



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE” DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

**“Identificación de la actividad antimicrobina de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales”**

**Autora:** Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth

**Tutora:** Bqf. Urbina Salazar, Anabell del Rocío Ph. D.

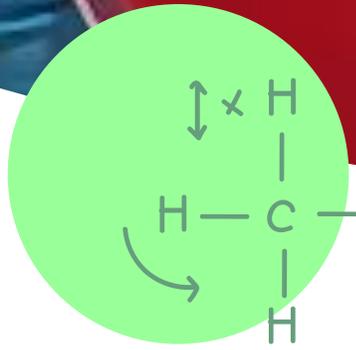
Santo Domingo, Ecuador  
2022

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN: 13/12/11

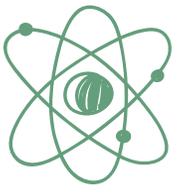
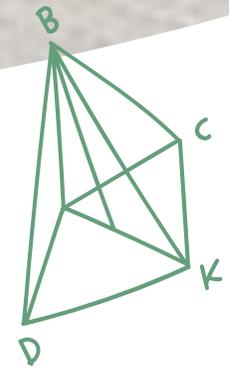
CÓDIGO: GDI.3.1.004

VERSIÓN: 1.0



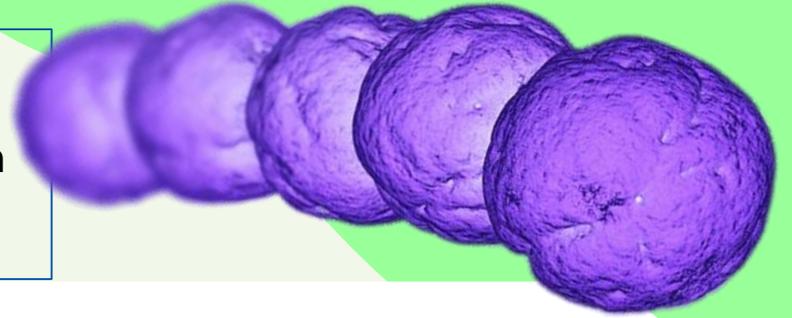


1



# INTRODUCCIÓN

Los **estreptococos** forman un diverso grupo de bacterias Gram positivas, incluyendo patógenos humanos, integran la microbiota humana, y también presentan numerosas infecciones entre ellas las respiratorias

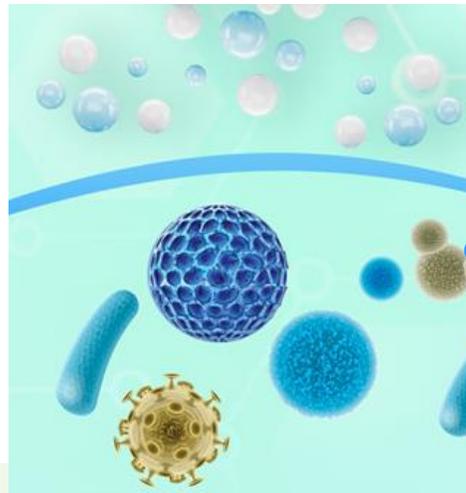


Las **pruebas de susceptibilidad antimicrobiana** *in vitro* de patógenos bacterianos relacionados deben realizarse utilizando métodos validados y muestras recolectadas adecuadamente.

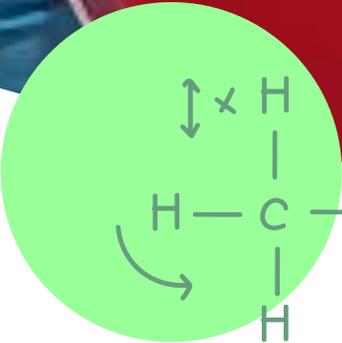


La **actividad antibacteriana** es la capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de una población bacteriana y puede expresarse cuantitativamente mediante pruebas *in vitro*.

