



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS RECUPERADAS DE
LACTOSUERO EN LA COOPERATIVA DE PRODUCCIÓN DE
LECHE “CHUQUIPOGYO” DEL QUINUAL-LA MERCED
PARROQUIA SAN ANDRÉS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: HENRY STALIN FIALLOS ZARUMA

DIRECTORA: Bqf. JANNETH MARÍA GALLEGOS NUÑEZ PhD.

Riobamba-Ecuador

2022

© 2021, **Henry Stalin Fiallos Zaruma**

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 HENRY STALIN FIALLOS ZARUMA, 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, 03 de mayo de 2022

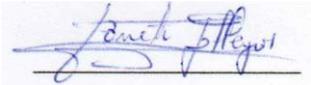
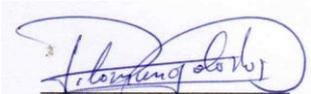


Henry Stalin Fiallos Zaruma

060437054-4

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: Trabajo Experimental **CARACTERIZACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS RECUPERADAS DE LACTOSUERO EN LA COOPERATIVA DE PRODUCCIÓN DE LECHE “CHUQUIPOGYO” DEL QUINUAL-LA MERCED PARROQUIA SAN ANDRÉS**, realizado por el señor **HENRY STALIN FIALLOS ZARUMA**, 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
Bqf. Adriana Isabel Rodríguez Basantes Mgs. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-05-03
Dra. Janneth María Gallegos Núñez PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-05-03
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-05-03

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a Dios por darme la vida y oportunidad de estudiar y servir a la sociedad.

Así mismo a mi familia por ser un apoyo en esta larga travesía iniciada en tan magna institución como lo es la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, la misma que con sus docentes han sabido compartir conmigo el conocimiento necesario durante el proceso de enseñanza el cual garantiza nuestro perfil como profesionales en conformidad con el encargo y demanda social.

A nuestras autoridades y personal docente por el compromiso que ellos mantuvieron para alcanzar nuestros objetivos profesionales.

A los miembros de la Cooperativa de Producción de Leche COOPCHUG por la apertura que brindaron para el cumplimiento del trabajo experimental propuesto.

Henry

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Bacterias Acido Lácticas	5
1.1.1. <i>Generalidades y características microbiológicas de las BAL</i>	5
1.1.1.1. <i>Taxonomía y Diversidad de las BAL</i>	6
1.1.1.2. <i>Bacterias ácido lácticas, homofermentativas y heterofermentativas</i>	7
1.1.2. <i>Identificación de bacterias ácido lácticas</i>	8
1.1.2.1. <i>Identificación fenotípica</i>	9
1.1.2.2. <i>Identificación genotípica</i>	9
1.2. BAL y Susceptibilidad antimicrobiana.....	9
1.3. Suero Lácteo como matriz de bacterias ácido lácticas	10

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	12
2.1. Tipo y diseño de la investigación.....	12
2.1.1. <i>Población de estudio y/o trabajo</i>	12
2.1.2. <i>Método de recolección de datos: Analítico Descriptivo</i>	12
2.1.3. <i>Identificación de Variables</i>	12
2.2. Equipos, Materiales y Reactivos	13
2.2.1. <i>Toma de muestras</i>	14
2.2.2. <i>Aislamiento de BAL mediante siembra de diluciones seriadas</i>	14

2.2.3.	<i>Identificación de BAL aisladas de sueros lácteos</i>	14
---------------	--	----

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	20
3.1.	Aislamiento de BAL	20
3.2.	Pruebas de identificación primaria y otros	23
3.3.	Identificación genotípica	36

	CONCLUSIONES	40
--	---------------------------	----

	RECOMENDACIONES	41
--	------------------------------	----

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Equipos materiales y reactivos	13
Tabla 2-2: Punto de corte de los antibióticos testeados.....	18
Tabla 1-3: Niveles de BAL aisladas a partir de sueros de Queso.....	20
Tabla 2-3: Morfología macroscópica de colonias de BAL aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella	21
Tabla 3-3: Morfología microscópica de colonias aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella	22
Tabla 4-3: Pruebas de identificación primaria y otras aplicadas a colonias aisladas de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella.....	26
Tabla 5-3: Respuesta en mm de la susceptibilidad de aislados de Queso Fresco y Queso Mozzarella frente a diferentes antibióticos en agar MRS.....	29
Tabla 6-3: Respuesta en mm de susceptibilidad de cepas de Queso Fresco y Queso Mozzarella frente a diferentes antibióticos en agar MRS Sangre	30
Tabla 7-3: Test de normalidad.....	35
Tabla 8-3: Ensayo ANOVA	35
Tabla 9-3: Identificación genotípica de colonias aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Dendograma de BAL mostrando las relaciones filogenéticas entre bacterias basada en los datos de la secuencia del 16 S rRNA.....	7
Figura 2-2: Resultados de identificación genotípica de aislados de bacterias ácido lácticas	19
Figura 1-3: Morfología macroscópica de BAL.....	22
Figura 2-3: Morfología microscópica de BAL.	23
Figura 3-3: Crecimiento de BAL en agar sim	24
Figura 4-3: Fermentación de lactosa.....	25
Figura 5-3: Actividad proteolítica de BAL.	25
Figura 6-3: Actividad hemolítica de BAL.....	26
Figura 7-3: Ensayo de susceptibilidad microbiana en colonias de BAL.....	28
Figura 8-3: Datos estadísticos ANOVA, para medio MRS y MRS SANGRE.	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso fresco.....	32
Gráfico 2-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella	32
Gráfico 3-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella	33
Gráfico 4-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS Sangre, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella	33
Gráfico 5-3: Porcentaje de susceptibilidad de colonias de BAL, en agar MRS.	34
Gráfico 6-3: Porcentaje de susceptibilidad de colonias de BAL, en agar MRS Sangre.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO

ANEXO B: ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO C: ENSAYOS DE ANTIBIOGRAMA PREVIOS A SU INCUBACIÓN

ANEXO D: INÓCULOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS LISTAS PARA SU USO

ANEXO E: ENSAYO DE HEMÓLISIS

ANEXO F: ENSAYO DE ANTIBIOGRAMA POSTERIOR A LA INCUBACIÓN

ANEXO G: ENSAYO DE ANTIBIOGRAMA EN AGAR SANGRE

ANEXO H: JARRA DE ANAEROBIOSIS

ANEXO I: HISTOGRAMA DE NORMALIDAD, COLONIAS EN MEDIO MRS

ANEXO J: HISTOGRAMA DE NORMALIDAD, COLONIAS EN MEDIO MRS SANGRE...

ANEXO K: ESTADÍSTICO DE PRUEBA

RESUMEN

El suero lácteo ha sido aprovechado como fuente de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) contribuyendo a la solución de los problemas ambientales relacionados con su eliminación como residuo. El presente estudio tuvo como objetivo recuperar BAL de la producción de queso fresco y queso mozzarella en la Cooperativa de Producción de Leche Chuquipogyo (COOPCHUG). El diseño utilizado fue de tipo experimental mediante el cual se aplicaron diferentes ensayos, para definir las cualidades primarias, morfológicas, metabólicas y de seguridad de cada uno, de los aislados. Cada aislado se sometió a la caracterización de colonias y células, a los ensayos de catalasa, oxidasa, fermentación láctica, proteólisis, motilidad, actividad hemolítica y susceptibilidad antimicrobiana. Identificándose fenotípicamente como BAL, la identificación genómica determinó a *Lactobacillus paracasei* como el aislado más frecuente 16/30 (53.3%). En el ensayo de Kirby- Bauer de difusión por disco, ejecutado por triplicado se constató que todos los aislados fueron resistentes a la Gentamicina, Kanamicina y Vancomicina, por otro lado, se obtuvo una alta sensibilidad a los demás antibióticos como son la Ampicilina, Cloranfenicol, Eritromicina, Tetraciclina y Cefuroxima. En base a estos resultados se concluyó que las cepas de BAL que cumplen las características de seguridad pueden pasar a ensayos para su posterior empleo como suplementos nutricionales, cultivos de iniciación para alimentos fermentados o en la biopreservación de alimentos. Por ello se recomienda realizar un mayor control del uso de antibióticos en la industria ganadera, para reducir el riesgo de desarrollar nuevas resistencias por parte de la microbiota propia de la leche. Además, la utilización de técnicas estandarizadas para llevar a cabo los procesos de aislamiento y caracterización, esto con el objetivo de acelerar los procesos dentro del laboratorio y garantizar que los resultados sean confiables.

Palabras clave: <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)>, <SUERO LÁCTEO>, <LECHE>, <QUESO>, <MICROORGANISMO>.

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION-ECIBCE, l=QUITO,
serialNumber=0000621485, cn=LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2022.06.24 15:41:04 -05'00'



1358-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

Lactic whey has been used as a source of Lactic Acid Bacteria (LAB), contributing to the solution of environmental problems related to its elimination as residual. The present research study aimed to recover LAB from the production of fresh cheese and mozzarella cheese on Cooperativa de Producción de Leche Chuquipogyo (COOPCHUG). The method used was an experimental type through which different tests were applied to define the morphological, metabolic, and safety qualities of the isolations. The isolates were subjected to the characterization of colonies and cells, to the treatments of catalase, oxidase, lactic fermentation, proteolysis, motility, hemolytic activity, and to the antimicrobial susceptibility. Identifying phenotypically as LAB. The identification genomics determined *Lactobacillus paracasei* as the most frequent isolate 16/30 (53.3%). In the Kirby-Bauer disc diffusion test that was performed in triplicate, it was found that all the isolates were resistant to Gentamicin, Kanamycin, and Vancomycin. On the other hand, high sensitivity was obtained to other antibiotics such as Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracycline, and Cefuroxime. Based on these results, it was concluded that the strains of LAB that meet the safety characteristics can go to trials for later use as nutritional supplements, starter cultures for fermented foods, or in food biopreservation. For this reason, it is recommended to carry out greater control of the use of antibiotics in the livestock industry, to reduce the risk of developing new resistance on the milk's microbiota. In addition, the use of standardized techniques for carrying out the isolation and characterization processes, accelerates the processes within the laboratory and ensure that the results are reliable.

Keywords: <LACTIC ACID BACTERIA (LAB)>, < LACTIC WHEY>, <MILK>, <CHEESE>, <MICROORGANISM>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

INTRODUCCIÓN

El suero de leche o lactosuero de queso es la fracción líquida obtenida después de la separación del coágulo o fase micelar durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína. Los ingredientes principales del lactosuero son la lactosa, proteínas nutritivas vitales, minerales, vitaminas y grasas (Lugo Ramírez, 2021, p. 1).

Como resultado de la elaboración de queso, la industria láctea produce alrededor de 200 millones de toneladas de suero de leche al año. Las estadísticas muestran que una parte importante de estos desechos se eliminan como efluente en el agua lo que genera un grave problema ambiental con consecuencias físicas a la estructura del suelo mientras, químicamente generan una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y reduce la vida acuática al agotar el oxígeno presente (Basantes, 2020, p. 168).

La falta de medidas adecuadas para la eliminación del suero de leche o su reutilización en algún otro sector causa una serie de dificultades a nivel ambiental, por lo que en la actualidad se pretende establecer nuevos usos para el suero lácteo. Ordinariamente, estos usos se centran en el sector ganadero, como fuente de alimento para ganado porcino y otros, sin embargo, su uso puede extenderse más allá, pues dada su capacidad nutricional, puede emplearse en alimentación humana.

Adicionalmente, el suero lácteo constituye una fuente de BAL que pueden actuar como cultivos iniciadores, contar con la capacidad probiótica y también pueden emplearse en la preservación de alimentos y en biofábricas de etanol, hidrógeno, biogás, lípidos microbianos, ácido láctico, incluso para el crecimiento de BAL (Rama, G. et al., 2019, p. 26).

Desde el punto de vista Microbiológico las bacterias ácido lácticas (BAL) son una clase funcional que designa un grupo heterogéneo de bacterias fermentadoras Gram-positivas, no patógenas, no toxigénicas, con la categoría de GRAS, (general regarding as safe), generalmente consideradas como seguras (conocidas por producir ácido láctico a partir de fuentes de carbohidratos), lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos (Sánchez y Tromps, 2014, p. 124).

De acuerdo con los productos de su metabolismo, el grupo se divide en bacterias homofermentativas y heterofermentativas. Las BAL homofermentativas producen ácido láctico como único metabolito de la fermentación mientras que el otro grupo puede producir dióxido de carbono, etanol o ácido acético (Sánchez y Tromps, 2014, p. 124).

Dentro de este grupo se reconocen bacterias aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* son los géneros representativos de BAL. A excepción de *Bifidobacterium*, todas son bacterias aeróbicas (Del Campo, 2008, p. 2).

Las BAL han contribuido a la alimentación humana desde hace mucho tiempo, y se encuentran

en una variedad de productos lácteos fermentados tales como el kéfir y el yogur, en quesos frescos y añejos, así como en algunas hortalizas y cereales. Metchnikoff, un investigador del siglo XIX ha relacionado los efectos beneficiosos de la leche fermentada en la salud humana durante más de un siglo, con el consumo de cierto tipo de bacteria (Del Campo, 2008, p. 2).

En este contexto, las BAL han jugado un papel importante en la tecnología de los alimentos y tienen una larga historia debido al uso que el hombre hace de ellas para la producción y conservación de alimentos, debido a que su presencia aparte de reducir la proliferación de patógenos, también controla microorganismos de la descomposición de los alimentos. Así es como los investigadores se han centrado en buscar nuevos métodos para conservar alimentos que contengan ingredientes naturales que para garantizar su seguridad (Calle López, 2016, p. 1).

Sin duda, se han identificado muchos beneficios que producen las bacterias ácido lácticas en relación directa con los alimentos fermentados. También cabe destacar su capacidad de adherencia a las células, con la posibilidad de excluir o reducir la adhesión de patógenos mediante la producción de bacteriocinas antagonistas a su crecimiento.

Es necesario destacar el potencial terapéutico de las BAL en el tratamiento de enfermedades infecciosas, así como en la prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento de diarreas infantiles o del viajero por su papel protector de la microflora intestinal, y el tratamiento de infecciones ligadas al uso de antibióticos (Calle López, 2016, p. 3).

Debido al creciente uso de bacterias ácido lácticas en diferentes sectores de la industria, durante los últimos años, es necesario controlar la capacidad de resistencia que presentan las mismas, debido a su cualidad para transmitir caracteres genéticos a otros microorganismos, pues si bien el uso de las bacterias ácido lácticas se remonta a muchos años atrás, recientemente el uso indiscriminado de los antibióticos en diferentes campos ha favorecido un aumento en las capacidades de resistencia de varios microorganismos, dentro de los cuales se incluyen las BAL. El uso de las bacterias ácido lácticas dentro de la elaboración de productos como los probióticos o los preservantes naturales debe desarrollarse de forma meticulosa, previa experimentación in vitro e in situ, pues una cepa con resistencia a antibióticos de amplio espectro que sea usada como cultivo iniciador, puede compartir dicha capacidad a la microbiota de quienes lo consuman, ya sea como probióticos, como alimentos fermentados o preservados con ácido lácticas. Este hecho producirá un incremento en la resistencia a los antimicrobianos, y en consecuencia dificultará la capacidad de respuesta de los mismos ante una posible infección.

JUSTIFICACIÓN

El suero lácteo contiene lactobacilos que son microorganismos reconocidos como seguros (generally recognized as security) GRAS y promueven la salud humana. Los lactobacilos pueden prevenir la disrupción gastrointestinal por efecto de la terapia antibiótica ayudando a restablecer

o mantener la microbiota normal del intestino.

Para lograr este objetivo, los lactobacilos deben sobrevivir en la presencia de los antibióticos administrados, siendo la susceptibilidad antimicrobiana un criterio esencial para su tamizaje y selección, pero siempre que no representen una amenaza por medio de la transferencia de genes de resistencia a otras bacterias (Neethu MJ, et al., 2015, p. 53).

En la práctica se requiere que las cepas de BAL sean sensibles a antibióticos, para prevenir que algunas presenten genes de resistencia que se puedan transferir a patógenos en el intestino humano o animal.

Pero, las bacterias ácido lácticas provenientes del sector lechero, pueden estar implicadas en la resistencia antibiótica provocada por el uso de antibióticos para el cuidado del ganado, de otro lado, el amplio uso de estas bacterias particularmente en la elaboración de cultivos iniciadores, productos fermentados o como agentes de biopreservación facilitarían la transmisión horizontal de genes de resistencia a los alimentos destinados a consumo humano.

La transmisión puede ocurrir a partir de cepas iniciadoras que se emplean en los procesos de fermentación para lograr una acidificación más rápida del material crudo. Por lo anterior surge la necesidad de realizar un análisis adecuado para definir los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de BAL procedentes de suero lácteo, conocimiento que es de importancia para decidir sobre su empleo o no en estudios posteriores, orientados hacia la elaboración o biopreservación de alimentos.

OBJETIVOS

General

Caracterizar bacterias ácido lácticas a partir de suero lácteo y susceptibilidad antimicrobiana en la Cooperativa de Producción de Leche “Chuquipogyo” (COOPCHUG) ubicada en la comunidad el Quinual - la Merced, perteneciente a la parroquia San Andrés, cantón Guano provincia de Chimborazo.

Específicos

- Establecer los diferentes tipos de BAL, presentes en Suero Lácteo.
- Analizar la susceptibilidad antimicrobiana, por medio de un antibiograma y en función de los halos formados en los medios de cultivo.
- Definir los antibióticos con mayor potencial antimicrobiano sobre BAL.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Bacterias Acido Lácticas

1.1.1. Generalidades y características microbiológicas de las BAL

Louis Pasteur entre 1857 y 1863 dio inicio al estudio de fermentación ácido láctica. Diez años después en 1873 Joseph Lister consiguió aislar la primera cepa de una bacteria ácido láctica pura (BAL). Las Bacterias Acido Lácticas (BAL) comprenden un número elevado de bacterias cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos.

