



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS INDUSTRIAL Y AMBIENTAL PARA CREAR UN CEPARIO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS (FICA) DE LA UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK”

Realizado por:

Samia Mishell Espín Osorio

Director del proyecto:

Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito 04 de Octubre 2021

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, SAMIA MISHELL ESPÍN OSORIO, con cédula de identidad 1724610371, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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



Samia Mishell Espín Osorio

C.I. 1724610371

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS INDUSTRIAL Y AMBIENTAL PARA CREAR UN CEPARIO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS (FICA) DE LA UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK”

Realizado por:

SAMIA MISHHELL ESPÍN OSORIO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA HERRANZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Dr. Lino Arisqueta Herranz

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

ALBERTO AGUIRRE

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



PhD. José Rubén Ramírez

REVISOR



PhD. Alberto Aguirre

REVISOR

Quito, 04 de Octubre 2021

DEDICATORIA

Mi tesis dedico a mis padres por haberme apoyado en cada paso que doy, muchos de mis logros se los debo a ustedes. Siempre me dieron fuerzas para no rendirme y alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por darme la vida y tener la dicha de poder estudiar. Gracias a mi familia, en especial padre y madre por estar siempre pendientes de mí, guiarme en cada pasa que doy, sin usted no hubiese llegado hasta aquí.

A mis docentes de la FICA de la Universidad Internacional SEK, por llenarme de enseñanzas para desarrollarme profesionalmente y haberme brindado su conocimiento, en especial a mi tutor Lino Arisqueta.

04/10/2021

Para ser enviado:

To be submitted:

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS INDUSTRIAL Y AMBIENTAL PARA CREAR UN CEPARIO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS (FICA) DE LA UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK”

Samia Espín Osorio¹, Lino Arisqueta^{1*}

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito,

Ecuador. 04/10/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D. Lino Arisqueta,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593- 983104230; email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

RESUMEN

La biotecnología está ganando una importancia en el mejoramiento de los procesos industriales tendientes a satisfacer las necesidades del ser humano. Las aplicaciones tecnológicas se emplean para la obtención de productos y/o servicios, o la modificación de procesos tradicionales ya existentes. La UISEK no cuenta con microorganismos aislados para prácticas de laboratorio o trabajos de tesis.

En ese contexto, el presente estudio tiene como finalidad aislar, identificar y caracterizar diferentes tipos de bacterias de interés industrial y ambiental, para la generación de un cepario en la FICA de la UISEK. Se compararon los resultados obtenidos con las técnicas de identificación fenotípica: morfología (tinción de Gram), pruebas bioquímicas y proteómica por MALDI – TOF, obteniendo identificaciones positivas de 8 bacterias distintas.

Además, y puesto que el objetivo era generar un cepario y mantenerlo congelado para posteriores usos en docencia o investigación, se evaluó la mejor manera de conservar estos microorganismos probando dos métodos de criopreservación con glicerol: al 10% y 20%. Las diferencias entre ambos métodos no fueron muy notables aunque sí hubo una ligera tendencia general a crecer mejor tras la criopreservación a 10%.

Palabras clave: bacterias, cultivos axénicos, identificación morfológica, identificación bioquímica, identificación proteómica, conservación

ABSTRACT

Biotechnology is gaining an importance in improving industrial processes to meet human needs. Technology applications are used to obtain products and/or services, or modify existing traditional processes. UISEK doesn't have isolated microorganisms for laboratory practices or thesis work.

In this context, the purpose of this study is to isolate, identify and characterize different types of bacteria of industrial and environmental interest, for the generation of a cepareum at the FICA of UISEK. The results obtained with phenotypic identification techniques were compared: Morphology (Gram staining), biochemical tests and proteomics by MALDI – TOF, obtaining positive identifications from 8 different bacteria.

In addition, and since the objective was to generate a ceparium and keep it frozen for later teaching or research uses, the best way to preserve these microorganisms was evaluated by testing two methods of cryopreservation with glycerol: 10% and 20%. The differences between the two methods were not very noticeable although there was a slight general tendency to grow better after the cytopreservation at 10%.

Keywords: bacteria, axenic cultures, morphological identification, biochemical identification, proteomic identification, conservation

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología podría definirse como cualquier aplicación tecnológica que emplee sistemas biológicos, seres vivos o partes de los mismos para la obtención de productos y/o servicios, o la modificación de procesos tradicionales ya existentes. Los seres vivos más empleados son microorganismos como bacterias y hongos (levaduras y hongos filamentosos) que en grandes fermentadores convierten sustratos de bajo valor en productos de alto valor añadido. Es el caso de la producción de ácidos orgánicos, antibióticos, surfactantes, biocombustibles, etc.

En los últimos años en Ecuador, se ha visto un gran potencial de la biotecnología para el mejoramiento de los procesos industriales tendientes a satisfacer las necesidades de nuestro país (Alejandro et al., 2017). Existen varios sectores y áreas de aplicación de la biotecnología: las empresas de productos alimenticios centran su ámbito de acción en la producción de quesos, leche, mantequilla, cremas etc. para lo que emplean distintos microorganismos; la biotecnología vegetal está dirigida específicamente a la propagación de especies vegetales, forestales y ornamentales (Bejarano, 2015); la biotecnología ambiental como la biorremediación se ha convertido en una alternativa atractiva y prometedora a las tradicionales técnicas físico-químicas para la remediación de los compuestos que contaminan el ambiente (Garzón et al., 2017) y los biocombustibles como una fuente de energía alternativa, de tal forma que puedan ir sustituyendo el empleo de los hidrocarburo (Callejas & Quezada, 2009). Además de todas estas aplicaciones, que son las más extendidas en el país, no debe olvidarse una de las aplicaciones más importantes a nivel mundial de la biotecnología, como es la encaminada a la obtención de productos farmacéuticos y en general a su aplicación en salud. Ejemplo de esto sería la producción de antibióticos, pero también la investigación

básica o aplicada que se realiza en universidades y en instituciones y fundaciones públicas o privadas.

El avance de la biotecnología y su aplicación en diferentes sectores de la industria, permitiendo la innovación a partir de la experimentación genética sobre la materia viva, con fines de producción de bienes o servicios, ha generado problemas de diversa índole sobre todo en los países en vía de desarrollo donde las limitaciones de tipo tecnológico y de talento humano restringen las posibilidades de aprovechamiento de sus riquezas. (Alejandro et al., 2017). Por ello, y para contribuir al tan importante cambio de la matriz productiva, se requieren, no solo de inversiones económicas para la compra de tecnología de vanguardia, sino una adecuada formación académica que provea de profesionales al país. En este contexto, cada vez hay más universidades que ofrecen la titulación de Ing. Biotecnología, entre ellas la UISEK.

La carrera de biotecnología tiene, además de un sólido componente teórico en ciencias básicas y aplicadas, un fuerte componente práctico, imprescindible para que el alumnado adquiera las competencias necesarias para su desempeño profesional. En la UISEK, por ejemplo, hay prácticas de Microbiología, Microbiología de Alimentos, Microbiología Ambiental, Fermentación y Metabolismo, Biorreactores, Biotecnología Industrial I y II, entre otras, en las cuales se emplean microorganismos. Además, los trabajos de titulación o tesis de investigación, requieren a menudo del empleo de microorganismos bien identificados en el laboratorio.

Actualmente, la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas de la UISEK, donde se imparte Ing. Biotecnología, no cuenta con un cepario de bacterias y otros microorganismos por lo que se pierde mucho tiempo y dinero en el aislamiento de éstos cada vez que son necesarios para una práctica o trabajo de titulación (tesis). Además, las estrategias para la mejora de las cepas (para optimizar una característica bioquímica

o metabólica) comienzan a partir de cepas caracterizadas, por lo que tampoco disponemos de microorganismos super - productores de uso industrial (producción de ácidos orgánicos como cítrico o láctico, aminoácidos como glutámico, o incluso antibióticos como la penicilina) y ambiental (indicadores de contaminación, microorganismos capaces de degradar contaminantes ambientales como el petróleo y sus derivados, de suprimir las enfermedades de plantas o de aumentar el potencial productivo de las mismas, etc) (Gortares-Maroyoqui et al., 2020).

