias ácido-lácticas.* *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.* 2018. p.96

PAZ, V et al. **Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria.* *Revista chilena de infectología*, vol. 36, no. 2, 2019. p.180.

PEDROZA, C et al. *Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 15, no. 1, 2019. p.43.

PÉREZ, H y ROBLES, A. *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana*. 2018. p.189.

PÉREZ, S et al. *Use of urease type enzymes for the treatment of wastewater with a high organic nitrogen content | Uso de enzimas de tipo ureasa en el tratamiento de aguas residuales con alto contenido en nitrógeno orgánico. Información Tecnológica*, vol. 18, no. 5, 2018. pp. 87-88.

QHIZHPE, A. *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. 2019. p.5.

RAMÍREZ, J et al. *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Repositorio institucional Aramara*, no. 9, 2018. p.3.

RAMÍREZ, M. *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Universidad autonoma del estado del Hidalgo*, 2018.

RAMÍREZ, V. y VÉLEZ, J. *Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. Información Tecnológica*, vol. 27, no. 6, 2018. p.120.

RAMOS, E et al. *Aislamientos bacterianos saprófitos Gram negativos promueven el crecimiento de tomate y trigo*. 2019. p.43.

RARAZ, J et al. *Artículo Original Resistencia antibiótica de Escherichia coli y Staphylococcus saprophyticus en la infección urinaria de un hospital público Antibiotic resistance of Escherichia coli and Staphylococcus saprophyticus in urinary tract infection in a public. , vol. LXI, no. 4, 2021. p.636.*

RIDLON, J. *Clasificación bacteriana*. vol. 2, 2019. p.1311.

RODRÍGUEZ, P. y ARENAS, R. *Hans Christian Gram y su tinción. Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*. 2018, pp. 166-167.

RODRÍGUEZ, G. y CHÁVEZ A. *Proteolytic activity and peptide concentration of goat milk yogurt added with probiotics. Interciencia*, vol. 43, no. 1, 2018. p.5.

ROJAS, C et al. *Tracto digestivo de lechón (Sus scrofa domesticus) propuestos para alimentación porcina Introducción.* , no. II, 2021. p.126.

RUIZ, L. *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Universidad de Barcelona*, vol. Tesis doct, 2018. p.49.

SAENZ, T. y GORBEÑA, J. *Bacterias Acido lácticas: Biopreservante de los alimentos. Biotiempo*, vol. 8, 2018. p.54.

SÁNCHEZ, E et al. *Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 22, no. 1, 2020. p.36.

SANZ, S. *Prácticas de microbiología.* 2020. p.28.

SIRVAS, S et al. *Isolation and identification of proteolytic, amylolytic, lipolytic, and chitinolytic bacteria from shrimp waste. Revista Peruana de Biología*, vol. 28, no. 1, 2021. p.2.

SORIA, L. *Evaluación prospectiva de la actividad proteolítica en bacterias provenientes de los pantanos artificiales de aguas residuales, Shushufindi- Ecuador. Polo del Conocimiento*, vol. 5, no. 05, 2020. p.362.

TEJADA, R. *Obtención de Ácido Láctico por fermentación del almidón. Ingeniería Alimentaria.*, 2019. p.23.

TORRÓ, J. *Control de Calidad de Alimentos. Rua.Ua.Es*, 2018. p.4.

TREVIÑO, M et al. *Proteus mirabilis productor de ampc plasmídica en el área sanitaria de Santiago de Compostela: Prevalencia y caracterización molecular por rep-PCR y MALDI-TOF MS. Revista Espanola de Quimioterapia*, vol. 25, no. 2, 2019. p.122.

UCV. *Agar MacConkey. Valtek Diagnostics*, no. 5, [en línea] 2018. Disponible en: <https://andinamedica.com.pe/wp-content/uploads/2016/08/Agar-MacConkey.pdf>

UMARAN, A et al. *Patogenia bacteriana*. [en línea] 2020. Disponible en: <https://ocw.ehu.eus/file.php/134/tecnicasmol/tema-4-patogenia-bacteriana.pdf>

VALENCIA, M et al. *Evaluación de actividades enzimáticas de Fusarium spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas*. *Universitas Scientiarum*, vol. 16, no. 2, 2011. p.148.