Este grupo de bacterias probablemente sea el más abundante y difundido en la naturaleza, debido a su capacidad para crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas (Ruiz y Ramirez, 2017, p. 10).

Las BAL, se han aislado de diversas fuentes que incluyen alimentos fermentados, suelo y plantas, también son parte de la microbiota del tracto intestinal de animales terrestres y acuáticos. Las BAL son un grupo de bacilos y cocos Gram positivos, no son motiles, no forman esporas, no reducen nitratos, son catalasa (-) y oxidasas (-).

Son aerotolerantes, ácido tolerantes y organotróficas (Ruiz y Ramírez, 2017, p. 10). Se han encontrado algunas excepciones a esta tipicidad. Miembros del género *Sporolactobacillus* forman esporas y algunas BAL poseen citocromos y pueden respirar si el grupo hemo está disponible. Las bacterias ácido lácticas tienen una composición base de DNA de menos del 50% G + C /mol (Björkroth y Koort, 2016, p. 1).

Estas bacterias pueden emplear glúcidos como fuente de energía y generan ácido láctico como único producto del metabolismo o como el producto final principal, clasificándose en homofermentativas o heterofermentativas respectivamente. Otros metabolitos de la actividad de bacterias ácido lácticas son: etanol, compuestos orgánicos volátiles, responsables del aroma, bacteriocinas, exopolisacáridos y enzimas (Leroy y De Vuyst, 2004, p. 72).

Las BAL como fuente de ingredientes funcionales se han usado ampliamente en nutrición humana, en veterinaria y acuicultura como agentes biológicos para el control de patógenos. Adicionalmente las BAL desempeñan un papel importante en la elaboración de alimentos fermentados hechos a partir de lácteos, productos cárnicos o vegetales. Los alimentos fermentados se reconocen como fuentes naturales de probióticos y componentes seguros de la dieta humana.

Las BAL son importantes en la digestión de la lactosa y muy útiles para prevenir varios tipos de diarrea, controlar el síndrome de vesícula irritable, enfermedades inflamatorias de la vesícula y reforzar la función del sistema inmune a nivel intestinal y sistémico y también son promisorias

contra úlceras estomacales (Wedajo, 2015, p. 4).

Las BAL tienen la capacidad de producir ciertos componentes con actividad antimicrobiana, aspecto que es el principio de su acción conservadora mediante la inhibición de microorganismos patogénicos y de la alteración, lo cual se atribuye a compuestos tales como el ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y tiocianato (Churqui Vilca, 2020, p. 1).

Adicionalmente, las BAL suelen ser usadas como vehículos vivos que suministran moléculas terapéuticas a la mucosa del tracto gastrointestinal humano. Muchas especies de BAL son consideradas en estado de "presunción calificada de seguridad" y poseen la capacidad para sobrevivir al paso a través del tracto gastro intestinal, de hecho, varios tipos de BAL, están habitualmente formando parte de la mencionada microflora saprofica.

Por este motivo son consideradas como las candidatas más aptas para la producción *in situ* de proteínas recombinantes profilácticas y terapéuticas. Es importante acotar que cepas de BAL son capaces de producir los denominados antígenos microbianos, que estimulan una respuesta inmune en seres vivos capaz de conferir protección contra los patógenos correspondientes; por tanto, las BAL son consideradas para ser utilizadas como vacunas orales.

Además, un selecto grupo de BAL, han sido genéticamente diseñadas para que presenten la capacidad de producir anticuerpos neutralizantes terapéuticos (Del Río, et al. 2019, p. 3).

1.1.1.1. Taxonomía y Diversidad de las BAL

Las BAL se agrupan en el Phylum Firmicutes, están incluidas filogenéticamente en la rama de *Clostridium*, Gram (+). Este grupo comprende 6 familias y alrededor de 40 géneros, entre los principales se encuentra a: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*. *Bifidobacteria*, no está relacionada con las BAL, pero sí con *Actinobacteria*. En la Figura 1.1 se aprecia el árbol filogenético de BAL y *Bifidobacterium*.

Por su flexibilidad fisiológica se detectan en varios hábitats tales como alimentos en descomposición, intestino y membranas mucosas de humanos y animales y muchos nichos ambientales donde se encuentren carbohidratos fermentables disponibles en cantidades suficientes (Björkroth, J y Koort, J. 2016, p. 1).

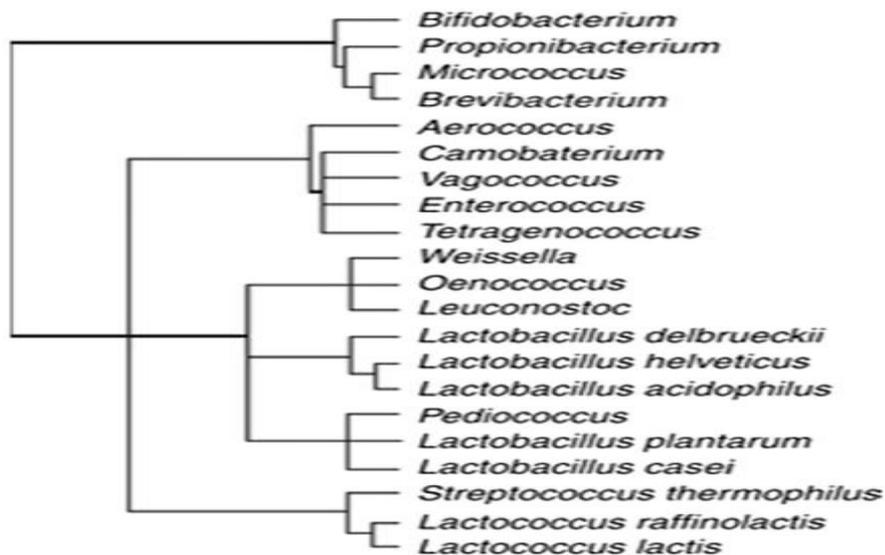


Figura 1.1: Dendrograma de BAL mostrando las relaciones filogenéticas entre bacterias basada en los datos de la secuencia del 16 S rRNA.

Realizado por: Björkroth, J., Koort, J., 2016.

Los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* se asocian comúnmente con la leche y productos lácteos, aunque también se encuentran en otros hábitats, especies de *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* se detectan en la leche y sus derivados. En las fermentaciones de yogurt, queso, salame, masa madre de pan y vinos, las BAL son la clave para promover cambios sensoriales, en la vida media y seguridad del producto.

Muchos *Lactobacillus* y *Lactococcus* spp desempeñan una función principal en las fermentaciones de alimentos tradicionales y en una gama de productos nuevos y productos diseñados para obtener beneficios nutricionales o para la salud (probióticos). Adicionalmente a las BAL generalmente consideradas como seguras, se incluyen algunas bacterias patogénicas, en particular dentro de las especies de *Aerococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*.

Otro grupo de BAL peligrosas son las psicótrofas que pueden crecer durante el almacenamiento refrigerado y llegan a crecer en la carne y productos de pesca empacados en atmósferas modificadas (Björkroth y Koort, 2016, p. 2).

Cabe anotar que la Taxonomía de BAL continúa en rápida evolución determinada en parte por la detección de especies completamente nuevas, así como también por la reorganización, a veces inversa de las especies dentro y entre géneros. Los cambios también surgen de datos generados con métodos más nuevos y sofisticados.

1.1.1.2. Bacterias ácido lácticas, homofermentativas y heterofermentativas

Con base en su metabolismo fermentativo las BAL se clasifican en homofermentativas y

heterofermentativas

Las BAL Homofermentativas: Son capaces de convertir la mayor parte de la glucosa en ácido láctico siguiendo la ruta metabólica propuesta por Embden-Meyerhof, glucólisis con la cual se llega a producir un total de dos moléculas de ácido láctico a partir de cada molécula de glucosa. Esta característica es aprovechada por la industria para facilitar la producción de ácido láctico (Cortés Duque, et al. 2018, p. 9).

La fermentación homoláctica ocurre cuando la concentración de glucosa es limitante o cuando tienen lugar alteraciones a nivel ambiental, en especial cuando aumenta el pH, la temperatura o fermentan azúcares diferentes a la glucosa (Cortés Duque, et al. 2018, p. 9). Existen a la vez bacterias homofermentativas, obligadas y facultativas, estas últimas poseen glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y siguen la vía de las pentosas (Cortés Duque, et al. 2018, p. 9).

Dentro de las BAL homofermentativas se encuentran todos los miembros de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Huertas, 2010, p. 96), como también algunos *Lactobacillus* *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *S. thermophilus* y *P. cerevisiae* (Patel, 2016, p. 737).

BAL Heterofermentativas: Se denominan así las BAL que son capaces de catabolizar la molécula de glucosa en acetato, etanol y CO₂, además de producir ácido láctico. Dentro de este grupo, se encuentran los géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus* y algunos *Lactobacillus*, siendo las bacterias más reconocidas *L. mesenteroides*, *L. cremoris*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc* (Patel, 2016, p. 737).

Las BAL heterofermentativas, convierten hexosas a pentosas por la ruta 6-fosfogluconatofosfocetolasa, existen ciertas BAL heterofermentativas facultativas con capacidad para utilizar ambas rutas, la vía glicolítica de EmbdenMeyerhof y la ruta de la fosfocetolasa siendo su metabolismo principal homofermentativo; con el condicionante de que, si se produce alguna modificación en algunas condiciones de cultivo, tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce la vía 6-PG/PK, ocurriendo la fermentación heteroláctica obligada (Cortés Duque, et al. 2018, p. 9).

El conocimiento de las características fermentativas de las especies como *Leuconostoc*, *Oenococcus* y algunos *Lactobacillus*, es importante para su aplicación en alimentos, de acuerdo a lo que se espera del producto final. En primer lugar, el propio alimento del que se aisló el cultivo sería la mejor elección para su aplicación, debido a la mayor facilidad de adaptación y producción de sustancias de interés (Huertas, 2010, p. 97).

1.1.2. Identificación de bacterias ácido lácticas

La identificación bacteriana de BAL puede realizarse mediante métodos fenotípicos y genotípicos. El genotipo es la información hereditaria completa aun cuando no se exprese. El

fenotipo son las propiedades observadas de un organismo, tales como la morfología (macroscópica y microscópica) el desarrollo o comportamiento (Williams Kp, et al. 2010, p. 2305).

1.1.2.1. Identificación fenotípica

Las expresiones del fenotipo microbiano: morfología, tamaño, forma, esporulación, composición celular, antigenicidad, actividad bioquímica y sensibilidad a agentes antimicrobianos dependen del medio y las condiciones de crecimiento empleadas. Adicionalmente, se consideran reacciones a marcadores químicos o bioquímicos. La dependencia de las reacciones bioquímicas y los patrones de uso del carbono presentan algunas desventajas para obtener resultados de identificación consistentes, es decir repetibles y reproducibles (Sandle T, 2016, p. 105).

1.1.2.2. Identificación genotípica

En contraste a la identificación fenotípica, los métodos genotípicos no dependen del medio de aislamiento ni de las características de crecimiento de las bacterias, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y la amplificación.

Con la secuenciación, se examina la región del RNAr 16 S del genoma debido a que: está presente en casi todas las bacterias, es una región altamente conservada, la función del gen rRNA 16 S no ha cambiado en el tiempo y contiene regiones de secuencia conservada, variable e hipervariable. El gen RNAr 16 S es de tamaño suficiente (1500 bases) para ser relativamente de fácil secuenciación y para contener suficiente información para la identificación (Sandle T, 2016, p. 110). Por consiguiente, la identificación molecular de BAL mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes se basa en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos e incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia mediante la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos (Rodicio MR y Mendoza MC, 2004, p. 241).

1.2. BAL y Susceptibilidad antimicrobiana

En la actualidad el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos es un aspecto de preocupación global, las bacterias introducidas en la cadena alimentaria que adquirieron determinantes de resistencia a antimicrobianos de importancia clínica deben estar ausentes, para prevenir la transmisión de resistencia a través de los alimentos (EFSA, 2012, p. 1).

Este es un hecho que involucra a las BAL, en particular a los lactobacilos que pueden actuar como reservorios de genes de resistencia. Los lactobacilos se usan ampliamente como cultivos

iniciadores o como probióticos en productos lácteos, estas bacterias, pueden interactuar con la microbiota intestinal humana (Teuber, et al. 1999, p. 115).

De esta manera, pueden adquirir genes de resistencia antibiótica y transmitirlos a otras muchas BAL comensales y a bacterias patogénicas (Mathur y Singh, 2005, p. 282). Se considera “resistencia intrínseca” o resistencia natural, cuando la resistencia a un antimicrobiano es inherente a especies bacterianas y es un carácter típico de todas las cepas de todas las especies.

En contraste, cuando una cepa de una especie típicamente susceptible es resistente a un antimicrobiano, se considera como resistencia adquirida. La resistencia adquirida puede ser debida a genes adicionados (genes adquiridos mediante la toma de DNA exógeno) o por la mutación de genes autóctonos (Van Reenen y Dicks, 2011, p. 158).

La posibilidad de transferir resistencia a bacterias patogénicas humanas o de animales podría resultar del empleo de productos microbianos con cepas drogo resistentes. Se sugiere que la transferencia de resistencia de microorganismos viables a otros microorganismos podría ocurrir en un ambiente abierto como el tracto gastrointestinal, existiendo una alta posibilidad de la transferencia lateral de genes, favorecida por elementos genéticos móviles. Sin embargo, se estima que la resistencia intrínseca presenta un mínimo potencial para la transferencia horizontal de genes (Van Reenen y Dicks, 2011, p. 158).

Como regla general, los lactobacilos tienen una elevada resistencia natural a la bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídico, kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoina, norfloxacina, estreptomycin, sulfadiacina, teicoplanina trimetoprin/sulfametoxasole y vancomicina (Danielsen y Wind, 2003, p. 6).

Aunque los lactobacilos estrictamente homofermentativos son sensibles a la vancomicina, muchas cepas de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leishmannii*, *L. acidophilus* tienen resistencia intrínseca a esta droga, debido a la presencia de Dalanina: enzimas relacionadas a D-alanina ligasa (Elisha y Courvalin, 1995, p. 80).

En cuanto a los mecanismos de resistencia, estos son diversos y pueden clasificarse en los siguientes tipos: producción de enzimas que inactivan antibióticos, modificaciones a nivel de proteínas de membrana que impiden el ingreso del fármaco a la diana de acción, la alteración del propio punto diana o la sobreexpresión de bombas de eflujo, lo cual facilita la incorporación y a la vez expulsión del fármaco (Verraes C, et al., 2013, p. 2645).

1.3. Suero Lácteo como matriz de bacterias ácido lácticas

El suero lácteo es un producto derivado de la producción de queso o caseína, se libera durante la coagulación de la leche y representa alrededor del 90% de volumen de leche. En la industria, retiene el 55% de su contenido en lactosa, sales minerales y también proteínas tales como β lactoglobulinas y α lactalbúmina e inmunoglobulinas. Sin embargo, el suero lácteo representa un

problema ambiental cuando se descarta inapropiadamente (Dragone, et al. 2010, p. 1977).

Dependiendo del procedimiento al cual se somete la leche, se puede definir al lactosuero como ácido o dulce. El lactosuero dulce resulta de la elaboración de quesos de pasta cocida y prensada (leche de vaca) y quesos de ovejas. Éste generalmente tiene un menor contenido de ácido láctico, calcio y fósforo y suele obtenerse mediante empleo de enzimas proteolíticas que causan fragmentación de la caseína, desestabilización y precipitación. Por otra parte, el lactosuero ácido se obtiene mediante la precipitación ácida de la caseína, que se logra disminuyendo el pH de la leche a 4.5 (Del Río, et al. 2019, p. 4).

Considerando su contenido en nutrientes, el suero lácteo puede emplearse para la obtención de ricota y de este segundo suero se han reportado usos en producción de bioetanol, hidrógeno, biogás, lípidos microbianos, péptidos bioactivos, en productos alimenticios e hidrolizados de proteínas.

Por otra parte, debido a la presencia de lactosa, vitaminas y minerales, el suero puede usarse como sustrato para la producción de otros metabolitos tales como enzimas, ácido láctico, para la síntesis de galacto-oligosacáridos y para el crecimiento de BAL (Rabaioli Rama, G. et al., 2019, p.26), también se ha propuesto el uso como medio de cultivo para el crecimiento de BAL, de esta manera es posible reducir los costos y el impacto ambiental.

En el Ecuador, el uso del suero de leche es bastante limitado, debido a la necesidad de que este sea concentrado para su distribución y posterior uso en la elaboración de diferentes productos como bebidas de alto valor nutritivo. El uso limitado y cuestionado del suero de leche en la industria láctea sumado al uso indiscriminado de antibióticos dentro del sector ganadero pone en evidencia que aún no se ha logrado establecer un uso adecuado para el suero de leche y de sus componentes en otros campos además de la alimentación.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo y diseño de la investigación

La investigación propuesta para el desarrollo del presente trabajo es de tipo experimental basándose en la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas previamente aisladas a partir de sueros lácteos que se tomarán después de la manufactura de queso fresco y queso mozzarella.

Posterior al aislamiento y purificación de las cepas de BAL por medio de un método cualitativo se definirá la resistencia de los microorganismos aislados frente a diferentes antimicrobianos.

2.1.1. Población de estudio y/o trabajo

La población del presente estudio fueron las bacterias ácido lácticas aisladas de dos tipos de suero lácteo, de la elaboración de Queso Mozzarella y Queso Fresco obtenidos de la Cooperativa de Producción de Leche “Chuquipogyo” (COOPCHUG).

2.1.2. Método de recolección de datos: Analítico Descriptivo

Para definir el grado de susceptibilidad antimicrobiana se empleo el ensayo de difusión en disco de Kirby-Bauer sobre las cepas aisladas y purificadas, en función a la presencia o ausencia de halos libres de bacterias.