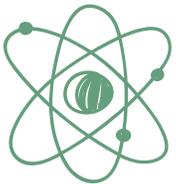
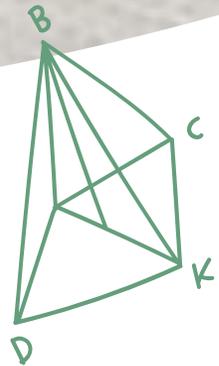
La **resistencia a los antimicrobianos** es una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo del mundo actual.



La elevada demanda de **alternativas que reemplacen los antibióticos** junto con el apareamiento de enfermedades, da paso a la investigación del potencial que tienen los extractos o fuentes naturales como agentes antimicrobianos.



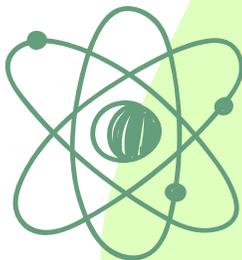
2



# OBJETIVOS HIPÓTESIS



# Objetivos



## **Objetivo general**

- Identificar la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales.



## **Objetivo específico**

- Comprobar la presencia de *Streptococcus* en las muestras de exudado faríngeo y secreción vaginal, analizadas mediante un Kit de serología para *Streptococcus*.
- Analizar las muestras mediante pruebas bioquímicas y microbiológicas.
- Realizar antibiogramas de las muestras.
- Comprobar la inhibición bacteriana de fuentes/recursos naturales.

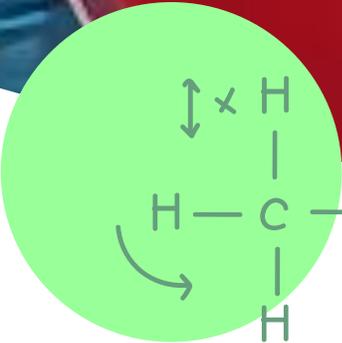




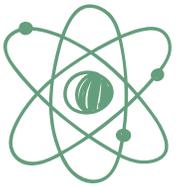
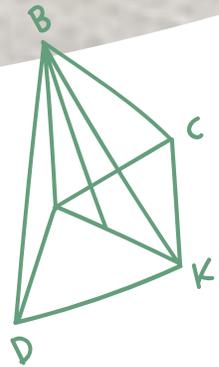
# Hipótesis

|  |   |
|--|---|
| <b>Factor A</b><br><b>(Streptococcus)</b>  | <b>Ho:</b> El estreptococo estudiado durante el análisis influye en el potencial inhibitorio.   |
|  | <b>Ha:</b> El estreptococo estudiado durante el análisis no influye en el potencial inhibitorio.  |
| <b>Factor B</b><br><b>(Antimicrobiano)</b> | <b>Ho:</b> Los tipos de antimicrobianos utilizados influyen en la inhibición bacteriana del microorganismo estudiado.                           |
|  | <b>Ha:</b> Los tipos de antimicrobianos utilizados no influyen en la inhibición bacteriana del microorganismo estudiado.                        |
| <b>Factor C</b><br><b>(Concentración)</b>  | <b>Ho:</b> Las diferentes concentraciones de los antimicrobianos utilizados influyen en la inhibición bacteriana del estreptococo estudiado.    |
|  | <b>Ha:</b> Las diferentes concentraciones de los antimicrobianos utilizados no influyen en la inhibición bacteriana del estreptococo estudiado. |





3



# METODOLOGÍA

# Ubicación del Área de investigación



País: Ecuador

Provincia: Chimborazo

Cantón: Riobamba

Parroquia: Veloz

Dirección: Morona 21-42 y 10 de Agosto



Centro de Investigación Microbiológica

CIMIC

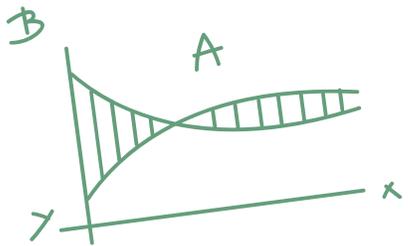
Laboratorio de microbiología

Latitud: 1°40'38"

Longitud: 78°38'44"