Uno de los ambientes naturales que se caracteriza por poseer una amplia diversidad de biomasa microbiana es el suelo. El suelo alberga probablemente la comunidad biológica más compleja. Los organismos del suelo son muy diversos y contribuyen a una amplia gama de funciones que son esenciales para el funcionamiento sostenible de los ecosistemas naturales (Mau et al., 2011).

En la industria láctea se usan principalmente bacterias, los cuales se aplican en yogurt, leches ácidas, mantequillas y diversos tipos de quesos, desde frescos (queso crema) hasta quesos añejos como el gouda. Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen la mayor proporción de microorganismos empleados como cultivos iniciadores, debido al papel que desempeñan en la producción de ácido láctico, además contribuyen con la formación de la cuajada, la inhibición del desarrollo de patógenos y al desarrollo de sabor y aroma, debido a su acción proteolítica, etc. (Cobo-Monterroza et al., 2019).

Por último, el estiércol de vaca es rico en nitrógeno, fósforo y calcio, muy solubles y de rápida asimilación por parte de las plantas, y una amplia variedad de microorganismos benéficos naturales, sin manipulación genética, presentes en ecosistemas naturales, fisiológicamente compatibles unos con otros (RI, 2008).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue aislar bacterias a partir de tres fuentes empleadas como inóculo: tierra, queso crema y estiércol de vaca para la obtención de un cepario con microorganismos identificados, de interés biotecnológico para ser empleados en prácticas de docencia de la FICA – UISEK, Ing. Biotecnología, o en tesis de pregrado o posgrado. Se obtuvieron cultivo axénicos, se identificaron las bacterias presentes mediante pruebas fenotípicas (morfología, bioquímicas, espectrometría de masas de proteínas) y se evaluó la viabilidad de las mismas tras la criopreservación en glicerol durante 30 días.

1.2. HIPÓTESIS

Es posible aislar microorganismos (bacterias) de interés biotecnológico a partir de fuentes naturales, identificarlas y caracterizarlas en la UISEK para la construcción de un cepario con fines investigativos y de docencia.

1.3. OBJETIVOS

GENERAL

Aislar microorganismos microorganismos (bacterias) de interés biotecnológico a partir de fuentes naturales para la construcción de un cepario para la Facultad de Ing. y Ciencias Aplicadas

ESPECÍFICOS

1. Obtener cultivos axénicos de bacterias a partir de muestras de tierra, queso crema y estiércol de vaca
2. Identificar fenotípicamente los microorganismos aislados
3. Evaluar la viabilidad de las bacterias tras su criopreservación

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, Reactivos y Equipos

Tabla 1. Equipos

| Nombre | Modelo | Marca |
|--------------------------|-----------------|---------------------|
| Incubadora | B12 | Heraeus INSTRUMENTS |
| Refrigeradora 1 | - | Durex |
| Refrigeradora 2 | WRI51AKTWW | Whirlpool |
| Espectrofotómetro | DR 5000 | HACH |
| Autoclave | WAC-80 | DAIHAN Scientific |
| Plancha de calentamiento | HP88854105 | Thermo SCIENTIFIC |
| pH-metro | ORION STAR A111 | Thermo SCIENTIFIC |
| Microscopio | CH20IMF110 | OLYMPUS |
| Balanza analítica | BAS 31 plus | BOECO Germany |

Tabla 2. Reactivos

| Nombre | Formula | Casa Comercial |
|------------------------------|---|-----------------------|
| Dextrosa | | Conda |
| Peróxido de hidrógeno | H ₂ O ₂ | BioGENA |
| Reactivos de Kovac | | Merck |
| Reactivo de lugol | | HR Representaciones |
| Agar | | Scharlau |
| Extracto de levadura | | Acumedia |
| Peptona | | BD |
| Magnesio Sulfato 7-hidratado | MgSO ₄ *7H ₂ O | Panreac |
| Alcohol-Cetona | C ₂ H ₆ O*C ₃ H ₆ O | |
| Cristal Violeta | C ₂₄ H ₂₈ N ₃ Cl | |
| Fucsina Básica | C ₂₀ H ₂₀ ClN ₃ | Panreac |
| Aceite de inmersión | | BioGENA |
| Fosfato dipotásico | K ₂ HPO ₄ | MAY & BAKER LTD. |

| | | |
|----------------------------------|--|---------------------|
| Glicerina | C ₃ H ₈ O ₃ | Panreac |
| Citrato de Amonio y hierro (III) | C ₆ H ₈ O ₇ *Fe ₃ *NH ₃ | Sigma |
| Dextrosa | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Conda |
| Acetato de Sodio trihidratado | CH ₃ COONA* ₃ H ₂ O | Fisher Scientific |
| Sulfato de Magnesio | MgSO ₄ | MAY & BAKER LTD. |
| Sulfato de Manganeso | MnSO ₄ | Venegas y Asociados |

2.2 Métodos

2.2.1 Aislamiento de los microorganismos:

2.2.1.1 Recolección de las muestras para inóculo

Se tomaron tres fuentes de inóculo para realizar los aislamientos: (a) muestra de tierra recolectada en la Universidad Internacional SEK, Campus Miguel de Cervantes, Carcelén, (b) muestras de estiércol de vaca recolectadas en el barrio Selva Alegre de San Rafael y (c) muestra de queso crema industrial (marca Toni). Todas las muestras se tomaron en condiciones estériles, se colocaron en bolsas de muestras y se transportaron asépticamente al laboratorio.

2.2.1.2 Preparación medios de cultivos

Tabla 3. Medios de cultivos

| No. | Medio de cultivo | Composición por litro |
|-----|-----------------------------------|--|
| 1 | Agar Man, Rorosa and Sharpe (MRS) | Peptona 10g; Extracto de res 10g; Extracto de levadura 5g; Dextrosa 20g; C ₆ H ₈ O ₇ *Fe ₃ *NH ₃ 2g; CH ₃ COONA* ₃ H ₂ O 5g; MgSO ₄ 0,1g; MnSO ₄ 0,05g; K ₂ HPO ₄ 2g; agar 15g pH final 6.5 ± 0,2. |
| 2 | Agar Nutritivo | Extracto de res 3g; Peptona 5g; Agar 15g. |
| 3 | Caldo Nutritivo | Extracto de res 3g; Peptona 5g |
| 4 | Agar Trypticasa Soja (TSA) | Digerido pancreático de caseína 15g; digerido papaínico de soja 5g; NaCl 5g; agar 15g. |
| 5 | Agar King B | Peptona 20g; C ₃ H ₈ O ₃ 10ml; K ₂ HPO ₄ 1,5g; MgSO ₄ 1,5g; agar 15g pH final 7.2 ± 0,2. |

| | | |
|---|-------------------------|--|
| 6 | Medio SIM | Digerido pancreático de caseína 20g; digerido péptico de tejido animal 6,1g; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,2g; agar 3,5g. |
| 7 | Agar Citrato de Simmons | NaCl 5g; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 2g; K_2HPO_4 1g; $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g; $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$ 0,08g; MgSO_4 0,2g; agar 15g. |

Los medios MRS y King B fueron elaboradas por Samia Espín.

En la **tabla 3** se muestran todos los medios de cultivo empleados en el presente trabajo. De manera general, los medios se prepararon del siguiente modo: se pesaron todos los compuestos indicados en la tabla en función del volumen a preparar y se disolvieron bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes, se procedió a autoclavar los medios para su esterilización (121 °C, 20 min). Se enfriaron parcialmente, se ajustó el pH manteniendo las condiciones estériles y se distribuyó en las placas a utilizar.

2.2.1.3 Obtención de cultivos puros

Para preparar el inóculo, se pesó 1 g de cada muestra recolectada, se homogenizó y se disolvió en 9 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , se tomaron 100 μL y se diseminaron con asa Digralsky en cajas Petri con los siguientes medios de cultivo (**Tabla 3**) en función de la muestra: la muestra de tierra (a) se sembró en agar nutritivo; la muestra de estiércol de vaca (b) en agar TSA y agar King B; y la muestra de queso crema (c) en agar MRS. Las placas Petri se cultivaron a 30 °C entre 24 y 48 h. La muestra de queso crema, se incubó en condiciones anaeróbicas, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en la incubadora dentro de un recipiente hermético.