2.1.3. Identificación de Variables

Proceso: Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, método de Kirby-Bauer

Hipótesis: Las Bacterias ácido Lácticas caracterizadas a partir del suero lácteo presentan perfiles distintos de susceptibilidad antimicrobiana en agar sangre y en agar MRS

Variable dependiente: Susceptibilidad Antimicrobiana (diámetro en mm de halos de inhibición)

Variable independiente: Aislados de Bacterias ácido Lácticas en AGAR MRS y en AGAR SANGRE

2.2. Equipos, Materiales y Reactivos

Tabla 1-2: Equipos materiales y reactivos

Actividad	Equipos	Materiales	Medios de cultivo, ingredientes, Reactivos
Toma de muestras de sueros lácteos	Refrigeradora	Bolsas ziploc Cooler Bolsas con refrigerante	
Preparación de material de vidrio y medio de cultivo para el aislamiento de colonias de BAL	Autoclave Refrigeradora Estufa de secado Cámara de flujo laminar Incubadora Baño de agua termostatzado	Placas Petri de vidrio de 60 cm de diámetro Tubos de cultivo 15 x 160 mm Asas de Digraskly	Peptona Agua de peptona al 0.1 % Ácido acético 6 M Agar MRS Cicloheximida
Caracterización preliminar y purificación de BAL	Cámara de flujo laminar. Incubadora Lámpara de alcohol Tina de tinción	Placas Petri de vidrio de 60 cm de diámetro Asas de Digraskly Asa de inoculación de 1 µL	Caldo MRS Agar MRS Cicloheximida Ácido acético 6 M Sobres de anaerobiosis (OXOID) Reactivos para coloración de Gram Cristal violeta, solución de I-Ik-alcohol-ácido 50:50 Safranina Peróxido de hidrógeno al 3% Tiras de oxidasa
Otros ensayos de caracterización	Cámara de flujo laminar. Incubadora Lámpara de alcohol		Agar MRS (CMO 361) Ácido acético 6 M Agar SIM Caldo Lactosado Agar Leche Agar Sangre
Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana	Cámara de flujo laminar. Incubadora Lámpara de alcohol	Hisopos Estériles	Agar MRS Agar MRS Sangre Discos con antibiótico: Ampicilina (AM) 30µg Cefuroxima (CXM) 30µg Cloranfenicol (C) 30µg Eritromicina (E) 15µg Gentamicina (CN) 10µg Kanamicina (K) 30 µg Tetraciclina (TE) 30µg Vancomicina (VA) 30µg

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

2.2.1. Toma de muestras

En la planta de lácteos Cooperativa de Producción de leche “Chuquipogy”, los sueros obtenidos como efluentes de la elaboración de quesos, tipos mozzarella y fresco se recogieron durante muestreos realizados 2 veces a la semana.

Se tomaron aleatoriamente, cuatro muestras de 500 mL cada una, dos muestras provenían de la línea de queso fresco, mientras que las otras dos se tomaron de la elaboración de queso mozzarella. Las muestras se trasladaron al laboratorio refrigeradas a 4°C y se mantuvieron en estas condiciones hasta procesarlas. En total se colectaron 30 muestras x 500 mL.

2.2.2. Aislamiento de BAL mediante siembra de diluciones seriadas

A partir de cada muestra de suero lácteo se preparó un homogeneizado mezclando 25 mL de suero con 225 mL de agua de peptona al 0.1%.

El homogeneizado equivale a la dilución 10^{-1} , de esta dilución se tomó 1 mL y se transfirió a un segundo tubo conteniendo 9 mL de diluyente. Se obtuvo así la dilución 10^{-2} .

Se procedió consecutivamente de modo similar hasta preparar la dilución 10^{-6} de la muestra original.

Inoculación del medio selectivo agar MRS (Oxoid CMO 361)

Después de la preparación de las diluciones seriadas, Placas Petri con agar MRS acidificado a pH 5.4, y suplementado con actidiona, (50 mg/L), se inocularon mediante extensión en superficie, por duplicado con 0.1 mL de cada una de las diluciones preparadas.

Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, en microaerofilia, en Jarras Gaspak, empleando el generador de anaerobiosis (ST8090, Oxoid) que suministra hasta un 15% de CO₂.

2.2.3. Identificación de BAL aisladas de sueros lácteos

Culminado el tiempo de incubación, a partir de las placas de agar MRS sembradas por extensión en superficie se seleccionaron las colonias típicas de BAL, recuperando 10 colonias para su caracterización a partir de una población global de BAL estimada en 100 UFC.

Identificación preliminar

La identificación preliminar a nivel de Género se realizó mediante pruebas fenotípicas, previa selección de las colonias típicas de BAL desarrolladas en el medio de cultivo MRS agar (OXOID) La morfología macroscópica de las colonias fue examinada a simple vista, respecto a: forma, tamaño, elevación, borde, consistencia, color.

Coloración Gram

A partir de las colonias típicas de BAL se prepararon frotis, colocando una pequeña gota de

solución salina al 0.85% en un portaobjetos limpio, a la gota se transfirió con el asa estéril material proveniente de una colonia, se mezcló la gota con el material biológico mediante movimientos circulares hasta formar una suspensión homogénea, se extendió la preparación para facilitar el secado, se fijaron las bacterias al portaobjeto por calor, calentando con pases rápidos, a través de la llama del mechero.

Se realizó la tinción de Gram, tratando los frotis de BAL con cristal violeta, 1 minuto, solución mordiente de I-IK durante 1 minuto, solución decolorante alcohol-acetona 50:50, pases breves por el frotis hasta eliminación del cristal violeta en la solución, y adición de safranina 1 minuto. Se lavó con agua de grifo después de la adición de cada reactivo.

La preparación teñida se enjuagó con agua destilada y se dejó secar, para posteriormente colocar una gota de aceite de inmersión y observar en el microscopio, si los microorganismos presentan una tonalidad azul se consideran como Gram positivos y si se presentan con una coloración rosa se consideran como Gram negativos.

Las tinciones se observaron con la lente de 100 X. La coloración Gram permitió el control de la pureza del cultivo.

Purificación del cultivo

Un cultivo puro, se evidencia mediante la coloración Gram que muestra células con reacción positiva para el caso de las BAL y con uniformidad total en su morfología microscópica. Para conseguir este estado fue necesario realizar tres subcultivos mediante siembra en estría a partir del primer aislamiento.

A las colonias con bacilos Gram +, no esporulados, al estado puro se les sometió a los siguientes ensayos:

- **Catalasa.** La catalasa es una forma tóxica del metabolismo oxigenado, para detectar la actividad catalasa en una placa portaobjetos se puso en contacto una gota de peróxido de hidrógeno al 3% con una mínima porción de la colonia, la formación de burbujas de oxígeno, indica reacción positiva.
- **Oxidasa.** Este ensayo detecta la presencia de citocromo C en las bacterias, se emplearon tiras de oxidasa, a las cuales se colocó una pequeña porción de la colonia en la zona reactiva, si la coloración de esta área cambia a una tonalidad azul se considera el ensayo positivo, caso contrario el ensayo es negativo. El color azul se forma por oxidación del reactivo tetrametil parafenileno diamina al ceder electrones al citocromo C.
- **Fermentación láctica:** Este ensayo permite identificar si los microorganismos poseen la capacidad de fermentar la lactosa y generar gas, para poder desarrollar este ensayo se tomó una porción de la colonia y se inoculó en caldo lactosado, a 37°C durante 48 horas.

La presencia de gas en el tubo Durham indica que el ensayo es positivo y las bacterias son heterofermentativas, pero si por el contrario la campana contiene medio líquido en su interior este ensayo es negativo y se consideran a los microorganismos como homofermentativos.

- **Motilidad.** La motilidad se probó en el medio SIM, en el cual se inoculó el microorganismo con ayuda de una aguja de inoculación, picando el cilindro de agar sin llegar hasta el fondo del tubo, se incubó a 37°C durante 24 horas. Una dispersión lejana de los microorganismos a partir de la zona de inoculación en el medio de cultivo, indica motilidad positiva. Si no existe ese desplazamiento, el resultado es negativo.
- **Proteólisis.** La capacidad de las BAL, para degradar las proteínas se realizó en el medio de cultivo agar leche, incubando las cepas a temperatura ambiente, durante un periodo de siete días, se identifica la capacidad de degradado de proteínas por la presencia de halos en el medio de cultivo, a causa de la eliminación del sustrato que forma parte del medio.
- **Producción de H₂S.** En el medio SIM, el tiosulfato de sodio proporciona el azufre y el citrato amónico férrico es el indicador para la producción de H₂S. El ensayo es positivo cuando se observa un color negro debido al precipitado de sulfuro de hierro a lo largo de la línea de inoculación, pero el medio se mantiene de la coloración normal el ensayo se considera negativo.
- **Prueba del Indol.** Es un ensayo para detectar si la bacteria es capaz de producir la enzima triptofanasa (desaminasa), enzima que degrada el triptófano con producción de indol que se acumula en el medio de cultivo SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad). El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indol pirúvico, a partir del cual se produce el indol por desaminación.
Después de adicionado 0,5 mL del reactivo de Kovack's se espera unos segundos para leer el resultado. Positivo (+): aparición de un anillo de color rojo cereza. Negativo (-): el anillo de color amarillo, del mismo color que el reactivo.

Ensayo de hemólisis

Ciertos microorganismos poseen la capacidad de destruir los glóbulos rojos, lo cual es una reacción conocida como hemólisis, la misma que se puede definir en tres tipos que son:

- **Alfa:** Cuando las colonias en el agar sangre provocan una lisis parcial de los hematíes caracterizada por la aparición de un color verdoso en la zona de crecimiento debido a la liberación de biliverdina por la degradación de la hemoglobina.
- **Beta:** Denominada también como hemólisis total, la misma que se caracteriza por la aparición de un halo de transparencia completa en el medio cerca de la zona de siembra.
- **Gamma:** También denominada como no hemólisis, pues los microorganismos no han provocado ningún cambio en el medio, lo cual indica que estos no son capaces de destruir los glóbulos rojos de la sangre (Olmos, A.F. et al., 2010, p. 5).

Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en placa o Kirby Bauer

Preparación del medio de cultivo

Para preparar los medios de cultivo agar MRS (OXOID CMO 361) y agar sangre se siguieron las instrucciones de dilución y esterilización del medio MRS agar, adicionalmente, el suplemento de sangre se agregó al medio MRS, los medios de cultivo se distribuyeron en las placas de vidrio, teniendo el cuidado que el espesor sea de $4\text{mm}\pm 1\text{mm}$.

Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo, se partió de un cultivo puro y fresco de BAL, se tomó material de las colonias y se transfirió a 5 mL de solución fisiológica. Se comparó la turbidez de esta suspensión con la del estándar 0.5 Mc Farland. Si es necesario se ajusta la densidad de la suspensión a la densidad del estándar. Los tubos se mezclaron cuidadosamente, se iluminó bien y se observaron en frente de una línea negra para comparar la turbidez

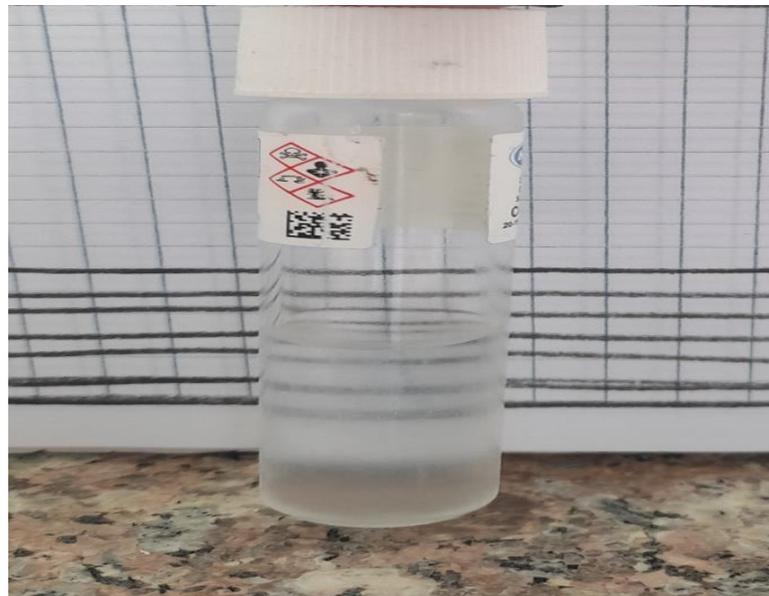


Figura 1-2.2.3: Estándar 0,5 Mc Farland

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Preparación del estándar 0.5 Mac Farland. Turbidez 1.5×10^8 células / mL

El estándar 0.5 Mac Farland se preparó mezclando 0.5 mL de una solución de cloruro de bario al 1% con 99.5 mL de una solución de ácido sulfúrico al 1% (0.36 N).

Ensayo de susceptibilidad (antibiograma)

- Usando un hisopo estéril se inocularon las placas de agar MRS (OXOID CMO 361) y agar sangre con la suspensión bacteriana de BAL ajustada al estándar 0.5 Mac Farland. Para la inoculación: se sumergió el hisopo en la suspensión bacteriana, se retiró y eliminó el exceso de inóculo presionando el hisopo contra la pared del tubo.
- Se tomó el hisopo cargado con el inóculo y rotó sobre sí mismo y la superficie de los medios de cultivo deslizándolo en 3 direcciones (horizontal, vertical y diagonal) para conseguir una inoculación masiva.

- Se dejó secar el inóculo s durante 3-5 minutos con la tapa colocada en la caja. Se colocaron los discos de antibióticos apropiados con el dispensador de discos OXOID ST 6090 de 6 puestos, 90 mm, Con una pinza se presionaron suavemente los discos para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Las placas se incubaron en posición invertida a 37°C durante 18 a 24 horas.

Lectura de resultados

- Después de la incubación se midieron con una regla los halos de inhibición formados alrededor de cada disco, incluyendo los 6 mm de diámetro del disco.
- Con la prueba de difusión en placa existen 3 categorías de bacterias
- Susceptibles: bacterias inhibidas con niveles de antibióticos en sangre y tejidos alcanzado con dosis comunes administradas vía parenteral
- Moderadamente susceptibles: bacterias inhibidas solamente con niveles altos de antibióticos en sangre, alcanzado con dosis máximas de antibióticos. Algunas cepas pueden tratarse, por ejemplo, si la infección surge en el tracto urinario donde las concentraciones del antibiótico exceden a las alcanzadas en la sangre.
- Resistentes: bacterias que inhiben con niveles de antibióticos en dosis aplicables.

Tabla 2-2: Punto de corte de los antibióticos testeados, en base al CSLI.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	SENSIBILIDAD	RESISTENCIA
Ampicilina	30µg	≥17	≤13
Cefuroxima	30µg	≥18	≤14
Cloranfenicol	30µg	≥18	≤12
Eritromicina	15µg	≥23	≤13
Gentamicina	10µg	≥15	≤12
Kanamicina	30µg	≥18	≤13
Tetraciclina	30µg	≥15	≤11
Vancomicina	30µg	≥17	≤14

Fuente: CSLI, 2022

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Identificación genotípica

Para la identificación genotípica, se reactivaron los aislados desde los crioviales mantenidos a -20°C en 5 mL de caldo MRS, e incubados a 37°C durante 12 horas con posterior transferencia a placas de agar MRS.

A partir de los aislados en placas de agar se llevó a cabo el siguiente procedimiento: i) extracción de ADN por métodos convencionales, evaluación de la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes (nanodrop), visualización en gel de agarosa. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para la amplificación

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación del 16 S ARN ribosomal se emplearon los primer universales: 27F/1492R y rpoB-F/rpoB-R.

Los productos de PCR fueron purificados previa secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas empleando programas informáticos con la base de datos de nucleótidos del Gen Bank del NCBI.

A continuación, se aprecian los resultados de la identificación genotípica de los aislados de BAL provenientes de sueros lácteos. El ensayo fue realizado en el laboratorio ID gen.

Código IDgen	Código original	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
B203	CA1	1347	98.1	<i>Bacillus sp.</i>	16S	100	OM004043.1
B204	CA2	1368	98.9	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	100	OM056677.1
B205	CA3	1345	97.6	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	100	LC065035.1
B206	CA4	1105	98.6	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	rpoB	100	CP032637.1
B207	CA5	1149	98.1	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.91	CP023755.1
B208	CA6	1094	97.7	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	rpoB	99.91	CP032637.1
B209	CA7	1090	98.8	<i>Priestia flexa</i>	rpoB	99.91	CP016790.1
B210	CA8	1106	99.0	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.82	CP029052.1
B211	CA9	1069	96.7	<i>Bacillus sp.</i>	rpoB	99.81	CP086061.1
B212	CA10	1129	96.3	<i>Bacillus sp.</i>	rpoB	99.82	CP086061.1
B213	CA11	1276	95.8	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	100	LC065035.1
B214	CA12	1344	96.4	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.85	LC065035.1
B215	CA13	1348	96.9	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	LC065035.1
B216	CA14	1099	96.6	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.91	CP050319.1
B217	CA15	1107	97.7	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	100	CP050319.1
B218	CA16	1317	80.0	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.77	OM056680.1
B219	CA17	1416	97.7	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	100	MT613622.1
B220	CA18	1348	96.1	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	OM056680.1
B221	CA19	1347	93.5	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.70	OM056680.1
B222	CA20	1386	98.3	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	OM056677.1
B223	CA21	1353	98.1	<i>Lactcaseibacillus paracasei</i>	16S	100	OM056680.1
B225	CA23	1121	96.5	<i>Staphylococcus warneri</i>	rpoB	99.82	CP038242.1

Figura 2-2: Resultados de identificación genotípica de aislados de bacterias ácido lácticas

Realizado por: Laboratorio IDgen,2022.

Análisis estadístico

Las medias de los datos se calcularon de medidas repetidas realizadas por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis de varianza de una vía, la prueba de Tukey para establecer diferencias entre las medias no se aplicó por no encontrarse diferencias significativas entre los datos de los halos de inhibición generados en agar MRS y en agar sangre. La significancia estadística considerada fue $p < 0.05$ (Rstudio versión r243, USA, p. 1).