Altitud: 2754 msnm





## Métodos

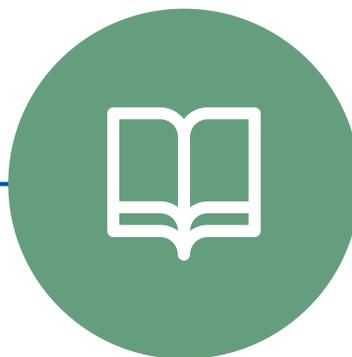


### Difusión en agar por discos (Kirby-Bauer)

Método de sensibilidad

### Difusión en agar por pozos modificados

Método de sensibilidad



### CMI

Concentración Mínima Inhibitoria

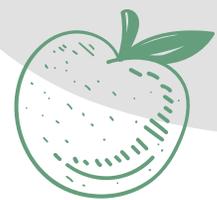
### CMB

Concentración Mínima Bactericida

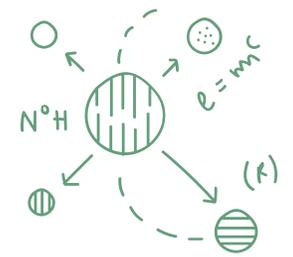


$$A+B=C$$





# Proceso de evaluación de muestras



Elección del kit de serología para *Streptococcus*

01



02

Ensayos de prueba de calidad del kit de serología para *Streptococcus*

Obtención de muestras biológicas

03



04

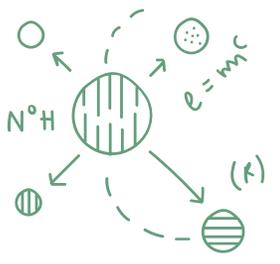
Cultivo de muestras

Evaluación de la presencia de *Streptococcus* en las muestras clínicas

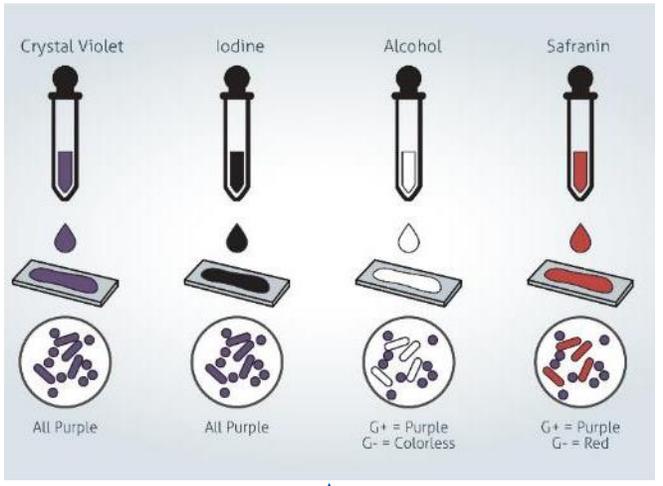
05



# Proceso de análisis



Prueba de Camp



Antibiogramas



01

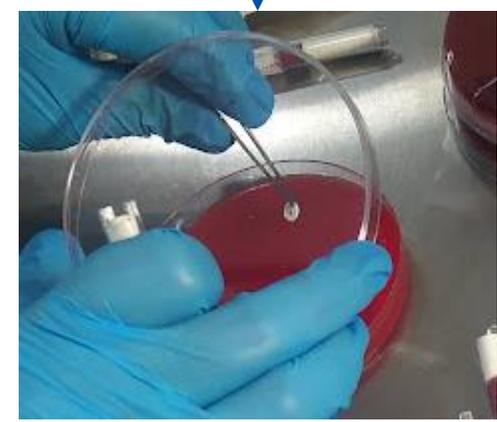
02

03

04



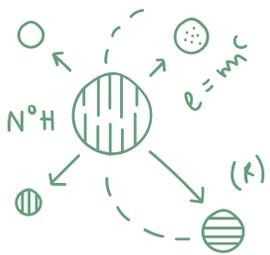
Tinción Gram



Extracción del aceite esencial de eucalipto y limón



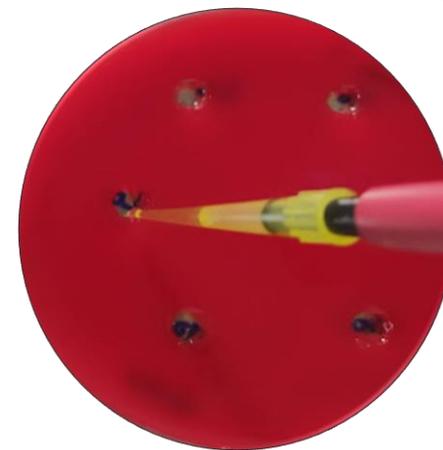
# Pruebas de sensibilidad



Difusión en agar por discos (Kirby-Bauer)



Difusión en agar por pozos modificados



01

02

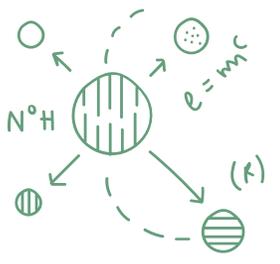
03

04

Antibiogramas

Antibiogramas





# CMI-CMB

CMI



CMB

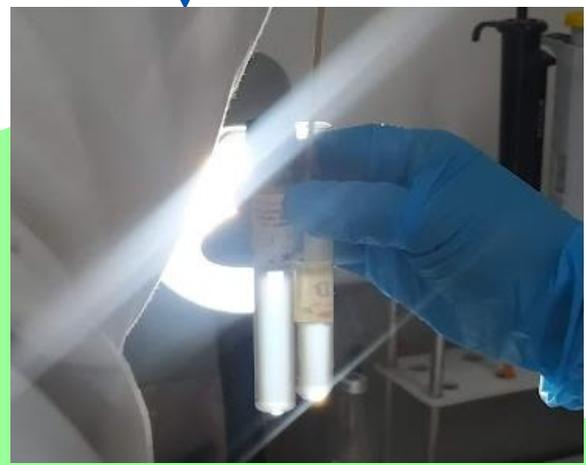


01

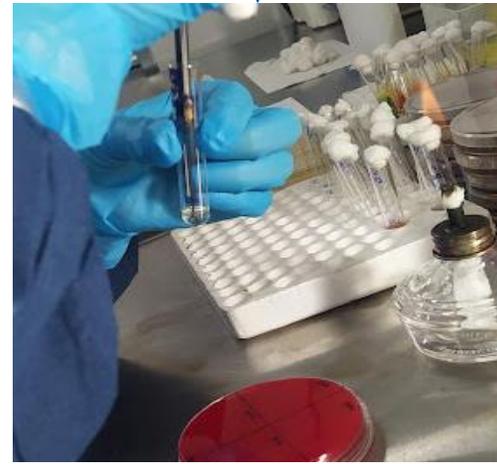