Para la obtención de cultivos axénicos, se procedió a resembrar las bacterias en los mismos medios mencionados mediante estría múltiple, consiguiendo colonias monoclonales que se emplearon como inóculo para la siguiente resiembra. Este

procedimiento se realizó varias veces hasta conseguir cultivos puros. Las condiciones de cultivo fueron las indicadas más arriba.

2.2.2 Identificación de los microorganismos aislados

2.2.2.1 Identificación morfológica

Para la tinción Gram (Akter et al., 2016), mediante el asa de siembra, se tomó una colonia del cultivo puro y se extendió en una gota de agua destilada estéril colocada sobre un portaobjetos estéril. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó utilizando el mechero. Luego se agregó una solución de cristal violeta al 0,5% durante 1 minuto y se lavó delicadamente sin verter el agua destilada directamente sobre la muestra. A continuación, se colocó solución de Lugol como mordiente durante 1 min. Luego, se añadió la solución de alcohol - acetona para decolorar durante 5-30 segundos y se lavó con agua. Se añadió solución de fucsina básica al 2% se esperó durante 1 minuto y se lavó delicadamente con agua. Finalmente, el portaobjetos se examinó con un microscopio óptico con objetivo 100X utilizando aceite de inmersión.

2.2.2.2. Identificación bioquímica y fenotípica

Prueba Catalasa

Esta prueba sirve para identificar los microorganismos que expresan la enzima catalasa, presente en la mayoría de microorganismos que poseen citocromo. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (**Figura 1**) (Reiner, 2016).

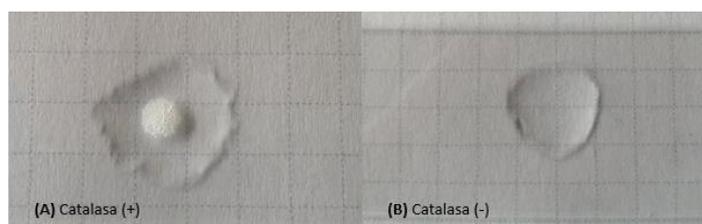


Figure 1. Prueba catalasa. (A) Catalasa (+):*Enterobacter cloacae* y (B) Catalasa (-):*Lactobacillus zeae*

Mediante asa de siembra se dispersó una colonia del cultivo puro de 18 a 24 h de incubación sobre una gota de H₂O₂ al 3% colocada en un portaobjetos con cuidado de no recoger agar que pudiera provocar falsos positivos. Se observó la formación inmediata de burbujas, lo que se consideró catalasa (+).

Prueba de motilidad

Esta prueba sirve para identificar si un microorganismo es móvil o inmóvil, principalmente en un medio de agar semisólido. Este medio tiene una consistencia muy suave que permite que las bacterias móviles migren fácilmente a través de ellos causando enturbiamiento (**Figura 2**). Las bacterias tienen movilidad por sus flagelos que se encuentra mayormente entre los bacilos aunque hay cocos flagelados (Silvavega et al., 2020).

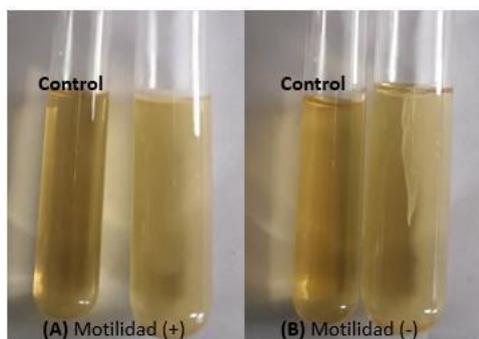


Figure 2. Prueba de motilidad. (A) Motilidad (+): *Bacillus cereus* y (B) Motilidad (-): *Enterococcus faecalis*

Mediante un punzón se tomó una colonia de cultivo puro de 18 a 24 h de incubación y se realizó una picadura sobre el medio SIM de 1,5 cm aproximadamente. Los tubos se incubaron entre 35 y 37 °C y se examinaron a las 24 h. La movilidad bacteriana se determinó cualitativamente: la motilidad (+) se percibió como turbidez difusa o total en el medio, y la motilidad (-) como ausencia de crecimiento o crecimiento limitado únicamente al lugar de la picadura.

Prueba de Indol

Esta prueba sirve para identificar microorganismos que degradan el aminoácido triptófano en indol. La presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias provoca la hidrólisis del aminoácido y su desaminación, produciendo indol. La **figura 3** muestra la reacción de desaminación catalizada por triptofanasa, durante la cual se elimina el grupo amino (-NH₂) de la molécula de triptófano. Los productos finales de la reacción son indol, ácido pirúvico, amonio (NH₄⁺) y energía. Se requiere fosfato de piridoxal como coenzima.

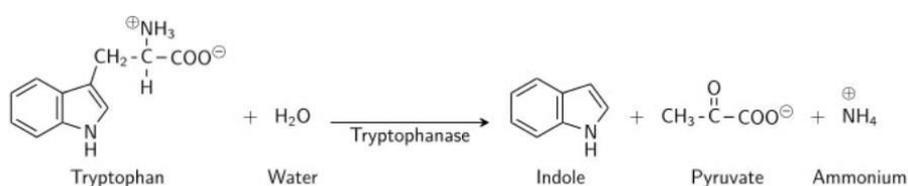


Figure 3. Degradación del aminoácido triptófano en indol por triptofanasa.

Cuando el indol reacciona con el reactivo de Kovac (que contiene ácido clorhídrico y p-dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico), la solución cambia de amarillo a rojo cereza. Debido a que el alcohol amílico no es soluble en agua, la coloración roja se formará en una capa aceitosa en la parte superior del caldo (**Figura 4**) (MacWilliams, 2009).

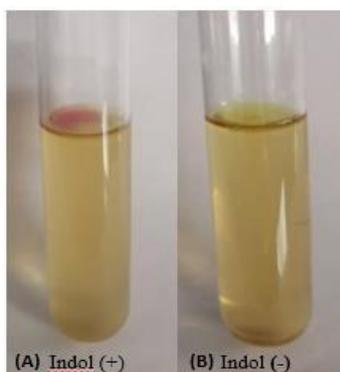


Figure 4. Prueba indol. (A) Indole (+): *Escherichia coli* y (B) Indol (-): *Bacillus cereus*

Luego de interpretar el resultado de la motilidad, se agregaron 2 o 3 gotas de reactivo Kovacs en los tubos y se observó el cambio de color a rojo en el caso de bacterias indol (+). Las colonias que no provocaron cambio de color en el reactivo de Kovacs se consideraron indol (-).

Prueba de Citrato

El agar citrato se utiliza para probar la capacidad de un organismo para utilizar el citrato como fuente de energía. El medio contiene citrato como única fuente de carbono y sales inorgánicas de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden crecer en este medio producen una enzima, citrato-permeasa, capaz de convertir el citrato en piruvato (**Figura 5**). Cuando las bacterias metabolizan el citrato, las sales de amonio se descomponen en amoníaco, lo que aumenta la alcalinidad. El cambio de pH convierte el indicador de bromotimol verde en azul intenso por encima de un pH de 7,6 (**Figura 6**) (V. Benvenuto, 2017).