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Aislamiento de BAL

Aspectos importantes de la microbiología son las técnicas de cultivo y la obtención de cultivos puros, lo último es fundamental para la observación y selección de las bacterias que son de interés, En este caso se aislaron las BAL de entre la microbiota propia de los sueros lácteos empleando la técnica de dilución en tubos, porque era de interés conocer la abundancia de las BAL en cada tipo de suero lácteo (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Niveles de BAL aisladas a partir de sueros de Queso

UFC/mL SUERO QUESO FRESCO			
QFA	QFB	QFC	QFD
Dilución 10⁻³	Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻³
UFC= 3,7x10⁵	UFC= 1,45x10⁵	UFC= 2,5x10⁴	UFC= 1,4x10⁶
QFE	QFG	QFH	QFI
Dilución 10⁻⁴	Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻³	Dilución 10⁻³
UFC= 4,3x10⁶	UFC= 2,9x10⁴	UFC= 1,5x10⁵	UFC= 3,5x10⁵
UFC/mL SUERO QUESO MOZZARELLA			
QMA	QMB	QMC	QMD
Dilución 10⁻⁴	Dilución 10⁻³	Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻¹
UFC= 2,5x10⁶	UFC= 1,9x10⁵	UFC= 6,5x10⁴	UFC= 1,2x10⁴
QME	QMF	QMG	
Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻³	Dilución 10⁻³	
UFC= 2,2x10⁵	UFC= 7,7x10⁵	UFC= 8,4x10⁵	

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

En los sueros de queso fresco y queso mozzarella se recuperaron BAL en el orden de 10⁴ a 10⁶ UFC/mL, siendo el nivel de BAL superior al recuperado en sueros de queso de hebra, en el tiempo cero de un proceso de fermentación *in vitro*, donde se recuperaron de entre 10² y 10³ UFC/mL (Martinez-López, V. et al., 2016, p. 336).

Después de realizar los cultivos de los sueros lácteos, se obtuvieron en MRS agar (CM0361, Oxoid Ltd.) colonias con morfología macroscópica típica de bacterias ácido lácticas, colonias pequeñas 1 a 3 mm de diámetro, circulares, de color blanco cremoso, convexas suaves (Tabla 2-3), las mismas que en la observación microscópica bajo 1000 aumentos aparecieron de forma genérica como bacilos Gram positivos no esporulados (Figura 1-3).

Estos resultados se contrastaron con los estudios clásicos de Orla-Jensen en (1924) fue quien describió a las BAL como cocos o bacilos Gram positivos generalmente inmóviles y no esporulados, lo cual coincide también con lo descrito por (Gopal, P.K 2022, p. 1).

Tabla 2-3: Morfología macroscópica de colonias de BAL aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella

Aislado	Diámetro	Forma	Elevación	Bordes	Color	Superficie
QFA-1	2 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFA-2	1 mm	Circular	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFA-3	2 mm	Alargada	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFB-1	1 mm	Circular	Plana	Irregular	Blanco	Brillante
QFB-2	2 mm	Circular	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFB-3	2 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFC-1	3 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFC-2	1 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFD-1	4 mm	Circular	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFD-2	3 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFD-3	3 mm	Circular	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFE-1	2 mm	Alargada	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFE-2	3 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFF-1	3 mm	Esférica	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFG-1	1 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFG-2	3 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QFH-1	2 mm	Esférica	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QFH-2	4 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QMA-1	4 mm	Esférica	Plana	Entero	Blanco	Brillante
QMA-2	2 mm	Circular	Plana	Irregular	Blanco	Brillante
QMB-1	3 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QMC-1	2 mm	Circular	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QMC-2	1 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QMD-1	3 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco crema	Brillante
QMD-2	3 mm	Esférica	Convexa	Entero	Blanco crema	Brillante
QME-1	4 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco crema	Brillante
QME-2	2 mm	Esférica	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QMF-1	1 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante
QMF-2	2 mm	Esférica	Convexa	Irregular	Blanco	Brillante
QMG-1	3 mm	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Brillante

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.



Figura 1-3: Morfología macroscópica de BAL.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Sin duda, el primer paso para la identificación de un microorganismo es obtener su cultivo puro, siendo necesario comprobar esta condición mediante observaciones al microscopio, donde es deseable evidenciar uniformidad en la morfología, tamaño y reacción al Gram de las células (Tabla 3-3).

En la práctica para lograr pureza en el cultivo de BAL se requirió hacer tres subcultivos sucesivos de una colonia típica, después de cada subcultivo, el examen microscópico reveló cada vez mayor uniformidad en la morfología y tamaño de las células, a diferencia de lo que se aprecia en un primer aislamiento, células con morfología y tamaños diferentes.

El empleo de cultivos no axénicos para ensayos de identificación puede conducir a resultado erróneos y variables.

Tabla 3-3: Morfología microscópica de colonias aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella

Código	Gram	Morfología Microscópica	Esporas
QFA-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFA-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFA-3	Positivo	Bacilos	Negativo
QFB-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFB-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFB-3	Positivo	Bacilos	Negativo
QFC-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFC-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFD-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFD-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFD-3	Positivo	Bacilos	Negativo
QFE-1	Positivo	Bacilos	Negativo

QFE-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFF-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFG-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFG-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QFH-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QFH-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QMA-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QMA-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QMB-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QMC-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QMC-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QMD-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QMD-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QME-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QME-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QMF-1	Positivo	Bacilos	Negativo
QMF-2	Positivo	Bacilos	Negativo
QMG-1	Positivo	Bacilos	Negativo

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

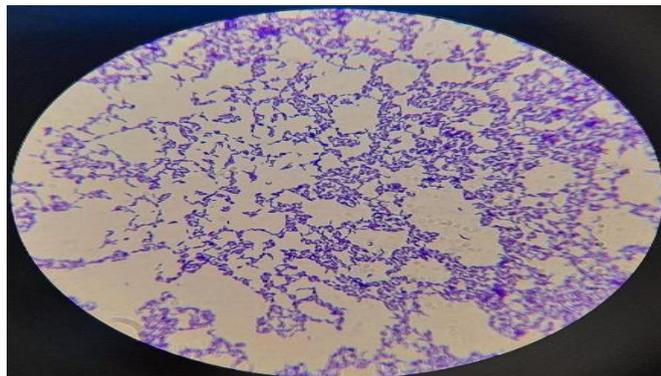


Figura 2-3: Morfología microscópica de BAL.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

3.2. Pruebas de identificación primaria y otros

Estos ensayos permiten caracterizar a nivel de género las bacterias recuperadas a partir de las muestras de suero lácteo examinadas, entre ellas figuran: morfología macroscópica, morfología microscópica, presencia o no de esporas, oxidasa, catalasa, movilidad. Como ensayos metabólicos se aplicaron la fermentación de la glucosa y proteólisis y entre los ensayos de seguridad: la prueba de hemólisis y de susceptibilidad antibiótica.

Para la identificación bioquímica preliminar de estos aislados se empleó en primer lugar el ensayo de oxidasa a fin de determinar la presencia o ausencia de citocromos, De acuerdo a Charteris et

al, (2001, p.12) las BAL carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados a citocromos, Axelsson (1993, p.4) menciona que los citocromos solo están presentes en microorganismos aerobios por la presencia de oxígeno como aceptor final de electrones.

De otro lado, la catalasa que destruye el peróxido de hidrógeno, producto tóxico del metabolismo oxigenado no existe en bacterias aerotolerantes o microaerofílicas como las BAL, lo descrito anteriormente coincide con lo obtenido en este estudio, al encontrar resultados negativos para oxidasa y catalasa (Tabla 4-3).

En adición a las pruebas generales para identificar BAL a nivel de Género, es posible aplicar otras, tales como la prueba de movilidad cuyo resultado fue negativo debido a la ausencia en BAL de flagelo y/o del gen que lo codifique (Figura 3-3). En consecuencia, las BAL son incapaces de difundir en el medio semisólido SIM u otro empleado para este ensayo (Tabla 4-3).

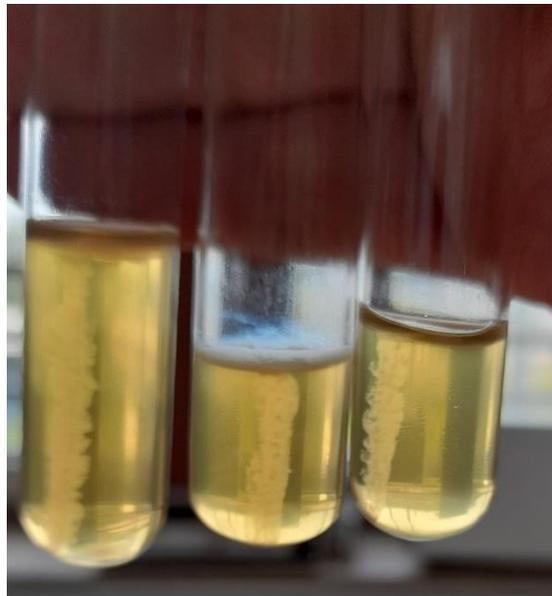


Figura 3-3: Crecimiento de BAL en agar sim

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

La fermentación de glucosa fue positiva, pero sin formación de gas (Figura 4-3), evidenciando crecimiento microbiano con formación de ácido láctico como producto principal. Esta característica está asociada históricamente a la preservación de alimentos, debido a que el pH ácido inhibe el crecimiento y proliferación de los microorganismos de la descomposición, incluso se inhibirían microorganismos patogénicos a este valor de pH (Tabla 4-3).



Figura 4-3: Fermentación de lactosa

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

El ensayo de la proteólisis realizado en agar leche, reveló, a través de la formación de halos de inhibición alrededor de la colonia, la actividad del sistema proteolítico de las BAL (Figura 5-3), y la consiguiente formación de productos de la degradación de proteínas (Tabla 4-3).

Se especifica que la proteólisis desarrollada por BAL, se centra en tres pasos, 1) acción de las proteasas sobre la pared celular, con la finalidad de formar oligopéptidos, 2) transporte de los oligopéptidos a través de las membranas, 3) una vez en el interior de la célula actúan diversas peptidasas que rompen las cadenas largas, en péptidos y aminoácidos pequeños (Rodríguez-Hernández y Chávez-Martínez, 2018, p. 50).

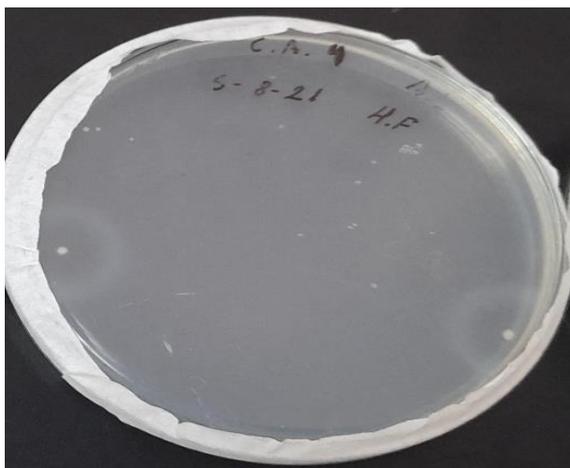


Figura 5-3: Actividad proteolítica de BAL.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Los productos metabólicos: péptidos y amino ácidos contribuyen al crecimiento de estas bacterias fastidiosas en el suero lácteo y aseguran su fermentación exitosa, con flavor y textura deseable,

en el suero lácteo y otros productos de fermentación, Los metabolitos de BAL también podrían beneficiar a la salud.

Estas características han determinado la presencia de BAL en la cadena alimentaria, siendo generalmente reconocidas como seguras, GRAS (generally regarded as safe), y por ende de interés para la industria alimentaria (Motta, ADS y Gomes, 2015, p. 173).

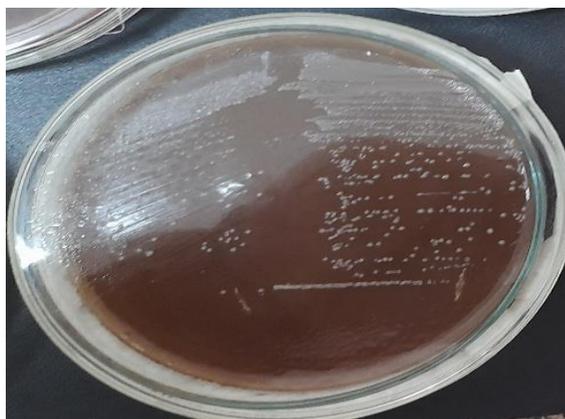


Figura 6-3: Actividad hemolítica de BAL.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Entre las pruebas de seguridad, las BAL fueron sometidas al ensayo de hemólisis en agar sangre y al ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. En cuanto al ensayo de hemólisis se encontró como resultado, ausencia de zona de aclaramiento alrededor de las colonias (Figura 6-3), lo cual indica falta de hemolisinas que afecten la estructura de los eritrocitos, aspecto que se describe como hemólisis gamma (Tabla 4-3).

A diferencia de bacterias patogénicas Gram + que pueden presentar hemólisis alfa o beta. La hemólisis gamma es un ensayo más que asegura la aptitud de las BAL para ser usadas en alimentación humana, coincidiendo con su categorización de microorganismo GRAS (Vélez, 2014, p. 37-38).

Tabla 4-3: Pruebas de identificación primaria y otras aplicadas a colonias aisladas de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella

Código	Catalasa	Oxidasa	Motilidad	Fermentación de Glucosa	Proteólisis	Hemólisis
QFA-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFA-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFA-3	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFB-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFB-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFB-3	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFC-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFC-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ

QFD-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFD-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFD-3	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFE-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFE-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFF-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFG-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFG-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFH-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QFH-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMA-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMA-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMB-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMC-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMC-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMD-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMD-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QME-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QME-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMF-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMF-2	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ
QMG-1	Negativo	Negativo	Negativo	Homofermentativa	Positivo	γ

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

El ensayo de susceptibilidad microbiana se aplicó tanto a las cepas aisladas del suero de queso fresco como a las cepas aisladas del queso mozzarella, sometiéndolas a las mismas condiciones, para lo cual se aplicó el método de disco de Kirby-Bauer, utilizando ocho diferentes antibióticos a concentraciones específicas.

Los antibióticos pertenecientes tanto al grupo de polimixina B y de aminoglicósidos no suele ser efectivos contra BAL, además de que los *Lactobacillus* suelen presentar una capacidad de resistencia propia para los antibióticos como la vancomicina y rifampicina (Flórez García, 2007, p. 7). Estos datos concuerdan con los obtenidos después de la aplicación del ensayo de susceptibilidad microbiana en el laboratorio (Tabla 5-3) (Tabla 6-3), donde las cepas de BAL, obtenidas presentaron una resistencia a dos antibióticos de los ya mencionados siendo la kanamicina un aminoglicósido, mientras que el segundo se trató de la vancomicina, a los cuales presentaron resistencia las cepas obtenidas (Figura 7-3).

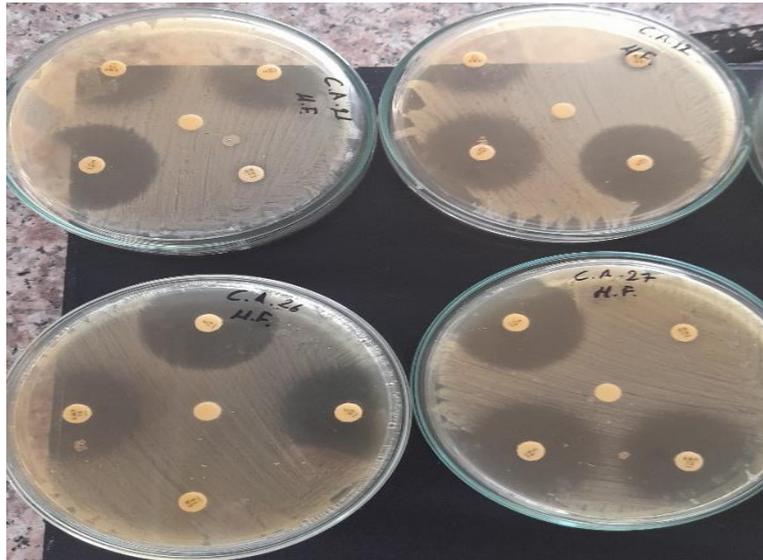


Figura 7-3: Ensayo de susceptibilidad microbiana en colonias de BAL.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

En este mismo sentido, los *Lactobacillus* identificados manifestaron resistencia a la gentamicina, kanamicina y Vancomicina coincidiendo con lo reportado por (Danielsen y Wind, 2003, p. 6). Esta respuesta de los *Lactobacillus* a los 3 antimicrobianos mencionados se consideran como regla general que son casos de resistencia intrínseca (Tablas 5-3 y 6-3).

En cuanto a los demás antibióticos utilizados se aprecia que existe una susceptibilidad clara, debido a la formación de un halo alrededor de los discos de inhibición, si bien estos halos varían en cada repetición, siempre se mantienen en valores cercanos sin una mayor variación, lo que se interpreta como una capacidad inhibitoria constante.

Tabla 5-3: Respuesta en mm de la susceptibilidad de aislados de Queso Fresco y Queso Mozzarella frente a diferentes antibióticos en agar MRS.