02

03

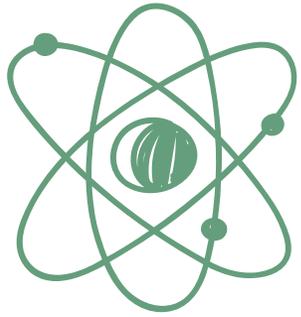
04



Lectura



Siembra y lectura

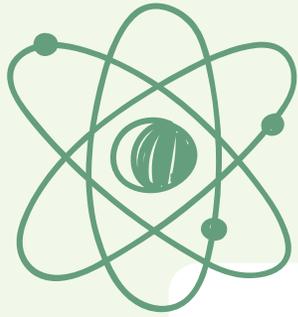


# Diseño experimental

Factores y niveles del experimento

| Factores                 | Simbología | Niveles                      |
|--------------------------|------------|------------------------------|
| <i>Streptococcus</i> (A) | a1         | Microorganismo 1             |
|                          | a2         | Microorganismo 2             |
|                          | a3         | Microorganismo 3             |
|                          | a4         | Microorganismo 4             |
| Antimicrobiano (B)       | b1         | Aceite esencial de eucalipto |
|                          | b2         | Aceite esencial de limón     |
|                          | b3         | Miel                         |
| Concentración (C)        | c1         | 60%                          |
|                          | c2         | 80%                          |
|                          | c3         | 100%                         |

$$A+B=C$$



# Diseño experimental



## Tratamientos para comparar

Factor A: 4  
Factor B: 3  
Factor C: 3

→ 4 x 3 x 3: 36T

## Repeticiones

El diseño experimental contó con la ejecución de 3 repeticiones por tratamiento, teniendo un total de 108 unidades experimentales por método de sensibilidad.