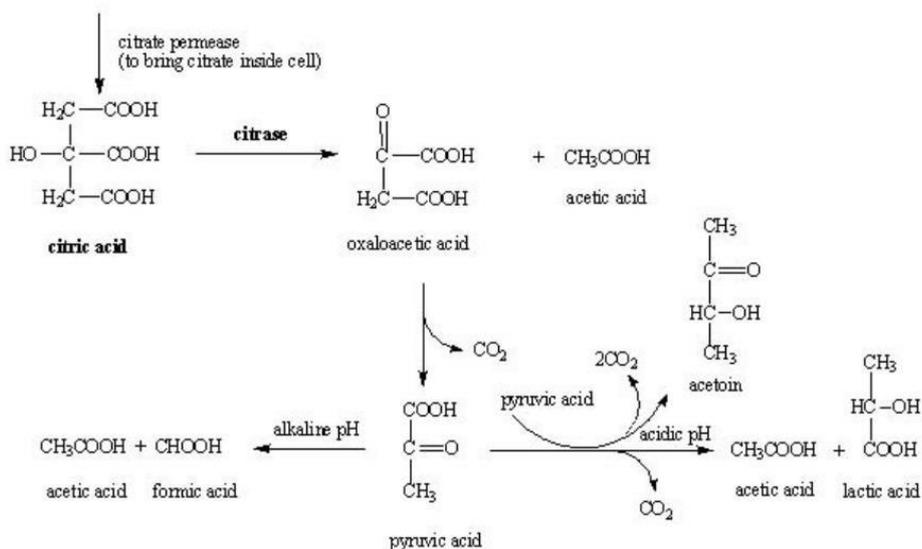


Figure 5. Degradación del citrato en piruvato



Figure 6. (A) Citrato (-): *Lactobacillus rhamnosus* y (B) Citrato (+): *Enterobacter cloacae* 4 mL de medio agar citrato de Simmons estéril se vertieron en tubos de 10 mL estériles inclinados y se dejaron solidificar. Una colonia de del cultivo puro de 18 a 24 h de incubación, se sembró en la superficie inclinada del medio de cultivo y los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación, se observó el cambio de color: las muestras citrato (+) provocaron un cambio de color a azul intenso, mientras que las muestras citrato (-) mantuvieron el color verde del medio citrato de Simmons.

2.2.2.3. Identificación proteómica por espectrometría de masas MALDI - TOF

Extracción

Para la identificación por espectrometría de masas MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight) por sus siglas en Ingles, se empleó el siguiente método de preparación de las muestras a partir de las colonias cultivadas 24 h en agar nutritivo: una de las colonias crecidas en agar nutritivo se colocó sobre la placa metálica del espectrómetro de masas empleando un palillo de madera estéril y se dejó secar al aire tras añadirle 1µl de ácido fórmico al 100%. Tras este paso, se añadió 1µl de solución saturada de la matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico y se dejó secar al aire. Esta solución se preparó disolviendo 2,5 mg de matriz en una mezcla de

acetonitrilo, ácido fórmico, H₂O ultra pura en proporción 475:25:500 v/v/v. Tras este paso se procedió a la lectura.

Lectura e interpretación de resultados en MALDI - TOF

Una vez secas las colonias con la matriz, en la placa metálica del MALDI - TOF, se procedió a la identificación proteómica de las bacterias. Siguiendo el INST-TEC-N°030 del laboratorio Centro de Investigación Microbiológica (CIM), se esperó a que se alcanzara el vacío en el equipo, y se procedió a la lectura de los pocillos de la placa metálica. Cada pocillo recibió 240 disparos de láser, los cuales permitieron elevar las proteínas y acelerarlas en sistema TOF: según el tiempo de vuelo de cada proteína se determinó su masa molecular y el espectro obtenido se comparó con la base de datos (Software flexcontrol 3.1). Se consideraron como identificaciones óptimas todas aquellas con un score mayor de 1.999.

2.2.3. Criopreservación de los microorganismos

Para la conservación a largo plazo de las bacterias aisladas, se empleó glicerol como criopreservante. Se emplearon dos concentraciones distintas, 10% y 20%, y posteriormente se evaluó la mejor de las dos para cada uno de los microorganismos. Para la congelación, se tomaron colonias de cultivo puro de 24 h de incubación, y se inocularon en 10 mL de caldo nutritivo en tubos Falcon estériles de 15 mL. Éstos se incubaron durante 24 h a 30 °C para luego ser trasladados a tubos Eppendorf de 2 mL.

Se prepararon dos diluciones de glicerol, 10% y 20%, con caldo nutritivo y se mezclaron 1800 µL de estas diluciones con 200 µL del cultivo bacteriano indicado más arriba en un Eppendorf de 2 mL. De esta manera, tuvimos dos preparaciones con la misma concentración de células, pero distinto porcentaje de glicerol, 10% y 20%. Estas preparaciones se congelaron a -20 °C hasta su reactivación.

2.2.4. Reactivación de bacterias criopreservadas y evaluación de la viabilidad Las bacterias permanecieron durante 30 días congeladas y tras este periodo se procedió a su descongelación a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, los 2000 μL se transfirieron a un Falcon estéril de 50 mL con 25 mL de caldo nutritivo fresco. A partir de este momento, se evaluó el crecimiento bacteriano espectrofotométricamente durante 5 días. Para ello, se tomó una alícuota de 1 mL en condiciones estériles y se midió la absorbancia a 600 nm, para construir curvas de crecimiento y determinar, si crecieron mejor con glicerol al 10% o al 20%.

Además de las curvas de crecimiento, se quiso estimar la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) en los criopreservados tras su reactivación. Para ello, se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , 30 μL de estas se sembraron en placas con agar nutritivo mediante extensión con asa de Digrafsky y se cultivaron durante 24 h a 30 °C. Tras la incubación se procedió a contar las colonias formadas.

3 RESULTADOS

3.1 Aislamiento de cultivos puros

De cada uno de los cultivos obtenidos a partir de los inóculos de tierra, estiércol y queso crema se escogieron 2 colonias que se repicaron en placas para la obtención de cultivos puros. De esta manera se obtuvieron 8 cultivos (**Tabla 4**) axénicos distintos: 2 a partir de tierra en agar nutritivo (empleado para el aislamiento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales), N1 y N2; 2 a partir de queso crema en agar MRS (empleado para el desarrollo adecuado de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas), M1 y M2; 2 a partir de estiércol en agar TSA (empleado para el aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y exigentes), T1 y T2; y por último otros 2 a partir de estiércol pero en agar King B (empleado para el aislamiento de *Pseudomonas*, permite la detección de la síntesis de pioverdina), K1 y K2.

Tabla 4. Las muestras obtenidas fueron clasificadas bajo la siguiente nomenclatura:

| No. | Fuente de inóculo | Medio de cultivo | Codificación |
|-----|-------------------|------------------|--------------|
| 1 | Queso Crema | MRS | M1 |
| 2 | Queso Crema | MRS | M2 |
| 1 | Estiércol | TSA | T1 |
| 2 | Estiércol | TSA | T2 |
| 1 | Estiércol | King B | K1 |
| 2 | Estiércol | King B | K2 |
| 1 | Tierra | Nutriente | N1 |
| 2 | Tierra | Nutriente | N2 |

En la **figura 7**, se muestran imágenes de los 8 cultivos axénicos obtenidos. Todas las bacterias aisladas crecieron entre 30 y 37 °C y los cultivos M1 y M2 lo hicieron en

condiciones anaerobias. Todos los microorganismos crecieron bien en los medios empleados en un tiempo de 24 – 48 h. La variabilidad en las temperaturas, que se mantuvieron siempre dentro del rango de microorganismos mesófilos, tuvo que ver con la disponibilidad de incubadoras en el laboratorio de microbiología y los usos dados a las mismas por distintos tesistas e investigadores de la UISEK.