Cepa Aislada	Disco en blanco /BD			Ampicilina 10 µg (AM)			Cloranfenicol 30 µg (C)			Eritromicina 15 µg (E)			Gentamicina 10 µg (CN)			Vancomicina 30 µg (VA)			Kanamicina 30 µg (K)			Tetraciclina 30 µg (TE)			Cefuroxima 30 µg (CXM)			
QFA-1	-	-	-	32	40	35	35	33	33	35	39	36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	34	35	33	40	42	41
QFA-2	-	-	-	35	36	33	30	35	34	30	37	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	36	35	32	37	35
QFA-3	-	-	-	31	38	34	32	34	36	30	36	33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	35	40	37	35	39	37
QFB-1	-	-	-	42	41	41	35	36	35	37	40	38	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	37	35	33	41	40	39
QFB-2	-	-	-	36	42	38	31	34	32	32	40	37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	39	35	36	38	39
QFB-3	-	-	-	38	37	35	33	39	37	33	41	38	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	38	37	37	41	40
QFC-1	-	-	-	39	34	37	31	32	34	36	36	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	35	33	36	35	35	35
QFC-2	-	-	-	35	40	38	30	35	36	31	38	36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	37	34	34	37	35
QFD-1	-	-	-	31	36	37	32	40	39	28	39	37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	41	39	32	42	40
QFD-2	-	-	-	28	35	30	27	37	35	29	38	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	40	35	35	41	37
QFD-3	-	-	-	32	40	37	33	36	38	31	37	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	34	36	33	36	38	33
QFE-1	-	-	-	28	37	35	28	38	31	30	35	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	39	40	26	41	34
QFE-2	-	-	-	30	29	32	31	33	35	31	28	29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	34	32	33	30	31	29
QFF-1	-	-	-	27	38	36	23	41	40	25	37	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	28	40	31	29	41	40
QFG-1	-	-	-	28	41	38	27	32	31	28	36	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	29	31	30	26	32	31
QFG-2	-	-	-	31	42	40	29	40	38	30	40	41	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	38	35	35	39	37
QFH-1	-	-	-	25	35	31	23	38	38	26	36	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	27	37	36	29	35	32
QFH-2	-	-	-	27	37	32	26	37	32	25	35	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	30	38	37	28	37	33
QMA-1	-	-	-	26	35	33	27	32	29	26	35	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	29	35	36	27	38	36
QMA-2	-	-	-	29	37	38	30	38	34	28	36	33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	28	36	32	33	37	34
QMB-1	-	-	-	27	40	39	30	38	37	33	41	39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	41	35	24	41	37
QMC-1	-	-	-	28	41	35	29	38	39	31	39	37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	38	36	27	38	36
QMC-2	-	-	-	26	38	29	29	35	34	32	35	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	29	37	32	22	37	30
QMD-1	-	-	-	30	36	35	28	34	33	31	35	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	30	39	37	28	39	37
QMD-2	-	-	-	25	37	38	27	35	34	33	36	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	40	36	27	40	35
QME-1	-	-	-	28	38	32	30	37	35	32	35	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	36	35	29	36	37
QME-2	-	-	-	24	37	33	22	37	31	30	40	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	27	38	36	20	38	36

Cepa Aislada	Disco en blanco /BD	Ampicilina 10 µg (AM)			Cloranfenicol 30 µg (C)			Eritromicina 15 µg (E)			Gentamicina 10 µg (CN)			Vancomicina 30 µg (VA)			Kanamicina 30 µg (K)			Tetraciclina 30 µg (TE)			Cefuroxima 30 µg (CXM)		
QMF-1	- - -	30	40	35	27	40	36	32	39	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	39	37	27	39	36
QMF-2	- - -	29	37	34	28	37	35	34	34	34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	30	35	34	23	35	33
QMG-1	- - -	27	36	37	26	36	36	31	36	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	28	37	35	21	37	35

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Tabla 6-3: Respuesta en mm de susceptibilidad de cepas de Queso Fresco y Queso Mozzarella frente a diferentes antibióticos en agar MRS Sangre

Cepa Aislada	Disco en blanco /BD	Ampicilina 10 µg (AM)			Cloranfenicol 30 µg (C)			Eritromicina 15 µg (E)			Gentamicina 10 µg (CN)			Vancomicina 30 µg (VA)			Kanamicina 30 µg (K)			Tetraciclina 30 µg (TE)			Cefuroxima 30 µg (CXM)		
QFA-1	- - -	32	38	36	32	37	30	31	36	34	R	R	R	R	R	R	R	R	35	37	39	38	34	37	
QFA-2	- - -	34	40	37	33	36	29	36	35	39	R	R	R	R	R	R	R	R	36	38	38	32	39	36	
QFA-3	- - -	35	38	38	32	38	37	36	36	36	R	R	R	R	R	R	R	R	37	39	36	35	38	31	
QFB-1	- - -	31	36	35	28	32	42	33	30	35	R	R	R	R	R	R	R	R	30	35	37	28	38	36	
QFB-2	- - -	38	41	34	32	36	38	34	34	30	R	R	R	R	R	R	R	R	35	40	39	35	40	37	
QFB-3	- - -	33	38	36	36	38	35	34	36	33	R	R	R	R	R	R	R	R	37	39	41	33	39	38	
QFC-1	- - -	36	39	35	30	37	37	32	34	33	R	R	R	R	R	R	R	R	33	41	35	34	38	41	
QFC-2	- - -	38	41	39	32	34	38	34	37	35	R	R	R	R	R	R	R	R	39	38	34	37	40	36	
QFD-1	- - -	32	37	37	30	35	33	40	35	30	R	R	R	R	R	R	R	R	36	37	32	39	39	36	
QFD-2	- - -	33	38	35	31	38	32	37	36	33	R	R	R	R	R	R	R	R	37	39	35	42	38	41	
QFD-3	- - -	34	33	36	38	32	35	32	30	32	R	R	R	R	R	R	R	R	38	35	37	39	34	37	
QFE-1	- - -	36	32	30	32	33	36	36	30	34	R	R	R	R	R	R	R	R	37	39	41	30	35	34	
QFE-2	- - -	34	35	36	30	40	37	36	37	39	R	R	R	R	R	R	R	R	32	38	39	34	31	35	
QFF-1	- - -	32	31	32	37	41	39	34	36	38	R	R	R	R	R	R	R	R	37	33	35	41	36	34	
QFG-1	- - -	40	37	39	38	35	36	36	33	35	R	R	R	R	R	R	R	R	38	37	34	36	35	36	
QFG-2	- - -	37	34	32	32	38	40	35	37	41	R	R	R	R	R	R	R	R	37	34	38	37	38	40	
QFH-1	- - -	33	30	30	32	36	35	34	32	36	R	R	R	R	R	R	R	R	35	30	33	31	35	33	
QFH-2	- - -	34	36	35	36	33	40	32	30	31	R	R	R	R	R	R	R	R	34	37	35	31	39	36	
QMA-1	- - -	32	31	30	33	36	36	34	32	36	R	R	R	R	R	R	R	R	35	36	37	38	39	41	
QMA-2	- - -	37	35	33	34	38	34	33	35	32	R	R	R	R	R	R	R	R	39	35	36	35	35	33	

Cepa Aislada	Disco en blanco /BD	Ampicilina 10 µg (AM)			Cloranfenicol 30 µg (C)			Eritromicina 15 µg (E)			Gentamicina 10 µg (CN)			Vancomicina 30 µg (VA)			Kanamicina 30 µg (K)			Tetraciclina 30 µg (TE)			Cefuroxima 30 µg (CXM)		
QMB-1	- - -	35	33	30	33	41	35	34	33	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	38	41	34	36	38
QMC-1	- - -	36	32	34	32	32	38	38	36	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	38	40	39	37	33	37
QMC-2	- - -	32	37	35	36	38	35	34	35	33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	35	39	41	36	37	34
QMD-1	- - -	34	30	33	33	39	38	40	34	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	33	37	39	30	30	32
QMD-2	- - -	32	32	30	36	36	40	38	33	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	34	38	40	38	40	35
QME-1	- - -	36	33	31	34	38	37	34	30	33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	36	37	39	37	37	34
QME-2	- - -	39	39	40	36	37	34	32	34	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	37	41	38	36	30	37
QMF-1	- - -	38	41	35	35	38	41	35	35	37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	39	35	38	39	35	33
QMF-2	- - -	41	36	34	35	37	35	36	34	31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	37	37	35	38	32	31
QMG-1	- - -	40	35	30	37	36	34	37	36	35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	39	33	34	37	30	35

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

A partir del ensayo de susceptibilidad microbiana, se realizó un análisis comparativo entre los resultados arrojados por los dos medios de cultivo utilizados, siendo estos el agar MRS y el agar MRS Sangre. Los dos medios de cultivo se prepararon con las características correspondientes y se inocularon en las mismas condiciones incubándose durante periodos de tiempo similares, esto con la finalidad de identificar posibles diferencias entre el uso de los diferentes medios de cultivo y los resultados obtenidos en el ensayo de susceptibilidad.

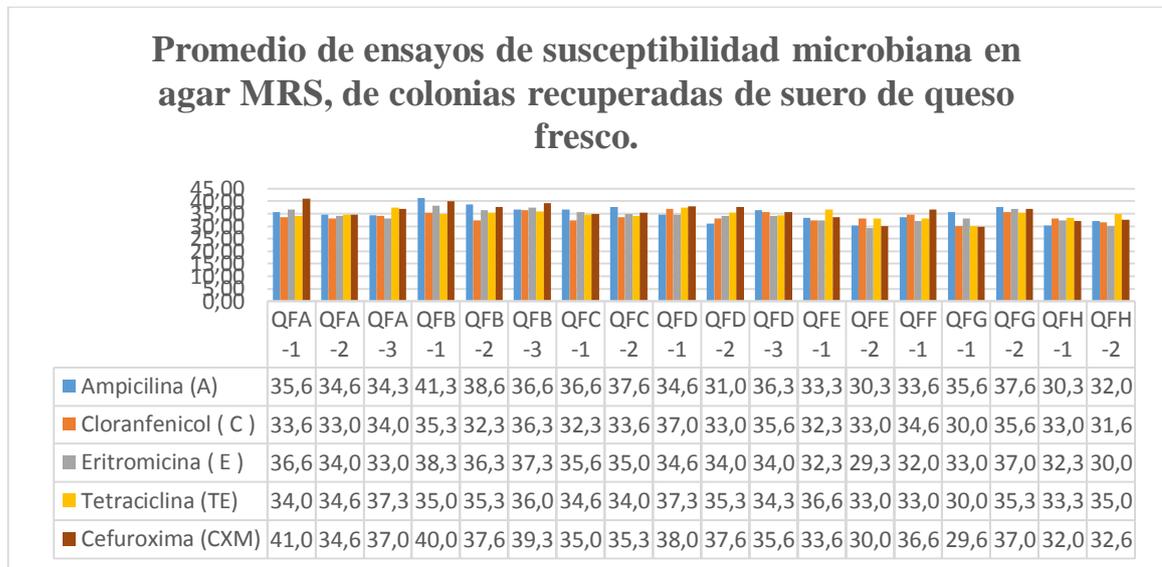


Gráfico 1-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso fresco

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

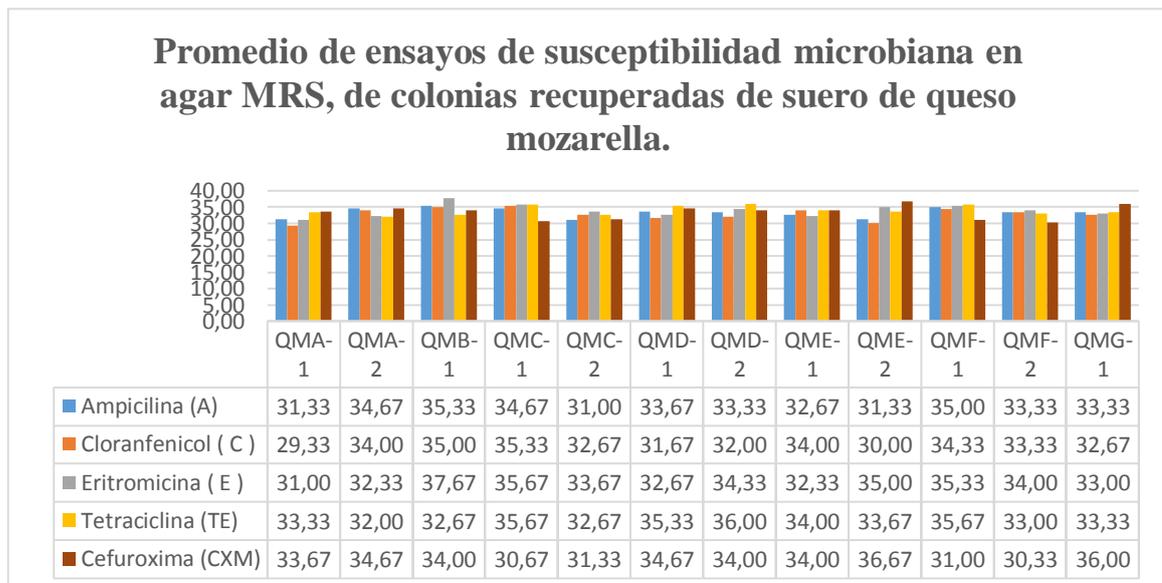


Gráfico 2-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Promedio de los ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS Sangre, de colonias recuperadas de suero de queso fresco

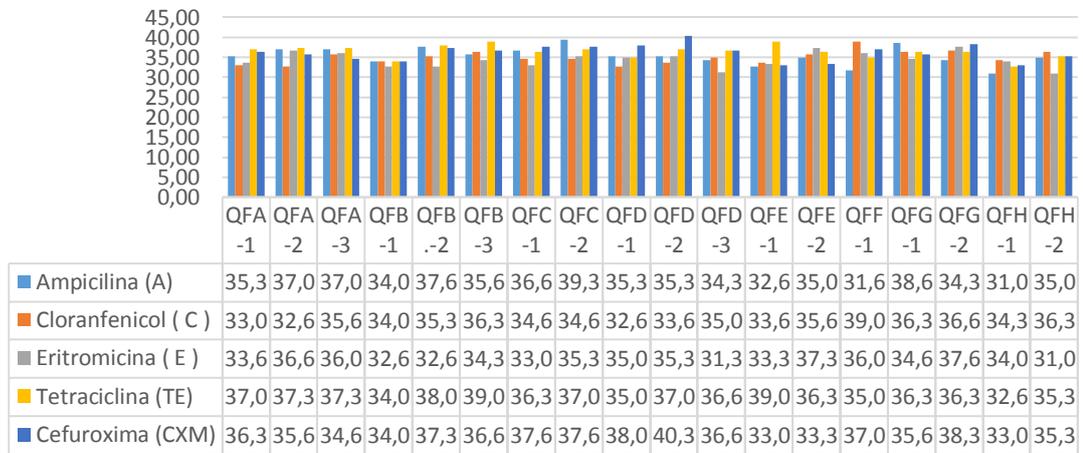


Gráfico 3-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Promedio de los ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS Sangre, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella



Gráfico 4-3: Promedio de ensayos de susceptibilidad microbiana en agar MRS Sangre, de colonias recuperadas de suero de queso mozzarella

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

De acuerdo con los gráficos 1-3, 2-3, 3-3 y 4-3, los BAL aislados presentan una sensibilidad similar tanto si eran originarias de queso fresco o queso mozzarella, sugiriendo de esta forma que no existen diferencias significativas, entre el ensayo realizado en el medio MRS y el medio MRS Sangre, lo cual se corroboró con el análisis estadístico correspondiente.

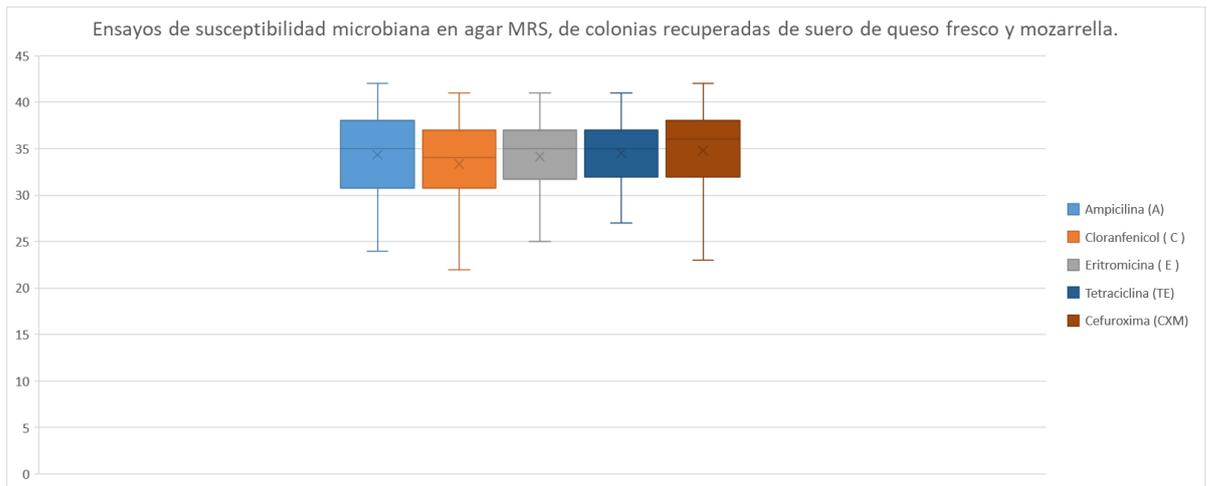


Gráfico 5-3: Porcentaje de susceptibilidad de colonias de BAL, en agar MRS.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

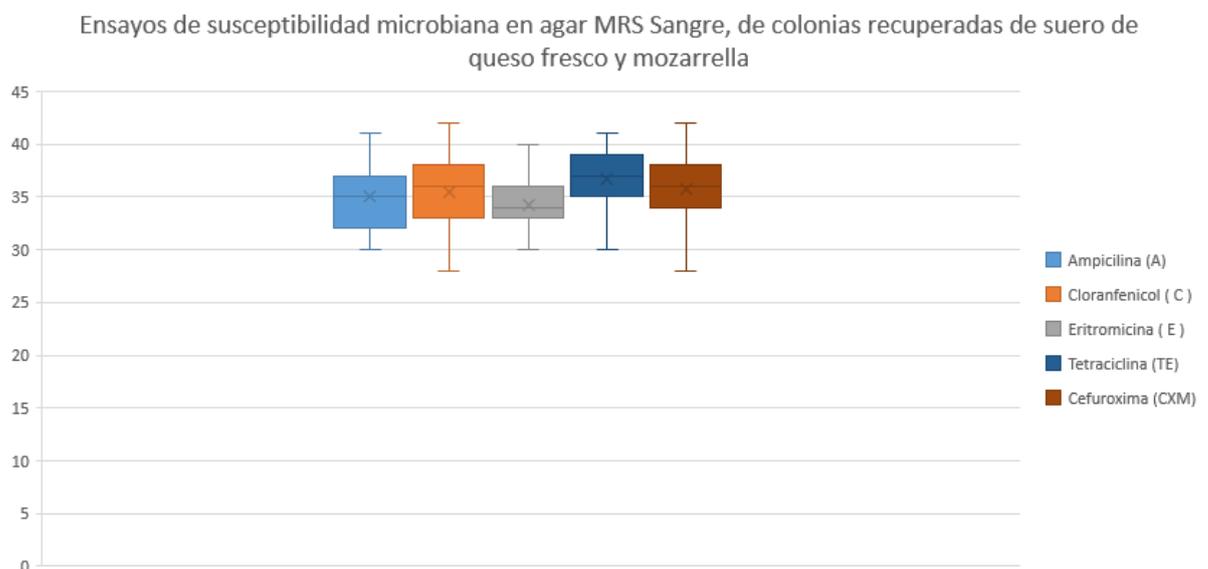


Gráfico 6-3: Porcentaje de susceptibilidad de colonias de BAL, en agar MRS Sangre.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Los resultados ilustrados en los gráficos 1-3 y gráfico 2-3, demostraron que los valores obtenidos en el ensayo de susceptibilidad antibiótica de BAL empleando ambos medios de cultivo son concordantes, los mismos que no resultan ser atípicos, señalando que los datos obtenidos se encuentran dentro de la normalidad, lo cual facilita la aplicación de un análisis estadístico a profundidad, para lo cual la prueba de hipótesis se planteó como:

- H0: Los datos siguen una ley normal
- H1: Los datos no siguen una ley normal

Tabla 7-3: Test de normalidad

KOLMOGOROV – SMIROV	p - valor
MRS (QUESO FRESCO Y MOZARRELLA)	0.3048
MRS SANGRE (QUESO FRESCO Y MOZARRELLA)	0.7591

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

En función del test de normalidad (Tabla 7-3), el p-valor (0,3048; 0,7591) resulta superior al nivel de significancia establecido que es de 0,05 se acepta la H_0 , con lo cual se establece que los valores tanto del medio MRS como el medio MRS Sangre, siguen una ley de normalidad junto con la ausencia de datos atípicos que puedan alterar el resultado.