VARGAS, T. y KUNO, A. *Morfología bacteriana*. *Revista de Actualización Clínica*, vol. 49, no. 2, 2019, p.2594.

VENANZIO, G. *Mecanismos de patogénesis de Serratia marcescens*. [en línea] 2018. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/144474702.pdf>

VIGUERAS, Y. *Enzimas proteolíticas: generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas*. *CIERMMI Mujeres en la ciencia T.4*, 2019. p.2.

VINDEROLA, G et al. *Bacterias ácido lácticas*. [en línea] 2019. Disponible en: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>

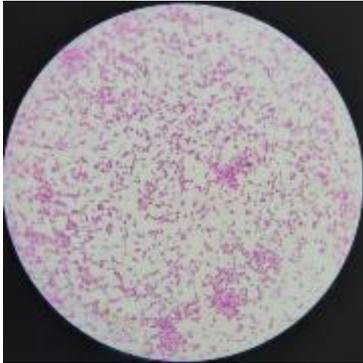
VITERI, P et al. *Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia*. *Acta Agronómica*, vol. 65, no. 4, 2018. p.363.



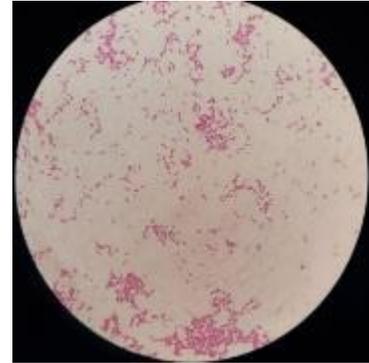
ANEXOS

ANEXO A: TINCIÓN DE GRAM

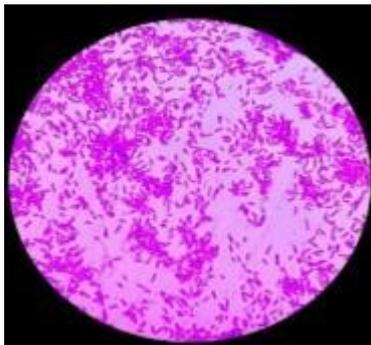
a: *Enterobacter aerogenes*



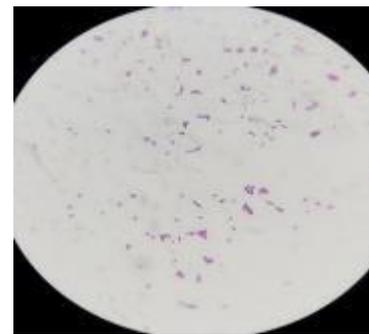
d: *Proteus mirabilis*



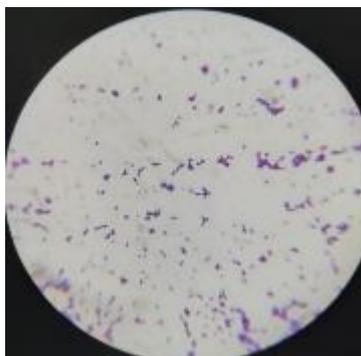
b: Tinción de gram de *Escherichia coli*



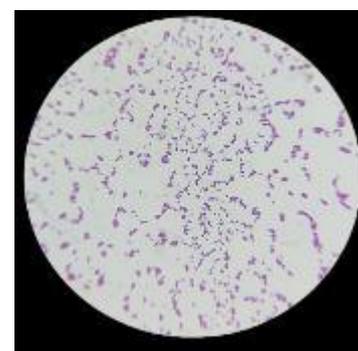
e: *L. cremoris* (CO#1)



c: *L. lactis subsp. lactis* (BA#3)



j: *Enterococcus faecium* (CA 5)



ANEXO B: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a: *Enterobacter aerogenes*



d: *Proteus mirabilis*



b: *Enterobacter cloacae*



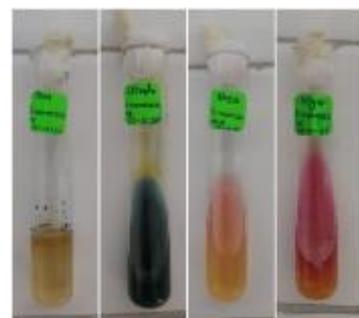
e: *Yersinia enterocolitica*



c: *Klebsiella pneumoniae*



f: *Serratia marcescens*



ANEXO C: CARACTERIZACIÓN DE LAS BAL (BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS)

Hemólisis gamma en agar sangre

a: *L. lactis subsp. lactis* (Ba#2), (Ba#4), (Ba#6) y *Enterococcus faecium* (CA 5).