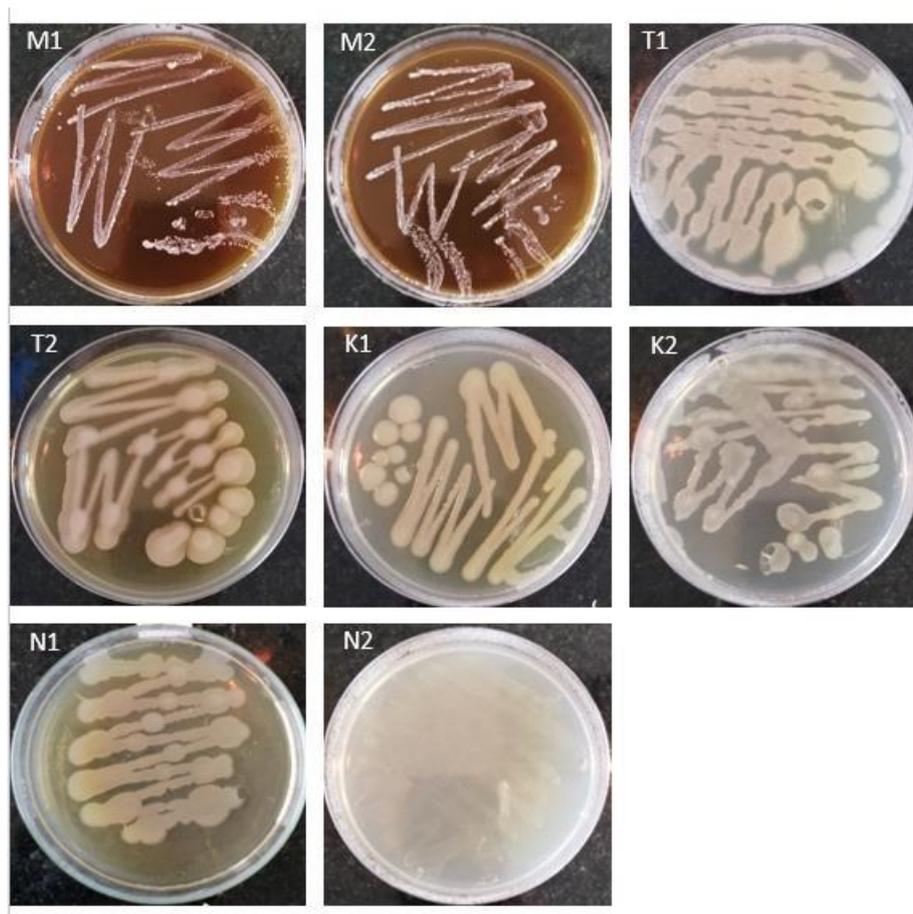


Figure 7. Cultivos axénicos, vista superior en cajas Petri. M1 y M2, cultivo a partir de queso crema en agar MRS; T1 y T2, cultivo a partir de estiércol en agar TSA; K1 y K2, cultivo a partir de estiércol en agar King B y; N1 y N2, cultivo a partir de tierra en agar Nutritivo.

3.2. Caracterización microscópica

Mediante microscopía óptica se realizó la caracterización microscópica que se describen en la **tabla 5**. Además, también se realizó la tinción Gram. Como puede observarse, la mayoría de las bacterias aisladas fueron Gram (+) y solo 2 (K1 y K2) fueron Gram (-). La forma celular predominante fueron los bacilos con forma de bastón, aunque también hubo bacilos cortos, una especie de diplococo (N2) y cocos (N2).

Tabla 5. Caracterización microscópica

| Cepa | Morfología | Tinción de Gram |
|------|-----------------------------------|-----------------|
| M1 | Bacilos cortos | + |
| M2 | Bacilos largos y delgados | + |
| T1 | Bacilos en forma de bastón | + |
| T2 | Bacilos en forma de bastón | + |
| K1 | Bacilos cortos en forma de bastón | - |
| K2 | Bacilos en forma de bastón | - |
| N1 | Diplococo | + |
| N2 | cocos | + |

3.4. Caracterización bioquímica

Tras la caracterización morfológica, se realizaron 4 pruebas bioquímicas y fenotípicas con el objetivo de contribuir a la identificación de las bacterias aisladas. La **tabla 6** nos muestra los resultados obtenidos: 4/8 bacterias fueron catalasa (+) y móviles, 1/8 tuvieron la capacidad de escindir el indol a partir de triptófano, y 1/8 tuvieron la capacidad de emplear citrato como única fuente carbono.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas de las bacterias

| Cepa | Catalasa | Motilidad | Indol | Citratos |
|------|----------|-----------|-------|----------|
| M1 | - | - | - | - |
| M2 | - | - | - | - |
| T1 | + | + | - | - |
| T2 | + | + | - | - |
| K1 | + | + | + | - |
| K2 | + | + | - | + |
| N1 | - | - | - | - |
| N2 | - | - | - | - |

3.3. Identificación por MALDI – TOF

Finalmente, se realizó una prueba fenotípica basada en la identificación proteómica de las bacterias que permite la identificación (si el score es bueno) a nivel de género y especie, incluso llegando a subespecie en algunos casos. La **tabla 7** nos muestra los resultados obtenidos para cada uno de los cultivos axénicos logrados en la UISEK.

Tabla 7. Identificación por MALDI-TOF

| Cepa | Fuente de inóculo | Identificación por MALDI-TOF | Score |
|------|-------------------|--------------------------------------|-------|
| M1 | Queso Crema | <i>Lactobacillus zeae</i> | 2.264 |
| M2 | Queso Crema | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 2.327 |
| T1 | Estiércol | <i>Bacillus cereus</i> | 2.351 |
| T2 | Estiércol | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 2.391 |
| K1 | Estiércol | <i>Escherichia coli</i> | 2.543 |
| K2 | Estiércol | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2.551 |
| N1 | Tierra | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2.181 |
| N2 | Tierra | <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> | 2.525 |

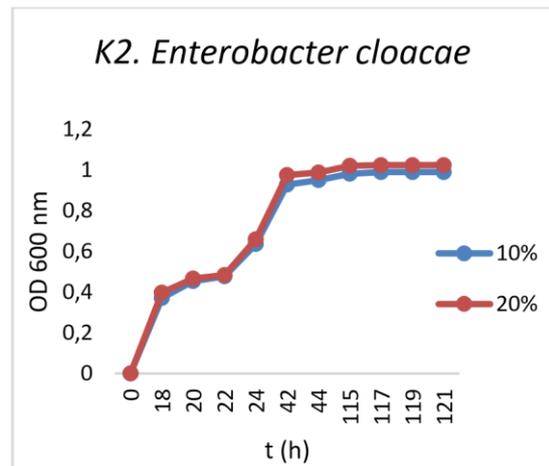
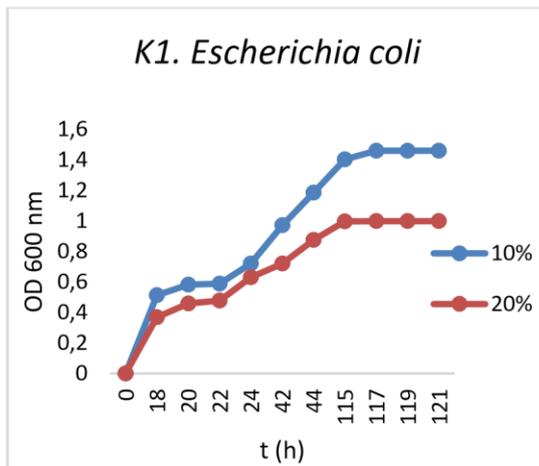
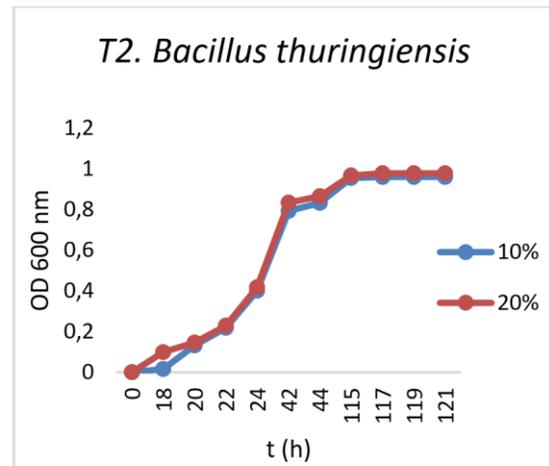
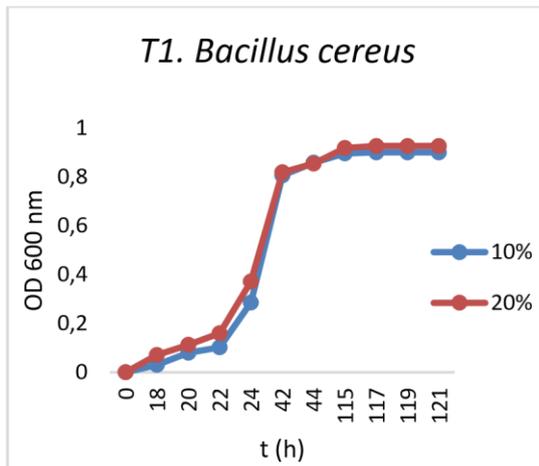
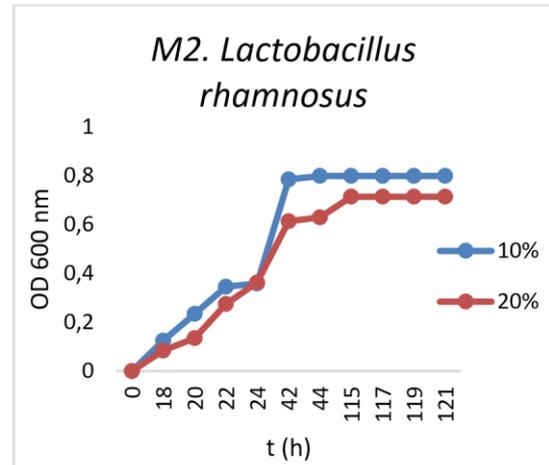
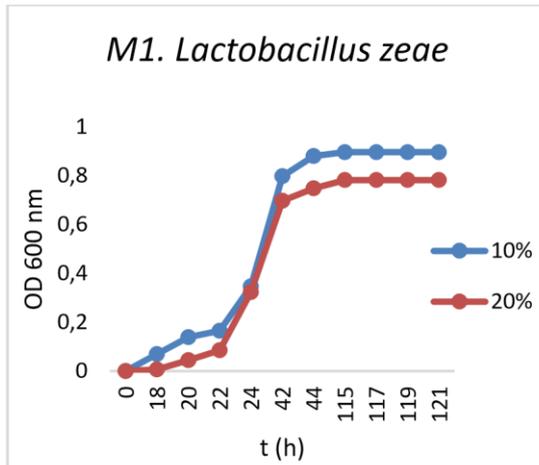
Por último, la **tabla 8** nos muestra el resumen de todos los datos relativos a la identificación de nuestros cultivos axénicos. Como se puede observar, la concordancia entre las pruebas morfológicas, bioquímicas y proteómicas es total para la mayoría de microorganismos aislados (5/8). Solo para las especies de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Lysinibacillus boronitolerans*, la concordancia fue parcial, con alguna prueba bioquímica que no coincidió con lo descrito en la literatura para esa especie.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas, morfológicas, fenotípicas y MALDI-TOF.