## Tipo de diseño

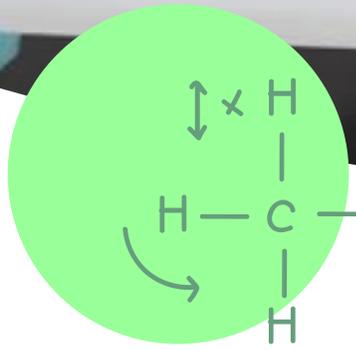
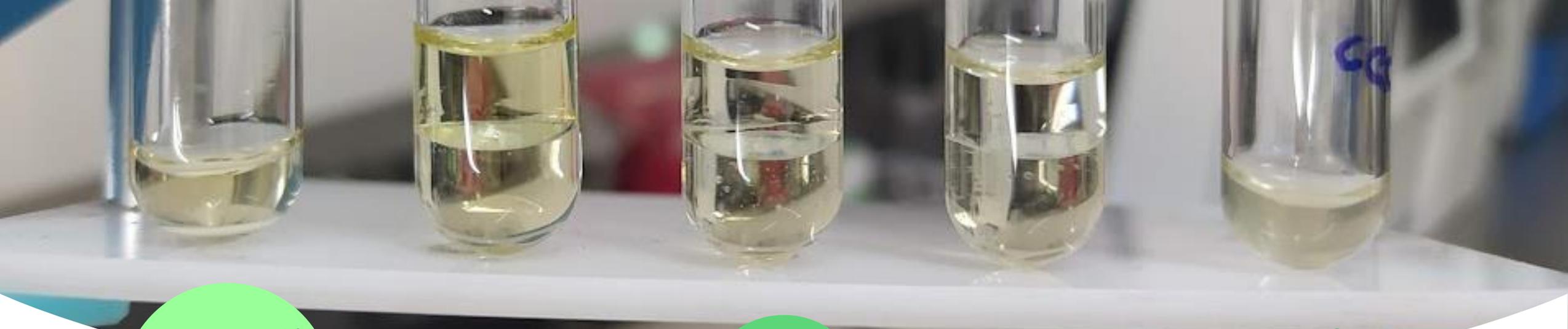
Se aplicó ANOVA con arreglo factorial AxBxC (4x3x3), conducido en un D. B. C. A., con un total de 36 tratamientos. Tablas cruzadas con gráficos de Pareto.

## Variables

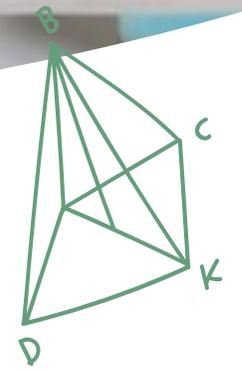
|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Halos de inhibición método 1 | CMI |
| Halos de inhibición método 2 | CMB |

## Análisis funcional

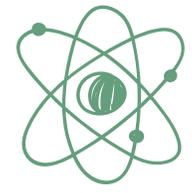
Tukey ( $p < 0.05$ )



4

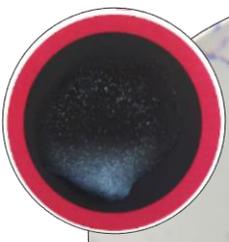
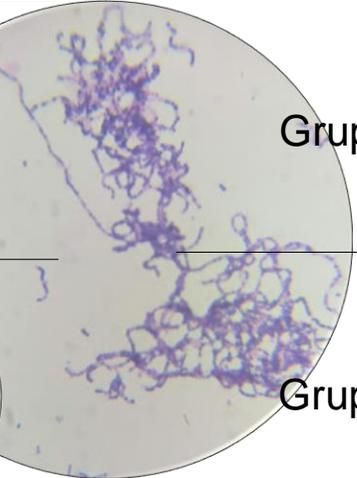
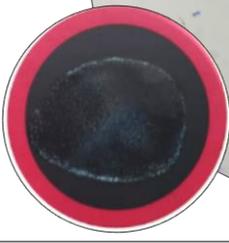