El ensayo de normalidad aplicado con una confianza del 95%, por medio del test de Kolmogorov-Smirnov, arrojó que los resultados obtenidos no presentaban una diferencia significativa entre ellos, pues los valores de evaluación superaban el porcentaje de error, lo cual indica que los datos obtenidos tras el ensayo de susceptibilidad microbiana se consideran parámetros que siguen una ley normal.

Después de que los supuestos cumplan con normalidad, que provengan de una misma varianza y los datos sean independientes, el anova es válido para el estudio y verificar si las cepas aisladas tienen diferencia significativa en queso fresco y queso mozzarella en las bases de datos MRS Y MRS SANGRE

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datosMRS\Cepa.Aislada	29	6213	214.2	0.585	0.942
Residuals	60	21967	366.1		
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datosMRS2\Cepa.Aislada	29	1737	59.90	1.106	0.363
Residuals	60	3251	54.18		

Figura 8-3: Datos estadísticos ANOVA, para medio MRS y MRS SANGRE.

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

Tabla 8-3: Ensayo ANOVA

ANOVA	p - valor
MRS (QUESO FRESCO Y MOZARRELLA)	0.942
MRS SANGRE (QUESO FRESCO Y MOZARRELLA)	0.363

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022.

El resultado ANOVA (Tabla 8-3), reveló que existe evidencia estadística suficiente en los ensayos de susceptibilidad microbiana tanto en agar MRS y MRS Sangre, de las colonias recuperadas de suero de queso fresco y queso mozzarella para señalar que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, con un nivel de confiabilidad del 95%. Dado que los p-valor (0,942 y

0,363) son mayores al nivel de significancia (0,05), no se requiere realizar la prueba de Tukey, debido a que como tal no existe una diferencia significativa entre los datos.

3.3. Identificación genotípica

El ensayo molecular reveló como género dominante a *Lactobacillus* lo cual coincide en parte con la identificación fenotípica preliminar de bacterias ácido lácticas, realizadas en el presente estudio. *Lacticaseibacillus paracasei*, subespecie paracasei es una cepa muy utilizada dentro de la industria de alimentos, debido tanto a su capacidad de fermentación como a su cualidad para desarrollar productos con potencial probiótico.

Tabla 9-3: Identificación genotípica de colonias aisladas a partir de suero de Queso Fresco y Queso Mozzarella

Código IDgen	Código original	Código Identificación	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
B203	CA1	QFA-1	1347	98.1	<i>Bacillus</i> sp.	16S	100	OM004043.1
B204	CA2	QFA-2	1368	98.9	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	100	OM056677.1
B205	CA3	QFA-3	1345	97.6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	100	LC065035.1
B206	CA4	QFB-1	1105	98.6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	rpoB	100	CP032637.1
B207	CA5	QFB-2	1149	98.1	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.91	CP023755.1
B208	CA6	QFB-3	1094	97.7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	rpoB	99.91	CP032637.1
B209	CA7	QFC-1	1090	98.8	<i>Priestia flexa</i>	rpoB	99.91	CP016790.1
B210	CA8	QFC-2	1106	99.0	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.82	CP029052.1
B211	CA9	QFD-1	1069	96.7	<i>Bacillus</i> sp.	rpoB	99.81	CP086061.1
B212	CA10	QFD-2	1129	96.3	<i>Bacillus</i> sp.	rpoB	99.82	CP086061.1
B213	CA11	QFD-3	1276	95.8	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	100	LC065035.1
B214	CA12	QFE-1	1344	96.4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.85	LC065035.1
B215	CA13	QFE-2	1348	96.9	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	LC065035.1
B216	CA14	QFF-1	1099	96.6	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.91	CP050319.1
B217	CA15	QFG-1	1107	97.7	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	100	CP050319.1
B218	CA16	QFG-2	1317	80.0	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.77	OM056680.1
B219	CA17	QFH-1	1416	97.7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	100	MT613622.1
B220	CA18	QFH-2	1348	96.1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	OM056680.1
B221	CA19	QMA-1	1347	93.5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.70	OM056680.1
B222	CA20	QMA-2	1386	98.3	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	OM056677.1
B223	CA21	QMB-1	1353	98.1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	100	OM056680.1
B225	CA23	QMC-2	1121	96.5	<i>Staphylococcus warneri</i>	rpoB	99.82	CP038242.1
B227	CA25	QMD-2	334	23.8	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	rpoB	97.39	OM056680.1
B228	CA26	QME-1	1106	97.0	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.82	CP050319.1
B229	CA27	QME-2	1061	98.6	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.91	CP023755.1
B230	CA28	QMF-1	1106	98.6	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	99.82	CP029052.1
B231	CA29	QMF-2	1407	97.6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.93	MT613622.1
B232	CA30	QMG-1	1398	97.7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	16S	99.86	OM056677.1

Fuente: Laboratorio IDgen, 2022.

Realizado por: Garrido, Francisco, Fiallos, Henry, 2022

Una característica importante para la verificación del dato es que estas cepas presentan un porcentaje de 99% de identidad con las cepas tabuladas en la base de datos del NCBI, este valor garantiza la efectividad del resultado, es decir la especificación que la cepa aislada pertenezca al grupo de los *Lactobacillus*, que presentan cualidades probióticas.

Dentro de las BAL, otros géneros con esta capacidad son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* y *Weissella*, dentro de los cuales el grupo que presenta la mayor cantidad de especies que poseen características probióticas se encuentran dentro del grupo de *Lactobacillus*, que son aquellos que poseen la mayor cantidad de propiedades benéficas para la salud (Rodríguez Gónzales, 2009, p. 6).

En el presente estudio, todos los aislados de BAL de un mismo nicho, suero lácteo cumplieron con las características primarias de identificación, incluyendo las morfologías macroscópica y microscópica, igual que con la característica bioquímica de fermentación de la lactosa, sin embargo en el análisis genético, de 30 aislados, 16 se han identificado como *Lactobacillus paracasei*, 12 corresponden a microorganismos Gram positivos diferentes de *Lactobacillus*, de estos, uno corresponde a un coco y dos no fueron identificados, con la metodología descrita.

Este hecho se analiza desde 2 puntos de vista: i) Se puede atribuir ambigüedad a las pruebas fenotípicas, coincidiendo con Sánchez, quien describe que dichas pruebas pueden resultar ambiguas cuando diferentes especies o géneros bacterianos presentan características idénticas, además de ser capaces de crecer en ambientes similares, o que cepas de la misma especie no siempre presentan características homogéneas (Sánchez, 2019, p. 20-21).

Sin embargo, en este caso, la morfología colonial no coincide con *Bacillus subtilis*, tampoco el aroma, la reacción a la catalasa, *Bacillus* carece de aroma a cultivo láctico, es catalasa positiva y es esporulado. Lo mismo que la morfología celular no coincide con *Staphylococcus warneri*, tampoco la prueba de la catalasa que para estafilococos es positiva.

Punto de vista ii). En taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que emplea criterios fenotípicos ligados a datos de secuenciación. Esto implica que la secuenciación del ADN_r 16 S no aportaría siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Björkroth, J & Koort, J. 2016, p. 2).

Si bien se ha usado adicionalmente como marcador molecular el gen housekeeping *rpoB*, en el presente estudio 16/30 (53.3%) de aislados han sido identificados completamente como *Lactobacillus paracasei* 12/30 (40%) serían consideradas con ambigüedad fenotípica, siempre y cuando la identificación genotípica sea precisa, caso contrario es necesario repetir la secuenciación con iniciadores más específicos o clave para BAL provenientes de leche.

De otro lado, un estudio sustentado por pruebas estadísticas de validación cruzada, reveló que un valor del 98.65% de similitud del gen ARN_r 16S puede ser utilizado como umbral para la diferenciación de dos especies (Kim et al., 2014, p. 346). Además, se ha establecido que una similitud

entre dos ARNr 16S igual o menor que el 94.5%, 86.5%, 82.0%, 78.5% o 75.0% establece la distinción de género, familia, orden, clase y filo, respectivamente (Yarza et al., 2014, p. 636).

CONCLUSIONES

Se caracterizaron bacterias ácido lácticas a partir de las muestras de sueros lácteos recuperadas de la cooperativa de producción de leche “Chuquipogyo”. Los sueros provenían de la elaboración de queso fresco y queso mozzarella, en ambos casos estas BAL, presentaron un comportamiento característico frente a los ensayos fenotípicos, mostrando cualidades como morfología colonial típica, respuesta positiva a la coloración Gram, morfología celular típica bacilar, ausencia de esporas, y movilidad negativa, capacidad de reacción nula con enzimas como la catalasa y oxidasa.

Además, se estableció que entre los diferentes tipos de BAL, recuperados de los sueros lácteos examinados predomina el género *Lactobacillus*, que son considerados entre los principales representantes de las bacterias ácido lácticas, presentando las cualidades de fermentación de la glucosa pero sin liberación de CO₂, la identificación fenotípica junto con la identificación genética, determino la presencia de *Lactobacillus paracasei*, entre los aislamientos de BAL, detectando incluso subespecies como *L. paracasei* subespecie *tolerans* y otras subespecies catalogadas como nuevas (base de datos de genbank).

En respuesta al ensayo de susceptibilidad antimicrobiana se encontró que los aislados de BAL, eran sensibles a la mayoría de antibióticos testados, exceptuando a la gentamicina, kanamicina y vancomicina, frente a los cuales estas bacterias tienen una resistencia intrínseca o natural, que no representan un peligro para la seguridad alimentaria.

Los antibióticos con mayor efectividad frente a las BAL, en este ensayo semicuantitativo fueron la cefuroxima, ampicilina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol, con base en el criterio: amplitud del diámetro del halo de inhibición; sin embargo, existe el riesgo de que la sensibilidad de las BAL, frente a los antimicrobianos se reduzca por el uso inapropiado de antibióticos en el sector agroalimentario.

RECOMENDACIONES

Realizar un mayor control del uso de los antibióticos en la industria ganadera, para reducir el riesgo de desarrollar nuevas resistencias por parte de la microbiota propia de la leche.

Dada la cualidad de bacterias fastidiosas que poseen las bacterias ácido lácticas, es importante adecuar las condiciones óptimas para facilitar el crecimiento de las mismas, ya sea por la reducción de pH, adición de sustancias que reduzcan el crecimiento de otros microorganismos o el uso de medios de cultivo específicos para el aislamiento de géneros, especies o subespecies de interés.

Se recomienda utilizar técnicas estandarizadas para llevar a cabo los procesos de aislamiento y caracterización, esto con el objetivo de acelerar los procesos dentro del laboratorio y garantizar que los resultados sean confiables.

Es aconsejable llevar un control constante de los resultados que se van obteniendo de manera progresiva, esto con la finalidad de facilitar la identificación de posibles errores que pudiesen afectar el desarrollo del trabajo.

GLOSARIO

- **Aerotolerancia:** Se considera a la cualidad que presentan los microorganismos a resistir al oxígeno molecular que se encuentra libre en la atmósfera, siendo este grado de resistencia variable.
- **Antibiograma:** Es una prueba de sensibilidad relacionada a la resistencia microbiana a fármacos por medio de la técnica de dispersión en disco.
- **Bacterias ácido lácticas (BAL):** Son microorganismos Gram positivos, ácido tolerantes, con la capacidad de sobrevivir de manera natural en medios donde otros microorganismos no serían capaces de sobrevivir.
- **Cepa:** Grupo de organismos emparentados entre sí, cuya respectiva ascendencia común es conocida.
- **Cuajada:** Producto de textura cremosa y origen lácteo, que se elabora con leche coagulada gracias a la acción del cuajo.
- **Fermentos:** Son aquellos productos sólidos o líquidos en el que se produce una o varias fermentaciones, las mismas que causan el cambio de su valor nutricional y por ende el sabor del producto.
- **Homofermentativas:** Se consideran a los microorganismos con la capacidad de convertir la lactosa únicamente en ácido láctico, pueden utilizarse dentro de la fabricación de quesos, creando la acidez necesaria en el medio para alcanzar el pH deseado.
- **Levaduras:** Son hongos de carácter unicelular, pequeños y muy abundantes en la naturaleza, encontrándose de manera muy abundante en la naturaleza.
- **Medios de cultivo:** Son sustancias ya sean en gel o solución, las cuales contienen los nutrientes necesarios para facilitar el crecimiento microbiano.
- **Membrana:** En las células es una capa que se encarga de delimitar la célula dando como resultado la división del medio extracelular e intracelular, está formada por una bicapa lipídica.
- **Piruvato:** Es un compuesto importante para la célula, pues es un sustrato clave en la producción de energía y síntesis de glucosa.
- **Suero Lácteo:** Es la fracción líquida obtenida a partir del proceso de coagulación de la leche, especialmente tras la fabricación del queso y la caseína.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO, C.; et al. “Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador”. *Revista Científica FCV* [en línea], 2007, (Venezuela) 7(3), pp. 301-308. [Consulta: 10 diciembre 2021]. ISSN 0798-2259. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95917314.pdf>

BABA, W.; et al. “Comparison of cheese and paneer whey for production of a functional pineapple beverage: Nutraceutical properties and Shelf life”. *Association of Food Scientists & Technologists* [en línea], 2016, (India) 53(6), pp. 2558-2567. [Consulta: 19 diciembre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951408/>

BASANTES, A. “Elaboración de una bebida a base de suero lácteo y pulpa de *Theobroma grandiflorum*”. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial BSAA* [en línea], 2020, 18 (2), p. 166-175. [Consulta: 9 enero 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7514278>

BJÖRKROTH, J.; & KOORT, J. “Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity”. *Reference Module in Food Science* [en línea], 2016, (Finlandia), pp. 1-4. [Consulta: 3 enero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>

BUTEL, M. “Probiotics, gut microbiota and health” *Médecine et Maladies Infectieuses* [en línea], 2014, (Francia) 44(1), pp. 1-8. [Consulta: 8 octubre 2021]. ISSN 0399-077X. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>

CALLE LÓPEZ, J. “Aislamiento y determinación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas presentes en el suero de quesos artesanales de la provincia de Cañar contra cepas patógenas”, *Tesis de Maestría. Universidad del Azuay* [en línea], 2016. (Ecuador), p. 3. [Consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/5896>

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” [en línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología. Perú. 2020. pp. 1-58 [Consulta: 17 octubre 2021]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

COHENE, M.; et al. “Estudio comparativo de la composición fisicoquímica y organoléptica del dulce de leche de elaboración artesanal utilizando leche y suero dulce de quesería en una proporción 70/30, con y sin hidrolizado de la mezcla”. *Compendio de Ciencias Veterinarias* [en línea], 2016, (Paraguay) 6(1), pp. 17-23. [Consulta: 2 enero 2022]. ISSN 2226-1761. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/ccv/v6n1/v6n1a04.pdf>

CORTÉS, J.; et al. “Evaluación del efecto inhibitorio de extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas (BAL) frente al crecimiento de *Salmonella* spp”. [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Libre Seccional Pereira. Colombia. 2018. pp. 1-37 [Consulta: 10 octubre 2021]. Disponible en: <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/17606/EVALUACION%20DEL%20EFECTO%20INHIBITORIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Los%20resultados%20alcanzados%20en%20la,del%20pat%C3%B3geno%20evaluado%20Salmonella%20spp.>

DANIALI, M.; et al. “Antibiotic resistance propagation through probiotics”. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [en línea], 2020, 16(12), pp. 1-18. [Consulta: 13 noviembre 2021]. ISSN 1207-1215. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1825682>