| Cepa | Fuente de inóculo | Morfología | Tinción de Gram | Catalasa | Motilidad | Indol | Citratos | Identificación por MALDITOF | Concordancia entre técnicas según la bibliografía |
|------|-------------------|-----------------------------------|-----------------|----------------|-----------|-------|----------------|--------------------------------------|---|
| M1 | Queso Crema | Bacilos cortos | + | - | - | - | - | <i>Lactobacillus zeae</i> | Total |
| M2 | Queso Crema | Bacilos largos y delgados | + | - | - | - | - | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Total |
| T1 | Estiércol | Bacilos en forma de bastón | + | + | + | - | - ^a | <i>Bacillus cereus</i> | Parcial |
| T2 | Estiércol | Bacilos en forma de bastón | + | + | + | - a | - a | <i>Bacillus thuringiensis</i> | Parcial |
| K1 | Estiércol | Bacilos cortos en forma de bastón | - | + | + | + | - | <i>Escherichia coli</i> | Total |
| K2 | Estiércol | Bacilos en forma de bastón | - | + | + | - | + | <i>Enterobacter cloacae</i> | Total |
| N1 | Tierra | Diplococo | + | - | - | - | - | <i>Enterococcus faecalis</i> | Total |
| N2 | Tierra | Bacilos cortos | + | - ^a | - a | - | - | <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> | Parcial |

Las inconsistencias entre las pruebas bioquímicas y la especie identificada por MALDI – TOF, se indican mediante ^a

3.5 Evaluación de la viabilidad tras reactivación de los aislados criopreservados



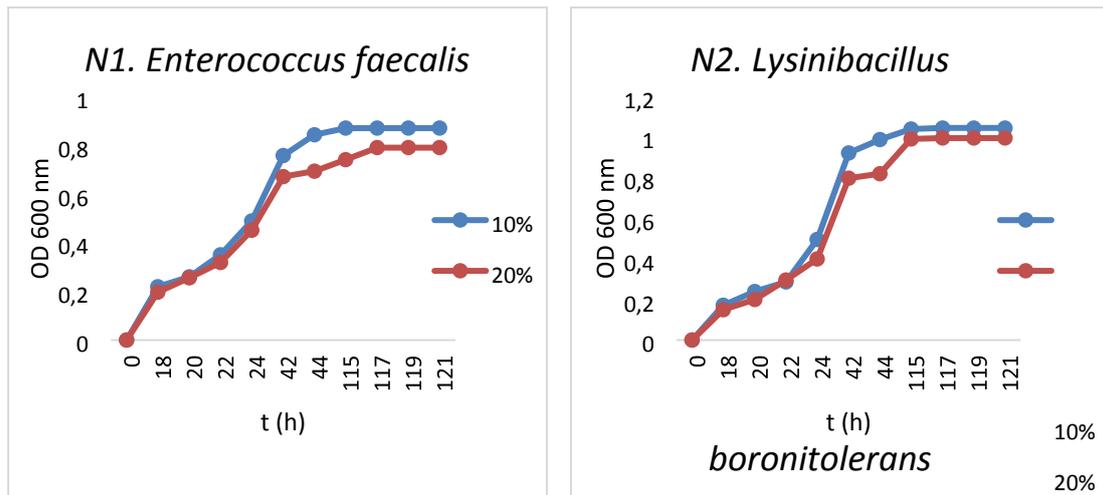


Figure 8. Curva de crecimiento de las bacterias (OD 600nm)

Dado que el objetivo del presente trabajo es proporcionar microorganismos bien caracterizados para un cepario en la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la UISEK, que se almacenará congelado hasta su utilización, quisimos comprobar la viabilidad de las células tras un mes de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en dos condiciones distintas: 10% y 20% de glicerol como criopreservante. Para ello, y tras descongelar los aislados, se realizaron curvas de crecimiento midiendo OD 600 nm durante 5 días a distintos tiempos. La **figura 8** nos muestra las curvas de crecimiento de cada uno de los microorganismos a las dos distintas concentraciones de glicerol. En general, el crecimiento fue bastante similar entre los cultivos preservados con glicerol al 10% y al 20%, aunque sí hubo una tendencia a un crecimiento ligeramente superior en los cultivos preservados al 10% para *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Escherichia coli*, especialmente para *Escherichia coli*.

Para complementar estos datos también quisimos estimar la concentración de UFC/mL de los distintos criopreservados tras la descongelación a temperatura ambiente. Para ello, y como se indica en el apartado 2.2.4 de materiales y métodos, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos y se sembraron mediante extensión con asa Digrafsky para contar el número de colonias formadas tras 24 h de cultivo. Sin embargo, las

diluciones empleadas no fueron suficientes, y las bacterias, en todos los aislados, a todas las concentraciones, crecieron como un césped que cubría por completo la placa Petri, imposibilitando contar colonias individuales (**Figura 9**) y, por tanto, calcular las UFC/mL. De todos modos, no se apreciaron diferencias entre el crecimiento de los criopreservados con 10% de glicerol y 20% de glicerol.



Figure 9. *Lactobacillus zae* en agar nutritivo, dilución al 10^{-3}

4. DISCUSIÓN

Respecto del objetivo planteado, se logró aislar e identificar 8 cepas bacterianas a partir de las tres fuentes de inóculo empleadas: tierra, queso crema y estiércol de vaca. Para ello, mediante una aproximación fenotípica, además de varias pruebas bioquímicas se empleó una técnica de identificación proteómica mediante MALDI-TOF.

Las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación bacteriana: hay que seleccionar aquellas pruebas primarias que sean rápidas y sencillas de realizar como la tinción de Gram, el crecimiento en varios tipos de medios de cultivo selectivos, la prueba de catalasa, etc.

Esta es una manera provisional de situar a las bacterias, pero se deben emplear también otros métodos con mayor poder de discriminación, dado que muchos microorganismos pueden presentar un aspecto muy similar en el examen macro y microscópico, expresar catalasa o crecer en el mismo sustrato (Bou et al., 2011a). El inconveniente de las pruebas primarias, por tanto, es que pueden conducir a una identificación equivocada, perdiendo tiempo y recursos.