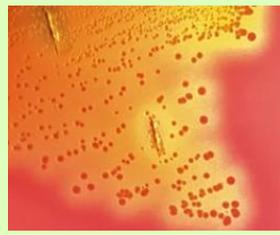
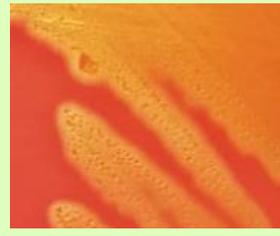
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

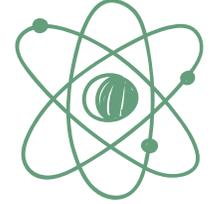


# Identificación serológica de las muestras clínicas

# Identificación microbiológica de las muestras clínicas

| Grupo           | Características                    | Identificación  |
|-----------------|------------------------------------|---|
| Alfa Hemolítico |                                    | -   |
| Grupo B         | Gram positivo<br>Catalasa negativa |   |
| Grupo C         |                                    |    |
| Grupo G         |                                    |   |

| Microorganismo     | Hemolisis | Morfología  |
|--------------------|-----------|---|
| <i>S. viridans</i> | Alfa      |    |
| Grupo B            | Beta      |    |
| Grupo C            | Beta      |   |
| Grupo G            | Beta      |  |

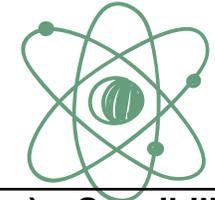


# Identificación bioquímica de los *Streptococcus* encontrados

| Grupo | Hemolisis | Bacitracina | SXT  | Prueba de | Optoquina | Penicilina | Bilis |
|-------|-----------|-------------|------|-----------|-----------|------------|-------|
|       |           | 0.04U       | 25µg | CAMP      | 5µg       | 10U        |       |
| Alfa  | A         | R (V)       | S    | -         | R         | S          | -     |
| B     | B         | R           | R    | +         | R         | S          | -     |
| C     | B         | R (V)       | S    | -         | R         | S          | -     |
| G     | B         | R (V)       | S    | -         | R         | S          | -     |



| Microorganismo       | Agar             | Identificación  |
|----------------------|------------------|---|
| <i>S. agalactiae</i> | CHROMagar StrepB |  |



# Antibiogramas

| Microorganismo     | Antibiótico       | Halo (mm) | Sensibilidad |
|--------------------|-------------------|-----------|--------------|
| <i>S. viridans</i> | Penicilina 10u    | 25        | S            |
|                    | Vancomicina 30ug  | 22        | S            |
|                    | Cefotaxima 30ug   | 30        | S            |
|                    | Clindamicina 2ug  | 26        | S            |
|                    | Eritromicina 15ug | 13        | R            |
|                    | Levofloxacin 5ug  | 24        | S            |



| Microorganismo       | Antibiótico       | Halo (mm) | Sensibilidad |
|----------------------|-------------------|-----------|--------------|
| <i>S. agalactiae</i> | Penicilina 10u    | 35        | S            |
|                      | Vancomicina 30ug  | 19        | S            |
|                      | Cefotaxima 30ug   | 34        | S            |
|                      | Clindamicina 2ug  | 6         | R            |
|                      | Eritromicina 15ug | 21        | S            |
|                      | Levofloxacin 5ug  | 24        | S            |