DANIELSEN, M.; & WIND, A. “Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents”. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], 2003, (Dinamarca) 82(1), pp. 1-11. [Consulta: 19 noviembre 2021]. ISSN 0168-1605. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00254-4)

DAS, D.; et al. “Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*”. *Nutrition* [en línea], 2020, (India) 69, pp. 1-6. [Consulta: 5 noviembre 2021]. ISSN 0899-9007. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110567>

DEL CAMPO, CÁSTULO I. et al. “Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos”. *e-Gnosis* [en línea], 2008 (México), 6, p. 1-17. [Consulta: 15 febrero 2022]. ISSN 1665-5745. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf>

DEL RÍO, B.; et al. “Lactic Acid Bacteria as a Live Delivery System for the in situ Production of Nanobodies in the Human Gastrointestinal Tract”. *Frontiers in Microbiology* [en línea], 2019, (España), pp. 1-16. [Consulta: 16 enero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03179>

DRAGONE, G.; et al. “Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder”. *Biomass and Bioenergy* [en línea], 2011, (Portugal) 35(5), pp. 1977-1982. [Consulta: 29 diciembre 2021]. ISSN 0961-9534. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.045>

ELISHA, B.; & COURVALIN, P. “Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp.”. *Gene* [en línea], 1995, (Francia) 152(1), pp. 79-83. [Consulta: 15 enero 2022]. ISSN 0378-1119. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00692-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00692-L)

FLÓREZ GARCÍA, A. “Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias”. *Caracterización molecular de genes de resistencia* [en línea], 2007, (Oviedo), p. 47. [Consulta: 15 enero 2022]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/5384>

GOPAL, K. “Bacteria, Beneficial: Probiotic Lactic Acid Bacteria: An Overview” [en línea], 2022, (New Zealand), p. 1. [Consulta: 16 febrero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00018-0>

GUIMARAES, P.M.R; et al. “Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey”. *Biotechnology Advances* [en línea], 2010, (Portugal) 28(3), pp. 375-384. [Consulta: 4 julio 2021]. ISSN 0734-9759. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>

HERNÁNDEZ, R. “Lectura interpretada del antibiograma”. *Revista Cubana de Medicina militar* [en línea], 2013, (Cuba) 42, p. 376. [Consulta: 28 diciembre 2021]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572013000400012&script=sci_abstract

HUERTAS, R. “Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos”. *Revista Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial* [en línea], 2010, (Colombia) 8(1), pp. 93-105. [Consulta: 9 enero 2022]. ISSN 1909-9959. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/724/352>

KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. “Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* [en línea], 2014, (República de Corea) 64(2), pp. 346-

351. [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/ijfs.0.059774-0>

LEROY, F.; & DE VUYST, L. “Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry”. *Trends in Food Science & Technology* [en línea], 2010, (Bélgica) 15(2), pp. 67-78. [Consulta: 4 julio 2021]. ISSN 0734-9759. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>

LUGO RAMÍREZ, D. et al. “Propuesta de metodología para analizar el suero lácteo obtenido de la elaboración de quesos en la UEB Pasteurizadora Sagua”. *Tesis Doctoral. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Química y Farmacia. Departamento de Licenciatura en Química* [en línea], 2021, (Cuba) (1), p. 1. [Consulta: 24 enero 2022]. Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu:8089/handle/123456789/13026>

MATHUR, S; & SINGH, R. “Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review”. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], 2005, (India) 105(3), pp. 281-295. [Consulta: 8 enero 2022]. ISSN 0168-1605. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>

MARTÍNEZ-LÓPEZ, Valeria, et al. “Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado”. *Nova scientia* [en línea], 2016, (México) 8(2), pp. 326-339 [Consulta: 21 abril 2022]. ISSN 2007-0705 Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-07052016000200326&script=sci_abstract&tlng=pt

MOTTA ADS, Amanda; GOMES, Melina da Silva Mesquita. “Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food”. *Rev. do Inst. Laticínios Candido Tostes* [en línea], 2015, 70 (3), p. 172-184. [Consulta: 8 octubre 2021]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/040e/b27ce88a07eec1c3ce655a814e1304cf838c.pdf>

NEETHU, M.; et al. “Implications of Antibiotic Resistance in Probiotics”. *Food Reviews International* [en línea], 2015, 31(1), pp. 1-12. [Consulta: 15 agosto 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961075>

ORTEGA, R.; & REBOUILLAT, S. “Bigger data open innovation: Potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry”. *Green Chemistry* [en línea], 2015, (España) 17(12), pp. 1-28. [Consulta: 28 junio

2021]. ISSN 5100-5113. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C5GC01428J>

OLMOS, A.F.; et al. “Métodos de identificación de bacterias en el laboratorio de Microbiología”. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], 2010, (España) 37, pp. 1-52. [Consulta: 18 abril 2022]. ISBN 978-84-614-79-32-0. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

PATEL, S.; & PARIKH, S. “Production of Lactic Acid from Whey by Lactobacillus sp. Isolated from Local Dairy Products”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [en línea], 2016, (India) 98, pp. 734-741. [Consulta: 12 septiembre 2021]. ISSN 2319-7706. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/5-5-2016/Sweta%20A.%20Patel%20and%20Samir%20C.%20Parikh.pdf>

RAMA, G.; et al. “Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures”. *International Dairy Journal* [en línea], 2019, (Brasil) 98, pp. 25-37. [Consulta: 29 julio 2021]. ISSN 0958-6946. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>

RODICIO, M.; & MENDOZA, M. “Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica”. *Enfermedades infecciosas y microbiología Clínica* [en línea], 2004, (España) 22(4), pp. 238-245. [Consulta: 9 enero 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-13059055>

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Gabriela; Chávez-Martínez, América. “Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos”. *Interciencia*, 2018, (Venezuela) vol. 43, no 1, p. 50-54. [Consulta: 4 marzo 2022]. ISSN: 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/339/33955583008/33955583008.pdf>

RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, MARÍA, et al. “Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora”. *Universitat Autònoma de Barcelona*, 2009, (España) 1, p. 10 [Consulta: 8 marzo 2022]. ISBN: 9788469272466. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/3931>

RUIZ, Y. “Potencial probiótico y producción de péptidos antimicrobianos In Vitro de bacterias ácido lácticas del pulque” [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Tecnológica

de la Mixteca. México. 2017. pp. 1-110 [Consulta: 7 noviembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.utm.mx:8080/jspui/handle/123456789/82>

SÁNCHEZ DÁVILA, JOHANNA FABIOLA. “Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto” [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2019. Pp. 1-124 [Consulta: 25 abril 2022]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10767/Sanchez_dj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

SÁNCHEZ, L.; TROMPS, J. “Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico”. *Revista de Salud Animal* [en línea], 2014, 36 (2), p. 124-129. [Consulta: 8 febrero 2022]. ISSN 0253-570X. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2014000200008&script=sci_arttext&tlng=en

SANDLE, T. “Microbial Identification in: Pharmaceutical Microbiology. Essentials for Quality Assurance and Quality Control”. *Elsiever Ltda.* [en línea], 2016, pp. 110-113. [Consulta: 28 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00532-1>

SAURABH, K.; et al. “Effect of lactic acid bacteria and yeast fermentation on antimicrobial, antioxidative and metabolomic profile of naturally carbonated probiotic whey drink”. *LWT* [en línea], 2021, (India) 142, pp. 1-9. [Consulta: 22 octubre 2021]. ISSN 0023-6438. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111059>

SKRYPLONEK, K.; et al. “Probiotic fermented beverages based on acid whey”. *Journal of Dairy Science* [en línea], 2019, (Polonia) 102(9), pp. 7773-7780. [Consulta: 3 julio 2021]. ISSN 0022-0302. Disponible en: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16385>

TEUBER, M.; et al. “Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food”. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* [en línea], 1999, (Holanda) 19(23), pp. 115-137. [Consulta: 16 octubre 2021]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-017-2027-4>

VAN REENEN, C.; & DICKS, L. “Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review”. *Arch Microbiol* [en línea], 2011, 193(3), pp. 157-168. [Consulta: 28 noviembre 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0668-3>

VELÁZQUEZ, L.; et al. “Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco”. *CienciaUAT* [en línea], 2018, (México) 13(1), pp. 165-178. [Consulta: 5 septiembre 2021]. ISSN 2007-7521. Disponible en: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>

VÉLEZ, J. “Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de gran-jas del Aburrá sur”. *Universidad Nacional de Colombia* [en línea], 2014, (Colombia) vol. 14, p. 61. [Consulta: 8 marzo 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/51677/32255433.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VERRAES C, et al. “Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review” [en línea], 2013, 411, pp. 2643-2669 [Consulta: 25 abril 2022]. ISSN 1660-4601. Disponible en: [10.3390/ijerph10072643](https://doi.org/10.3390/ijerph10072643)

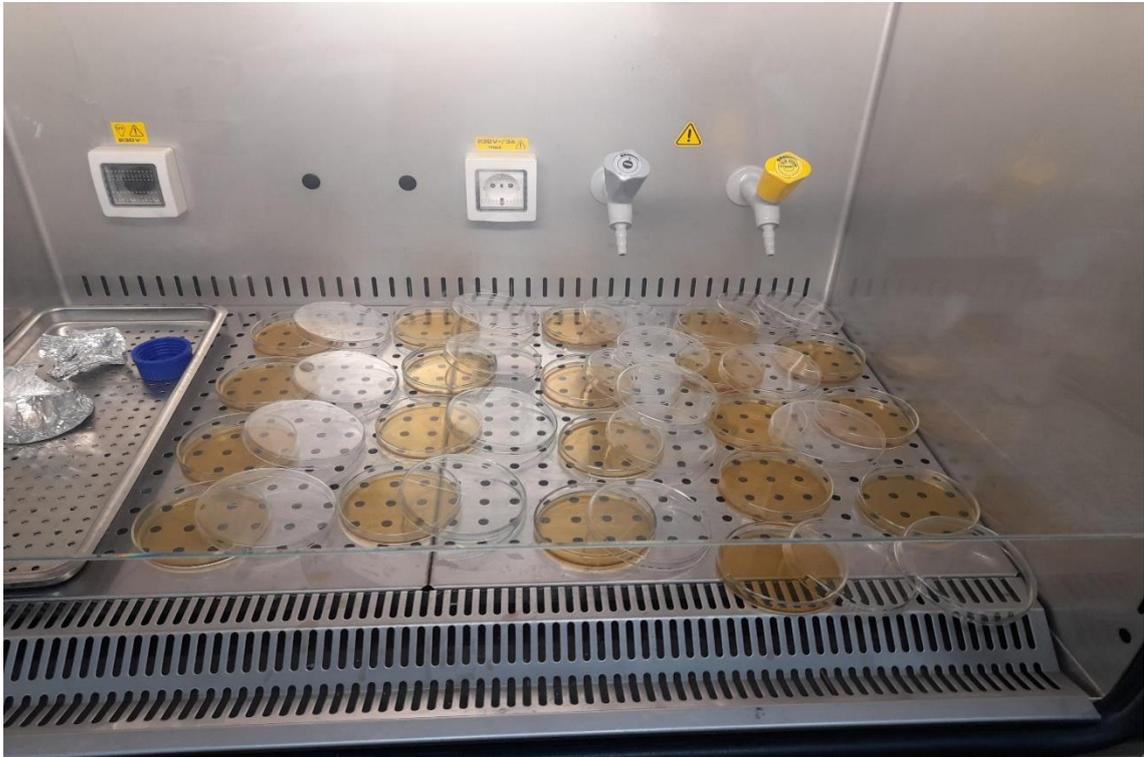
WEDAJO, B. “Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food”. *Journal of Probiotics & Health* [en línea], 2015, (Etiopía) 3(2), pp. 1-9. [Consulta: 7 noviembre 2021]. ISSN 2329-8901. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/lactic-acid-bacteria-benefits-selection-criteria-and-probiotic-potential-infermented-food-2329-8901-1000129.pdf>

WILLIAMS, K; et al. “Phylogeny of Gammaproteobacteria”. *Journal of Bacteriology* [en línea], 2019, (Estados Unidos) 192(9), pp. 2305-2314. [Consulta: 26 noviembre 2021]. ISSN 2305-2314. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JB.01480-09>

YARZA P, et al. 2014. “Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences”. *Nat. Rev. Microbiol* [en línea], 2014, 12(9), pp. 635-645. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3330>

ANEXOS

ANEXO A: ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO.



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

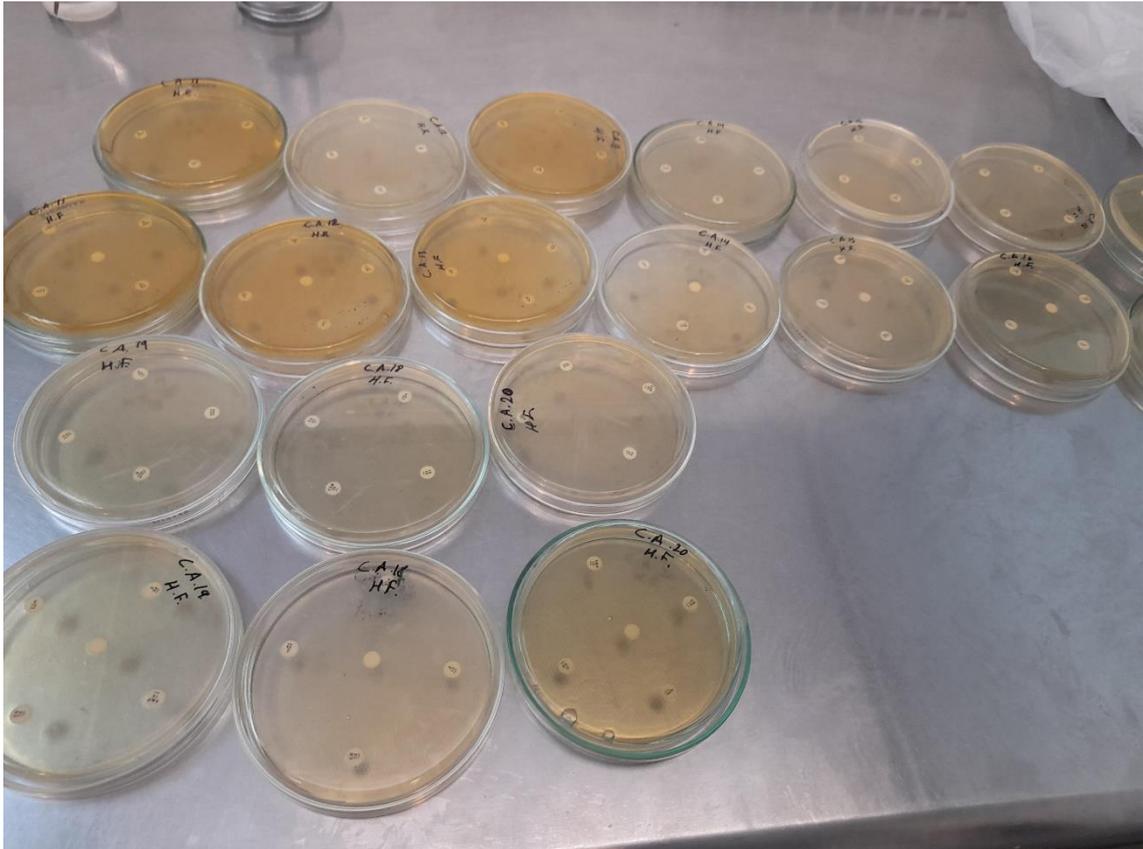
ANEXO B: ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