DESARROLLO DIFERENTES TEMPERATURAS

A

a: Bacterias ácido lácticas con crecimiento a 10 °C.



EN MEDIO SIM

a: *L. cremoris* (CO#1), *L. cremoris* (CO26), *L. lactis subsp. lactis* (Ba#2), (Ba#4), (Ba#5)



CRECIMIENTO DIFERENTE PH

A

a: Todas las BAL con crecimiento en pH 4,4 y 9,5 a excepción de *E. faecium* no crece en pH 4,4.



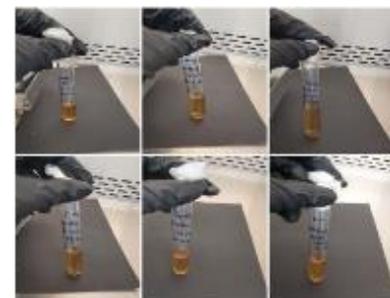
PRODUCCIÓN DE CO2 A PARTIR DE GLUCOSA

a: Prueba negativa en caldo rojo fenol para todas las Bacterias ácido lácticas (BAL).



CRECIMIENTO A VARIAS CONCENTRACIÓN DE 6 Y 18 % DE NA CL

a: BAL con crecimiento en 6%.



ANEXO D: ACTIVIDADES: PROTEOLÍTICA, LIPOLÍTICA, AMIOLÍTICA, CELULOLÍTICA

a: *Enterobacter cloacae*



d: *Yersinia enterocolitica*



b: *Escherichia coli*



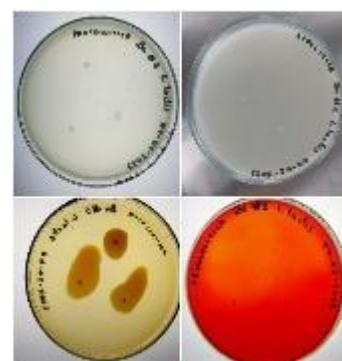
e: *L.cremoris* (CO#1)



c: *Proteus mirabilis*



f: *L.lactis subsp. lactis* (Ba#2)



g: *L.lactis subsp. lactis* (Ba#3)



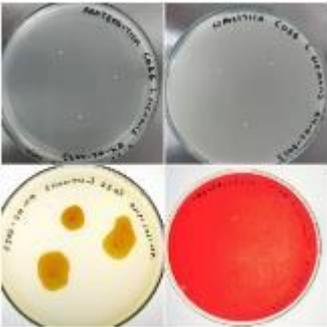
j: *L.lactis subsp. lactis* (Ba#6)



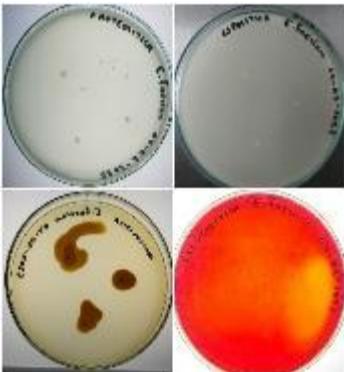
h: *L.lactis subsp. lactis* (Ba#4)



k: *L.cremoris* (CO26)

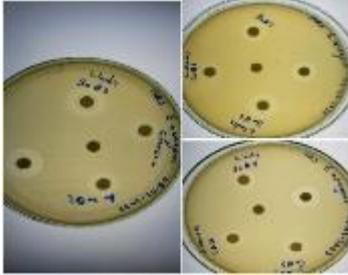


i: *E. faecium* (CA 5)