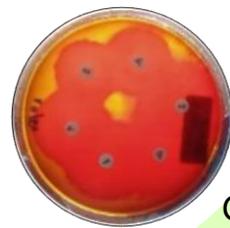
*S. agalactiae*

| Microorganismo | Antibiótico       | Halo (mm) | Sensibilidad | Observación |
|----------------|-------------------|-----------|--------------|-------------|
| Grupo C        | Penicilina 10u    | 33        | S            |             |
|                | Vancomicina 30ug  | 21        | S            |             |
|                | Cefotaxima 30ug   | 34        | S            |             |
|                | Clindamicina 2ug  | 20        | R            |             |
|                | Eritromicina 15ug | 6         | R            |             |
|                | Levofloxacin 5ug  | 22        | S            |             |

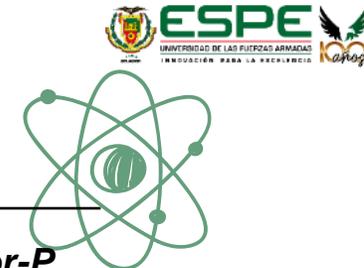


| Microorganismo | Antibiótico       | Halo (mm) | Sensibilidad |
|----------------|-------------------|-----------|--------------|
| Grupo G        | Penicilina 10u    | 33        | S            |
|                | Vancomicina 30ug  | 21        | S            |
|                | Cefotaxima 30ug   | 30        | S            |
|                | Clindamicina 2ug  | 32        | S            |
|                | Eritromicina 15ug | 21        | S            |
|                | Levofloxacin 5ug  | 24        | S            |

Grupo G

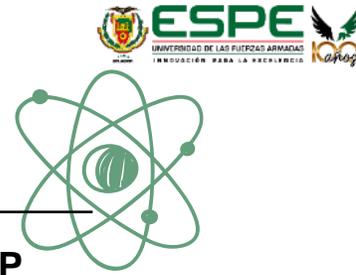


# Análisis de varianza para la inhibición por el método Kirby-Bauer (método 1)



| <i>Fuente</i>               | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| <b>EFFECTOS PRINCIPALES</b> |                          |           |                       |                |                |
| A: <i>Streptococcus</i>     | 1416,33                  | 3         | 472,111               | 2974,30        | 0,0000         |
| B: Antimicrobiano           | 943,722                  | 2         | 471,861               | 2972,73        | 0,0000         |
| C: Concetración             | 1064,22                  | 2         | 532,111               | 3352,30        | 0,0000         |
| D: Replica                  | 0,888889                 | 2         | 0,444444              | 2,80           | 0,0676         |
| <b>INTERACCIONES</b>        |                          |           |                       |                |                |
| AB                          | 942,056                  | 6         | 157,009               | 989,16         | 0,0000         |
| AC                          | 429,778                  | 6         | 71,6296               | 451,27         | 0,0000         |
| BC                          | 377,722                  | 4         | 94,4306               | 594,91         | 0,0000         |
| ABC                         | 433,833                  | 12        | 36,1528               | 227,76         | 0,0000         |
| RESIDUOS                    | 11,1111                  | 70        | 0,15873               |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)           | 5619,67                  | 107       |                       |                |                |

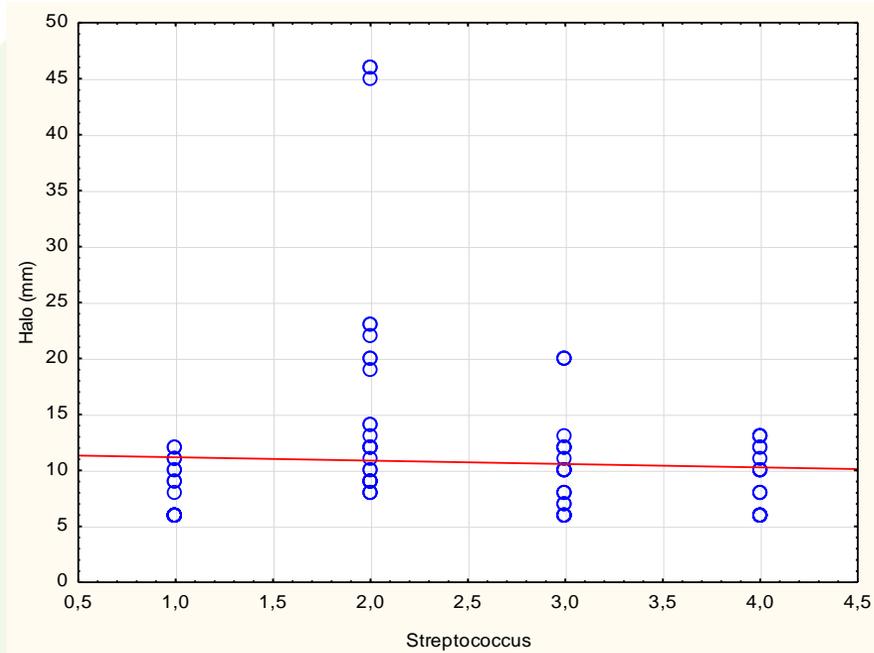
# Análisis de varianza para la inhibición por el método de pozos (método 2)