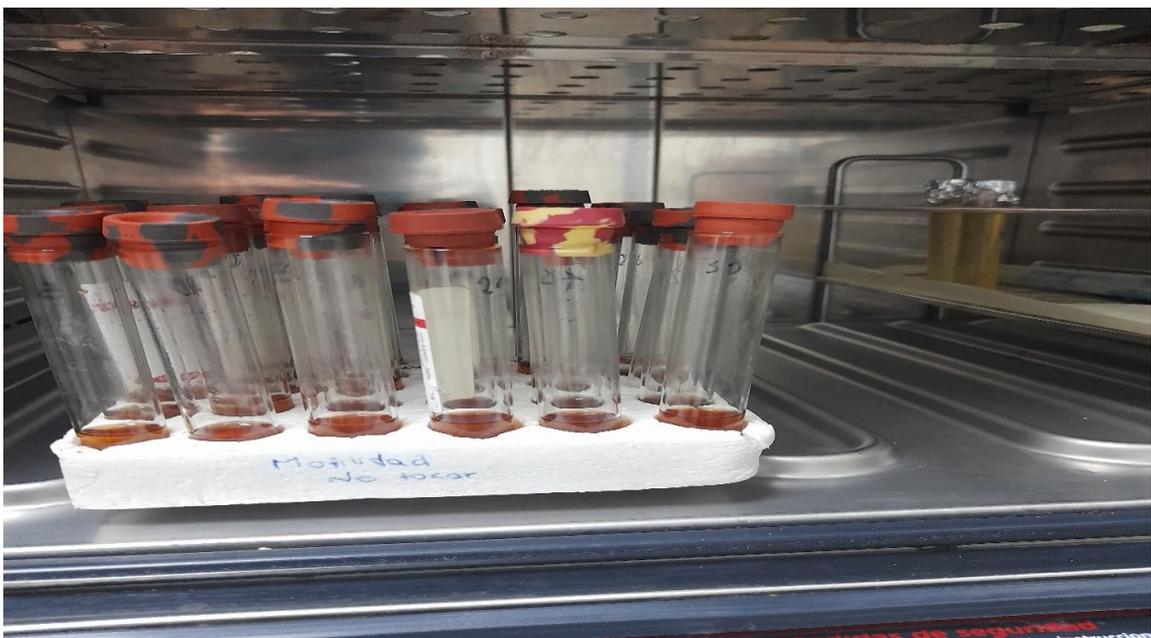
ANEXO C: ENSAYOS DE ANTIBIOGRAMA PREVIOS A SU INCUBACIÓN



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

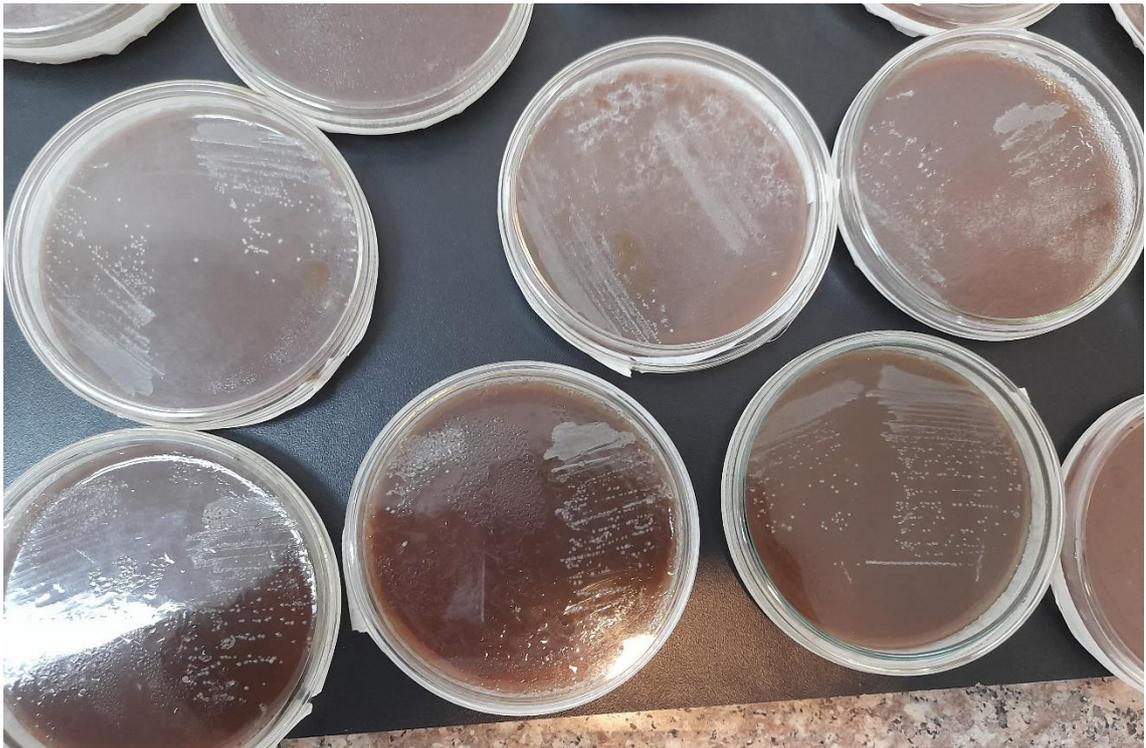
ANEXO D: INÓCULOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS LISTAS PARA SU USO



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

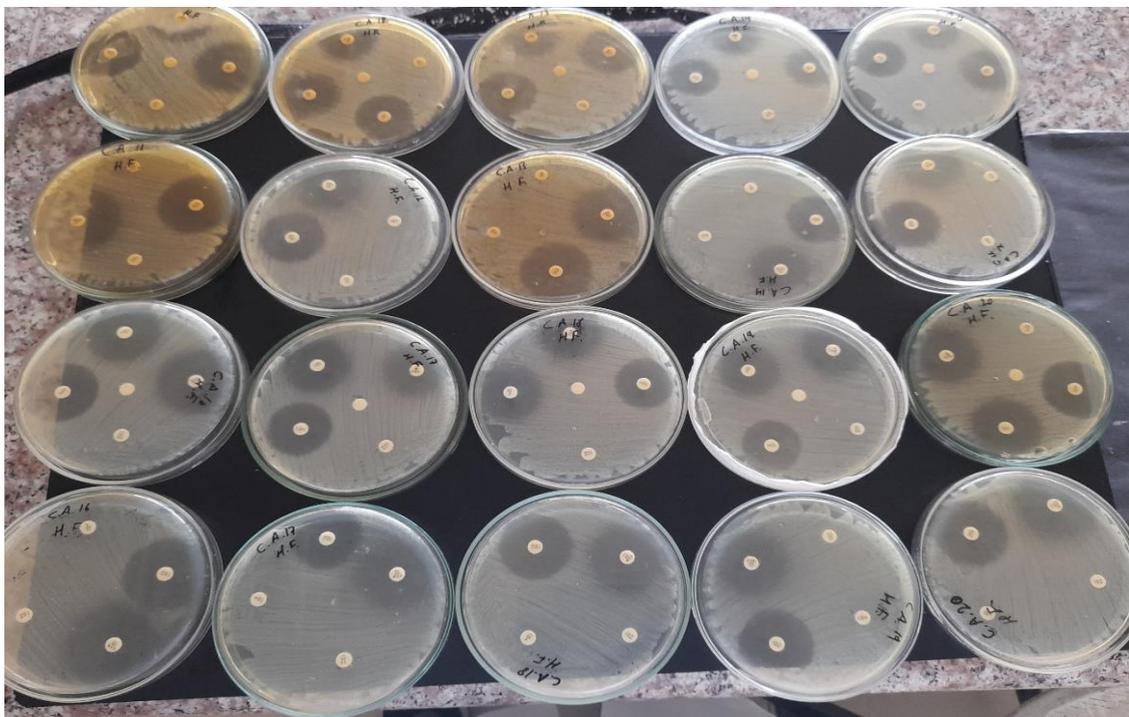
ANEXO E: ENSAYO DE HEMÓLISIS



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

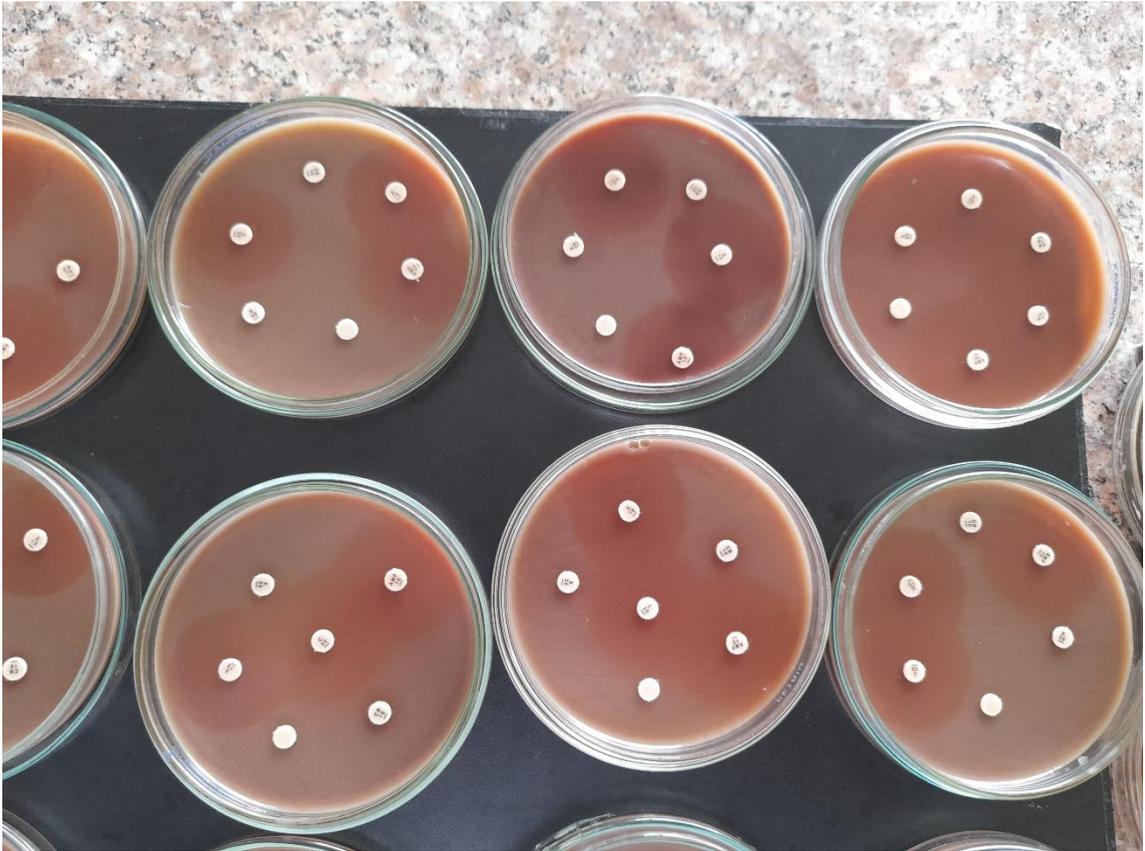
ANEXO F: ENSAYO DE ANTIBIOGRAMA POSTERIOR A LA INCUBACIÓN



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

ANEXO G: ENSAYO DE ANTIBIOGRAMA EN AGAR SANGRE



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

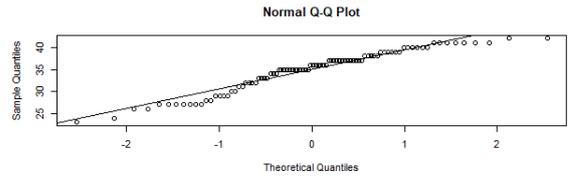
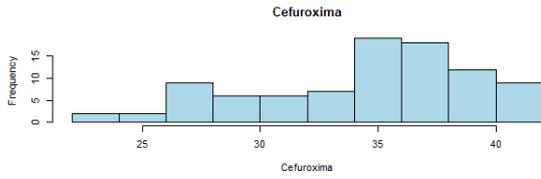
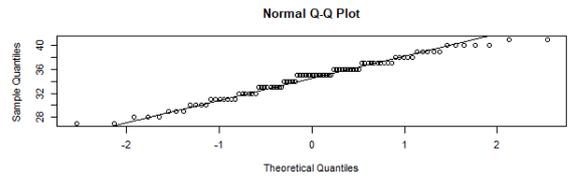
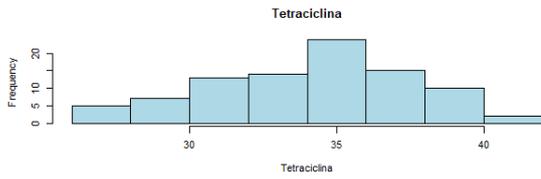
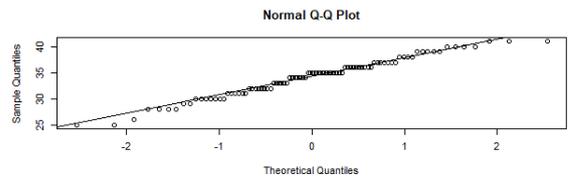
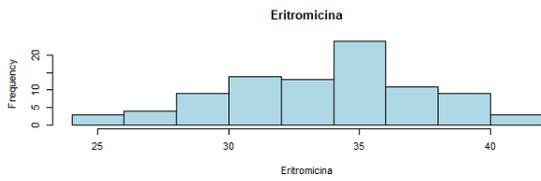
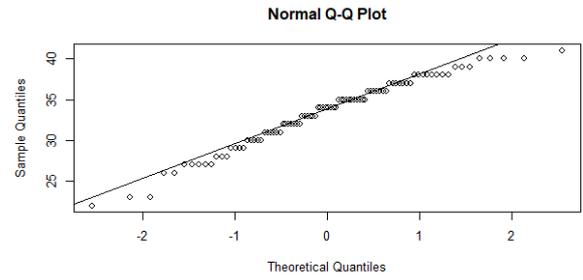
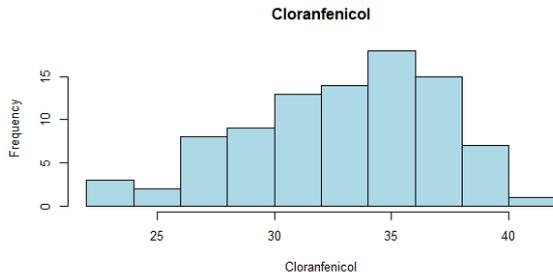
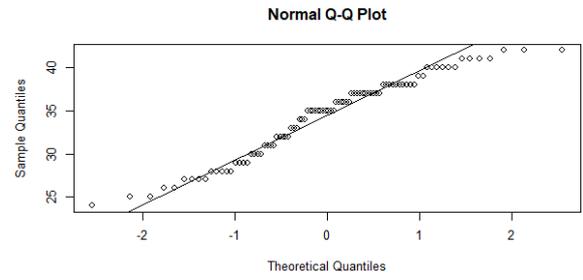
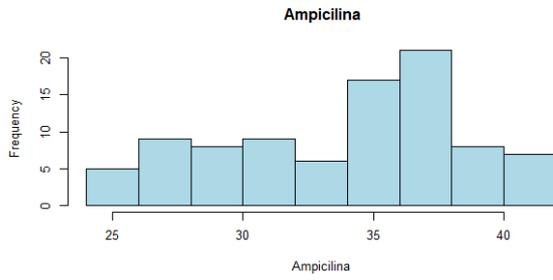
ANEXO H: JARRA DE ANAEROBIOSIS



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

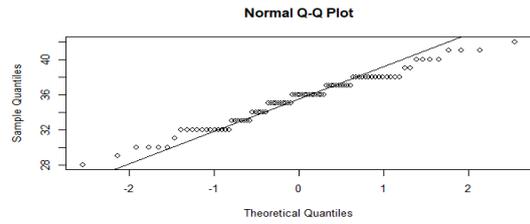
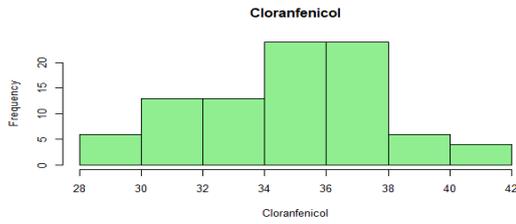
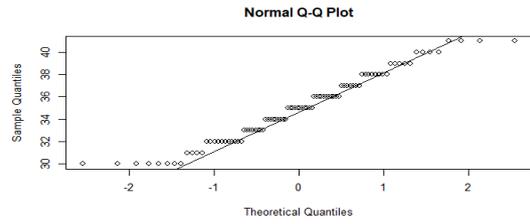
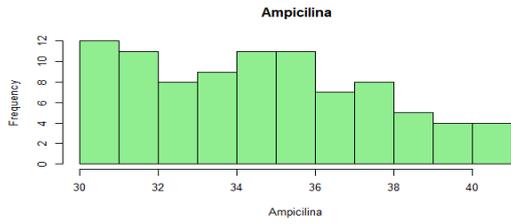
ANEXO I: HISTOGRAMA DE NORMALIDAD, COLONIAS EN MEDIO MRS



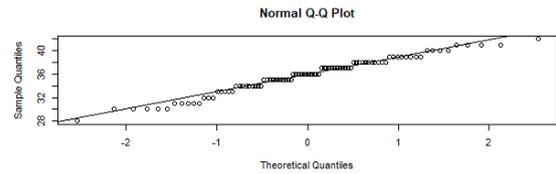
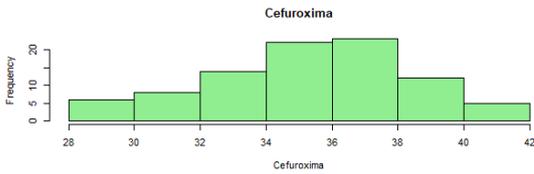
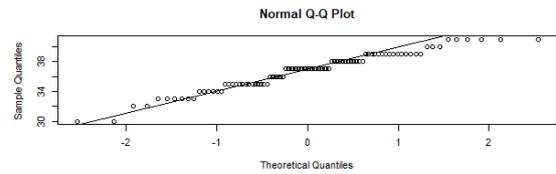
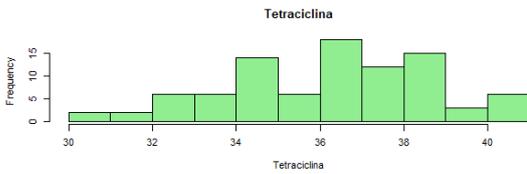
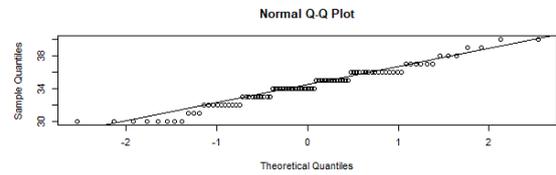
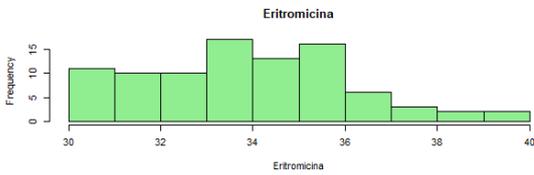
Fuente: RStudio, 2022

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

ANEXO J: HISTOGRAMA DE NORMALIDAD, COLONIAS EN MEDIO MRS SANGRE



Fuente: RSstudio, 2022



Realizado por: Fiallos, Henry, 2022

ANEXO K: ESTADÍSTICO DE PRUEBA

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

```
data: datosMRS$Ampicilina..A. and datosMRS$Cloranfenicol...C..  
D = 0.14444, p-value = 0.3048  
alternative hypothesis: two-sided
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

```
data: datosMRS2$Ampicilina..A. and datosMRS2$Cloranfenicol...C..  
D = 0.1, p-value = 0.7591  
alternative hypothesis: two-sided
```

Durbin-Watson test

```
data: anova1  
DW = 2.951, p-value = 0.9699  
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

Durbin-Watson test

```
data: anova2  
DW = 2.6929, p-value = 0.5997  
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

Fuente: RStudio, 2022

Realizado por: Fiallos, Henry, 2022



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: 27 / 06 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Henry Stalin Fiallos Zaruma
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico y Farmacéutico
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.

LEONARDO
FABIO
MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION-ECIBCE, l=QUITO,
serialNumber=000021485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2022.06.27 13:46:21 -05'00'



1358-DBRA-UTP-2022