ANEXO E: INHIBICIÓN DE BAL A PATÓGENOS

a: BAL frente a *Enterobacter aerogenes*



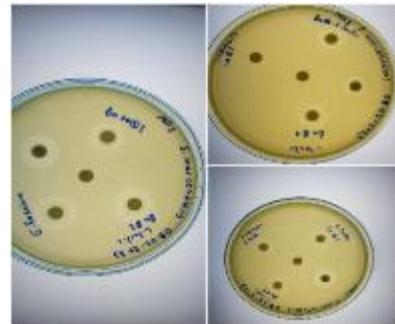
e: BAL frente a *Yersinia enterocolitica*



b: *Enterobacter cloacae*



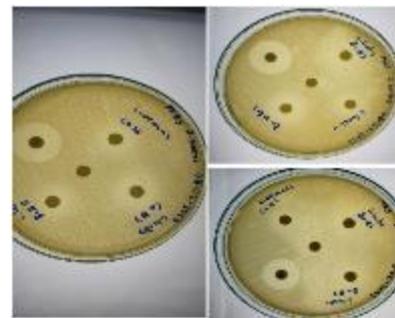
f: BAL frente a *Serratia marcescens*



c: BAL frente a *Escherichia coli*



g: BAL frente a *Staphylococcus aureus*



d: BAL frente a *Proteus mirabilis*



ANEXO F: ANTIBIOGRAMA

a: *Enterobacter aerogenes*



e: *Yersinia enterocolitica*



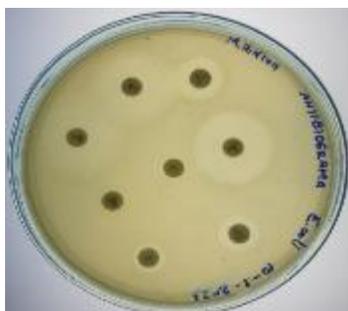
b: *Enterobacter cloacae*



f: *Serratia marcescens*



c: *Escherichia coli*



g: *Pseudomonas aeruginosa*



d: *Proteus mirabilis*



h: *Staphylococcus aureus*



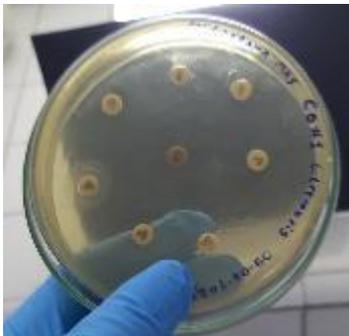
i: *Staphylococcus saprophyticus*



m: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (BA#4)



j: *Lactococcus cremoris* (CO#1)



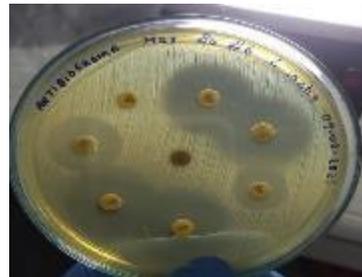
n: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (BA#5)



k: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (BA#2)



o: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (BA#6)



l: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (BA#3)



ANEXO G: ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BAL FRENTE A PATÓGENOS

Medidas de diámetro en (mm), inhibición de las bacterias ácido lácticas (BAL) a patógenos											
Nombre científico	Cepas y control positivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>	CO#1	R	R	9	12	10	10	R	R	10	7
	CN	14	15	17	15	14	13	14	14	19	14
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#2	14	11	15	14	13	12	13	14	13	9
	CN	15	13	17	17	17	14	14	17	22	14
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CO#3	11	9	9	14	11	12	R	12	14	10
	CN	16	16	17	16	14	15	16	16	20	16
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#4	11	10	15	14	12	11	9	13	11	8
	CN	14	15	17	15	14	13	14	14	19	14
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#5	11	R	10	13	9	12	11	12	11	8
	CN	16	16	17	16	14	15	16	16	20	16
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BA#6	13	11	12	12	13	12	12	12	11	R
	CN	14	16	17	15	14	13	14	14	19	14
<i>Lactococcus cremoris</i>	CO26	11	9	9	12	10	12	R	12	12	8
	CN	16	16	17	16	14	15	16	16	20	16
<i>Enterococcus faecium</i>	CA5	11	9	12	14	11	8	11	15	12	7
	CN	15	13	17	17	17	14	14	17	22	14
<i>Lactococcus spp.</i>	BA 20 4	12	8	14	14	11	10	R	12	13	8
	CN	15	13	17	17	17	14	14	17	22	14

R; Resistencia es igual a 6 mm de diámetro del disco de antibiótico.