Otro tipo de caracterización fenotípica, son las pruebas bioquímicas que permiten determinar las características metabólicas de los microorganismos problema. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima a partir de su actividad, y su interpretación varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Sin embargo, la mayoría de las pruebas bioquímicas requieren el crecimiento de los microorganismos con una incubación previa de 18 a 24 h (Bou et al., 2011b). Además, en el laboratorio de microbiología de la UISEK, no se disponen de todos los reactivos para una batería de pruebas suficientemente amplia. Las tarjetas Vitek^R o las tiras de identificación API, empleadas de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico y/o investigación, son muy costosas para su implementación como alternativa para tesisistas en la UISEK.

Otra opción basada en el fenotipo bacteriano es el análisis proteómico con fines diagnósticos. El desarrollo de dispositivos de MALDI – TOF cada vez más compactos y a precios más asequibles, ha provocado que esta alternativa se emplee más en los laboratorios. Esto se debe a que es un sistema fácil, rápido, de alto rendimiento, costo mínimo y eficiencia máxima en comparación con los métodos de identificación convencionales (Dingle & Butler-Wu, 2013). También presenta varias ventajas respecto de técnicas con una sensibilidad similar, como puede ser la secuenciación de genes conservados (16S ADN_r, hsp65, etc.) y su análisis filogenético: muy bajo coste,

sencillez operacional y rapidez. El MALDI – TOF Permite una fácil identificación a nivel de género y especie si las bacterias están correctamente aisladas y en algunos casos, dependiendo del microorganismo (Dingle & Butler-Wu, 2013), a nivel de subespecie. Esto dependerá de la calidad de las bases de datos proteómicas para la comparación de los espectros de masas (**Figura 10**).

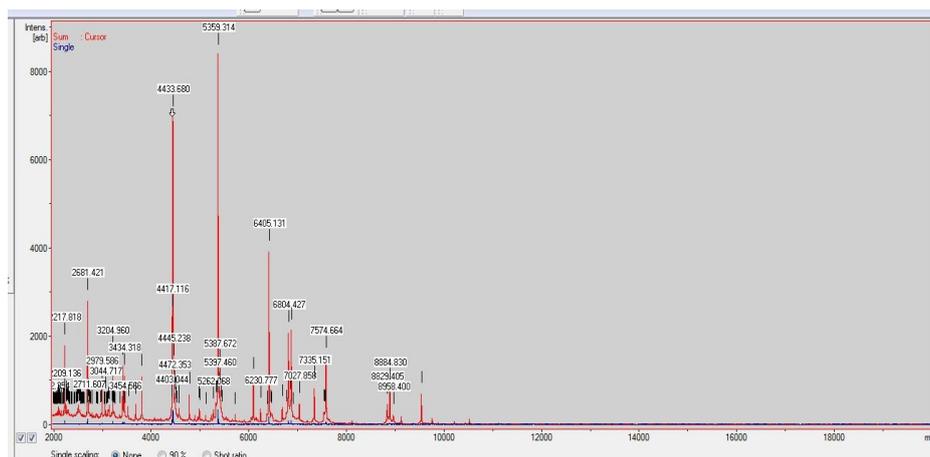


Figure 10. Espectros de masa por MALDI-TOF

En relación a las bacterias identificadas, hay que recalcar que, entre la tinción, las pruebas bioquímicas y el MALDI-TOF hubo una concordancia total para 5 de los 8 microorganismos aislados (**Tabla 8**). Sin embargo, para tres bacterias (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Lysinibacillus boronitolerans*) la concordancia fue solo parcial. Los scores obtenidos para las bacterias aisladas en el MALDI – TOF son muy buenos y, por tanto, nos fiamos del resultado obtenido. Sin embargo, si hiciera falta una identificación definitiva, se recomienda hacer una caracterización molecular mediante PCR y secuenciación de genes específicos. Además de la clásica secuenciación del gen 16S ADNr, ampliamente utilizada en la identificación genotípica de bacterias, para el caso de *Bacillus cereus* se recomienda utilizar los genes *nheA*, *nheC* y *hblA*; para *Bacillus thuringiensis* los genes *cry4* y *cry11*; para *Lysinibacillus boronitolerans* los genes *cry4A* y *cry4B* (Blanco et al., 2009).

El objetivo del presente trabajo era obtener un cepario, es decir, un conjunto de bacterias aisladas e identificadas, para aportar a las prácticas y temas de tesis de la carrera de Ing. Ambiental y especialmente de Ing. Biotecnología de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la UISEK. En ese sentido, se podría aportar a asignaturas como Microbiología General, Microbiología de Alimentos, Microbiología Ambiental, Biotecnología Industrial, Biorreactores, Genética, Biología Molecular, entre otras. Por ejemplo, en las asignaturas de Microbiología, se pueden emplear como controles positivos para la realización de pruebas bioquímicas y de tinción. Lo mismo en Biología Molecular y Genética, donde podrían emplearse como controles positivos en prácticas de identificación genotípica basadas en PCR y secuenciación. En las asignaturas más avanzadas de la carrera, en las que se simulan procesos industriales para la obtención de productos biotecnológicos (ácidos orgánicos, disolventes, enzimas, tensioactivos, etc.) los microorganismos son la herramienta principal, y en ese sentido, los que se han obtenido en el presente trabajo podrían emplearse para los fines que se describen más abajo.

Lactobacillus zae se ha descrito como uno de los participantes de un cocultivo definido para la producción de ácido propiónico con un alto potencial en el entorno industrial (Dietz et al., 2013), donde se emplea como conservante alimenticio para piensos y alimentos para consumo humano, ya que inhibe el crecimiento de mohos y algunas bacterias (He et al., 2019). También, utilizando citrato como única fuente de carbono, son capaces de producir compuestos aromáticos como acetoína y diacetilo (de Figueroa et al., 2000). Estos compuestos son importantes para determinar el buqué de bebidas alcohólicas, así como productos lácteos como la mantequilla. Por eso, el diacetilo se emplea como saborizante industrial, por ejemplo, para aromatizar margarinas vegetales (Vuyst et al., 2016).

Lactobacillus rhamnosus es capaz de producir ácido láctico fermentación de azúcares y otros intermediarios más simples. Este es un compuesto interesante en diferentes campos, como en la industria alimenticia, farmacéutica y química. El ácido láctico ha ganado recientemente más interés debido a la posibilidad de fabricar poli (ácido láctico), un polímero verde que puede reemplazar a los plásticos derivados del petróleo y ser aplicado en medicina para la regeneración de tejidos y en suturas, reparaciones e implantes (Bernardo et al., 2016).

Bacillus cereus es capaz de producir poli- β -hidroxibutirato (PHB). El PHB ha atraído una gran atención en los últimos años debido a su uso potencial para la producción de bioplásticos totalmente degradables (Sharma & Bajaj, 2015). Esta especie y otras del género *Bacillus* son productores de proteasas de alto interés biotecnológico. Las proteasas fibrinolíticas que se obtienen a partir de *Bacillus cereus* tienen importancia clínica como potencial tratamiento de la trombosis (Souza, 2020).

Bacillus thuringiensis produce proteínas cristalinas insecticidas (ICP) que son tóxicas para algunas poblaciones de invertebrados durante la esporulación. Como bacteria patógena se ha convertido en la alternativa bioinsecticida de mayor éxito para el ser humano, debido a su toxicidad para una amplia gama de plagas de insectos. Las subespecies *Bacillus thuringiensis israelensis* y *kurstaki* actualmente se utilizan como fuente para la producción de endotoxinas a nivel comercial (Nair et al., 2018). Las variedades vegetales transgénicas *Bt* de Monsanto, poseen el gen de esta bacteria para evitar plagas como los gusanos barrenadores (Fleming et al., 2018) que provocan grandes pérdidas en cultivos como el algodón.

Escherichia coli: es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o para vacunas. En la producción de estas proteínas recombinantes de muy alto valor añadido

se ha privilegiado el uso de *Escherichia coli* debido a su relativo bajo costo, alta densidad de cultivo y su fácil manipulación genética (García et al., 2013). Además, es probablemente la bacteria más caracterizada de todas las que existen.