ANEXO H: TEST DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

					Diámetro en mm, medidos de las enterobacterias							
Familia: Enterobacteriaceae					Número y cepa de bacteria patógena							
					1	2	3	4	5	6	7	8
Antimicrobianos	Cantidad de antibiótico en disco	Diámetro en mm, moderadamente:			CO#1	BA#2	CO#3	BA#4	BA#5	BA#6	CO26	CA5
		Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Serratia marcescens</i>
AMP	10 ug	≤ 13	14-16	≥ 17	13	15	15	17	13	14	18	15
C	30 ug	≤ 12	13-17	≥ 18	15	17	R	14	15	15	R	16
CIP	5 ug	≤ 20	21-30	≥ 31	14	18	21	32	16	16	25	17
CN	10 ug	≤ 12	13-14	≥ 15	15	16	13	19	14	14	16	15
CRO	30 ug	≤ 19	20-22	≥ 23	23	23	23	30	23	21	24	22
FF	200 ug	≤ 12	13-15	≥ 16	22	25	20	R	21	22	R	22
K	30 ug	≤ 13	14-17	≥ 18	13	24	10	15	13	14	12	14
SXT	25 ug	≤ 10	11-15	≥ 16	R	R	R	24	R	R	25	R

AMP; Ampicilina, CN; Gentamicina, C; Cloranfenicol, CIP; Ciprofloxacina, CRO; Ceftriaxona, FF; Fosfomicina, K; Kanamicina, SXT; Trimetoprim-sulfametoxazol.

ANEXO I: TEST DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA FAMILIA MICROCOCCACEAE

Familia: Micrococcaceae					Medidas de diámetro en cocos:	
					N.º de bacteria	
Antimicrobianos	Cantidad de antibiótico en disco	Diámetros en mm, moderadamente:			9	10
		Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Amoxicilina/ácido clavulánico	30 ug	≤ 19	-	≥ 20	27	7
Eritromicina	15 ug	≤ 13	14-22	≥ 23	32	12
Clindamicina	2 ug	≤ 14	15-20	≥ 21	40	11
Metilicina	5 ug	≤ 12	-	≥ 13	22	R
Vancomicina	30 ug	≤ 14	15-16	≥ 17	R	7
Oxacilina	1 ug	≤ 24	-	≥ 25	16	R

AMC; Amoxicilina/ácido clavulánico, EM; Eritromicina, DA; Clindamicina, ME; Metilicina, VA; Vancomicina, OX; Oxacilina, S; Sensible, R; Resistente es igual a 6 mm del diámetro disco de antibiótico; I; Resistencia intermedia.

ANEXO J: RESISTENCIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A ANTIBIÓTICOS

Familia: Lactococcus					Medida de diámetros en mm, de la sensibilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL)								
					Número y cepa de bacteria ácida láctica								
					1	2	3	4	5	6	7	8	9
Antimicrobiano	Cantidad de antibiótico en disco	Diámetro en mm, moderadamente:			CO#1	BA#2	CO#3	BA#4	BA#5	BA#6	CO26	CA5	BA 20 4
		Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Enterococcus faecium</i>					
CN	120 ug	≤ 16	15-22	≥ 23	9	10	23	20	11	20	10	10	20
C	30 ug	≤ 12	13-17	≥ 18	18	17	24	25	R	24	R	12	20
E	15 ug	≤ 13	14-17	≥ 18	10	14	23	25	12	25	14	11	17
CIP	5 ug	≤ 20	21-30	≥ 31	R	R	15	14	R	15	R	11	16
CRO	30 ug	≤ 22	23-25	≥ 26	R	16	25	24	R	23	R	R	17
AMP	10 ug	≤ 13	14-16	≥ 17	10	10	25	25	R	24	11	10	R
SXT	25 ug	≤ 10	11-15	≥ 16	R	R	R	R	R	R	R	R	R

CN; Gentamicina, C; Cloranfenicol, E; Eritromicina, CIP; Ciprofloxacina, CRO; Ceftriaxona, AMP; Ampicilina, SXT; Trimetoprim-sulfametoxazol, S: Sensible, R; Resistente, I; Resistencia intermedia.



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 02 / 08 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Fauri Iván Rosero Benalcázar
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

1390-DBRA-UPT-2023



DBRA.I.

Ing. C. [Signature]