Enterobacter cloacae: es una cepa eficiente que utiliza fuentes de carbono asequibles para la producción económica de 2,3-butanodiol (BD). BD se considera uno de los productos químicos clave utilizados en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, BD puede deshidratarse en metiletilcetona (un excelente disolvente orgánico para resinas y lacas) y en 1,3-butadieno para la fabricación de caucho sintético (Wang et al., 2012).

Enterococcus faecalis: tiene la capacidad de producir péptidos bioactivos, tales como péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina o con actividad antihipertensiva. Los péptidos bioactivos pueden ser utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria, en la elaboración de composiciones farmacéuticas o productos alimentarios funcionales (Muguerza et al., 2004).

Lysinibacillus boronitolerans: produce ácido iminodiacético (IDA) mediante la hidrólisis de iminodiacetonitrilo (IDAN), un compuesto orgánico. Los IDA son nitrilos que están ganando importancia para la generación de productos de amidas y ácidos carboxílicos de alto valor agregado a través de su hidrólisis en la industria química fina. La IDA se utiliza ampliamente para la fabricación de resinas quelantes, herbicidas de glifosato, tensioactivos, medicamentos contra el cáncer, etc. (Muluka et al., 2016).

En definitiva, en este trabajo se obtuvieron 8 microorganismos bien aislados e identificados, de gran importancia en la industria y capaces de ser utilizados para la docencia e investigación en la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas de la UISEK. La criopreservación, al menos durante 30 días a -20 °C, fue efectiva logrando

un buen crecimiento tras la reactivación, lo que permitirá emplear estas bacterias en futuros trabajos. Aunque no hubo grandes diferencias, sí hubo una tendencia a un crecimiento ligeramente superior en varios cultivos preservados al 10% de glicerol por lo que recomendamos este porcentaje de glicerol como partida para la criopreservación de bacterias en la UISEK.

5. CONCLUSIONES

1. Las instalaciones y recursos de la UISEK permiten aislar microorganismos, cultivarlos e identificarlos
2. MALDI – TOF es una buena alternativa a las otras técnicas fenotípicas y a las genotípicas
3. La criopreservación al 10% de glicerol en las instalaciones de la UISEK es viable y preferible a la criopreservación al 20%

6. RECOMENDACIONES

1. Comprar reactivos que permitan realizar más pruebas bioquímicas para asegurar una mayor fiabilidad y menor dependencia de laboratorios de diagnóstico
2. Para aquellas bacterias donde no se logre un buen score en el MALDI – TOF y existan no concordancias con otras técnicas se recomienda emplear técnicas genotípicas basadas en PCR y secuenciación (16S o genes específicos)

7. BIBLIOGRAFIA

- Akter, M., Rahman, M., & Fakhruzzaman, M. (2016). Isolation and identification of bacteria with determination of bacterial loads from different brands of butter and cheese. *Asian Australas. J. Biosci. Biotechnol.*, 1(3), 504–513.
- Alejandro, A., Castaño, F., Cesar, T., & Montaña, E. (2017). *Universidad Andina Simón Bolívar Sede Ecuador Área de Derecho Programa de Maestría en Derecho Mención Derecho del Mercado La intervención económica del Estado sobre el acceso y mercado de los recursos genéticos y biológicos.*
- Bejarano, M. A. (2015). “*La Biotecnología Y La Biodiversidad En La Legislación Ambiental Ecuatoriana.*”
- Bernardo, M. P., Coelho, L. F., Sass, D. C., & Contiero, J. (2016). L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.12.001>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011a). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011b). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Callejas, E. S., & Quezada, V. G. (2009). *Proceso de obtención de biocombustibles.*
- Cobo-Monterroza, R., Rosas-Quijano, R., Gálvez-López, D., Adriano-Anaya, L., & Vázquez-Ovando, A. (2019). Native lactic acid bacteria as a starter culture for the production of Mexican cream cheese. *Agronomy Mesoamerican*, 30(3), 855– 870. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34673>
- de Figueroa, R. M., Alvarez, F., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G., & Sesma, F. (2000). Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiological Research*, 154(4), 313–320. [https://doi.org/10.1016/S09445013\(00\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S09445013(00)80005-1)
- Dietz, D., Sabra, W., & Zeng, A. P. (2013). Co-cultivation of *Lactobacillus zeae* and *Veillonella criceti* for the production of propionic acid. *AMB Express*, 3(2004), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-29>
- Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>
- Fleming, D., Musser, F., Reisig, D., Greene, J., Taylor, S., Parajulee, M., Lorenz, G., Catchot, A., Gore, J., Kerns, D., Stewart, S., Boykin, D., Caprio, M., & Little, N. (2018). *Effects of transgenic Bacillus thuringiensis cotton on insecticide use , heliothine counts , plant damage , and cotton yield : A meta- analysis , 19962015.* 1996–2015.

- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30–39.
- Garzón, J. M., Pablo, J., Miranda, R., & Gómez, C. H. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. Introducción Materiales y métodos Resultados. *Universidad y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Gortares-Maroyoqui, P., Ulloa-Mercado, R. G., Ríos-Vázquez, N. J., Breton-Deval, L., Macarie, H., Poggi-Varaldo, H. M., & Sastre-Conde, I. (2020). Advances in environmental biotechnology and engineering 2018. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(23), 28463–28468. <https://doi.org/10.1007/s11356-02009377-w>
- He, L., Zhou, W., Xing, Y., Pian, R., Chen, X., & Zhang, Q. (2019). Improving the quality of rice straw silage with *Moringa oleifera* leaves and propionic acid: fermentation, nutrition, aerobic stability and microbial communities. *Bioresource Technology*, 122579. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122579>
- MacWilliams, M. P. (2009). Indole Test Protocol. *American Journal for Microbiology*, December 2009, 1–9.
- Mau, S., Vega, K., & Araya, M. (2011). Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Revista de Ciencias Ambientales*, 42(2), 45. <https://doi.org/10.15359/rca.42-2.4>
- Muguerza, B., Recio, I., & Ramos, M. (2004). *Bioactive peptide-producing strains of Enterococcus faecalis, bioactive peptides and applications thereof*. 2004.
- Muluka, H., Sheelu, G., & Nageshwar, Y. V.D. (2016). Bioconversion of Iminodiacetonitrile to Iminodiacetic acid with whole cells of *Lysinibacillus boronitolerans* MTCC 107614 (ICT-ak1252). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(3), 413–420. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1524-2>
- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., & Jaoua, S. (2018). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -Endotoxins and Cry gene content. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>
- Reiner, K. (2016). *Catalase Test Protocol*. November 2010, 1–9.
- RI, M. A. (2008). *CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS EN DOS TIPOS DE ESTIÉRCOL, DURANTE EL PROCESO DE COMPOSTAJE CAROLINA*. May, 2–4.
- Sharma, P., & Bajaj, B. K. (2015). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Bacillus cereus* PS 10 using biphasic-acid-pretreated rice straw. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 704–710. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.049>
- Silva-vega, M., Bañuelos-valenzuela, R., Delgadillo-ruiz, L., Gallegos-flores, P., Meza-lópez, C., Valladares-carranza, B., & Echavarría-cháirez, F. (2020). *Chemical*

characterization of alcoholic extract of guava leaf (Psidium guajava) and its effect as a mobility inhibitor for Escherichia coli O157 : H7
Caracterización química de extracto alcohólico de hoja de guayaba (Psidium guajava) y su efecto como i. December, 1–13.

Souza, D. H. D. (2020). *Fibrinolytic protease from Bacillus cereus S46 : Purification , characterization , and evaluation of its in vitro thrombolytic potential.* May, 1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000148>

V. Benvenuto. (2017). *Determinación de Escherichia coli enteropatógena (ECEP).*

Vuyst, L. De, Harth, H., Kerrebroeck, S. Van, & Leroy, F. (2016). NU SC. *International Journal of Food Microbiology.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>

Wang, A., Xu, Y., Ma, C., Gao, C., Li, L., Wang, Y., Tao, F., & Xu, P. (2012). Efficient 2,3-Butanediol production from Cassava powder by a crop-biomassutilizer, enterobacter cloacae subsp. dissolvens SDM. *PLoS ONE*, 7(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040442>