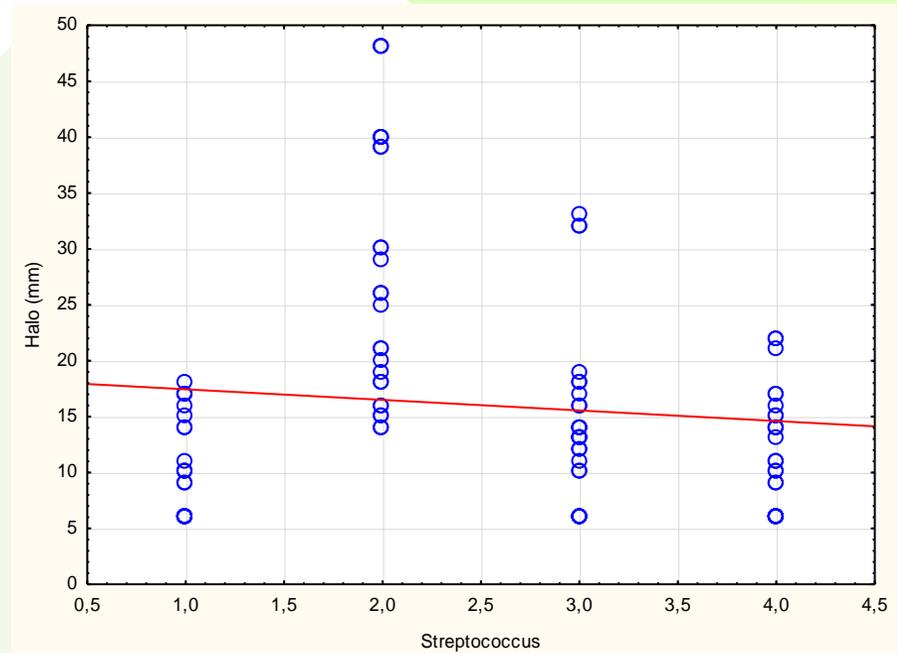
| Fuente              | Suma de Cuadrados | GI  | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                   |     |                |         |         |
| A:Streptococcus     | 5359,36           | 3   | 1786,45        | 7237,72 | 0,0000  |
| B:Antimicrobiano    | 1881,06           | 2   | 940,528        | 3810,50 | 0,0000  |
| C:Concetración      | 2468,72           | 2   | 1234,36        | 5000,95 | 0,0000  |
| D:Replica           | 0,0555556         | 2   | 0,0277778      | 0,11    | 0,8937  |
| INTERACCIONES       |                   |     |                |         |         |
| AB                  | 1018,5            | 6   | 169,75         | 687,73  | 0,0000  |
| AC                  | 319,056           | 6   | 53,1759        | 215,44  | 0,0000  |
| BC                  | 290,389           | 4   | 72,5972        | 294,12  | 0,0000  |
| ABC                 | 300,5             | 12  | 25,0417        | 101,45  | 0,0000  |
| RESIDUOS            | 17,2778           | 70  | 0,246825       |         |         |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 11654,9           | 107 |                |         |         |

## FACTOR A (*Streptococcus*)

## Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2

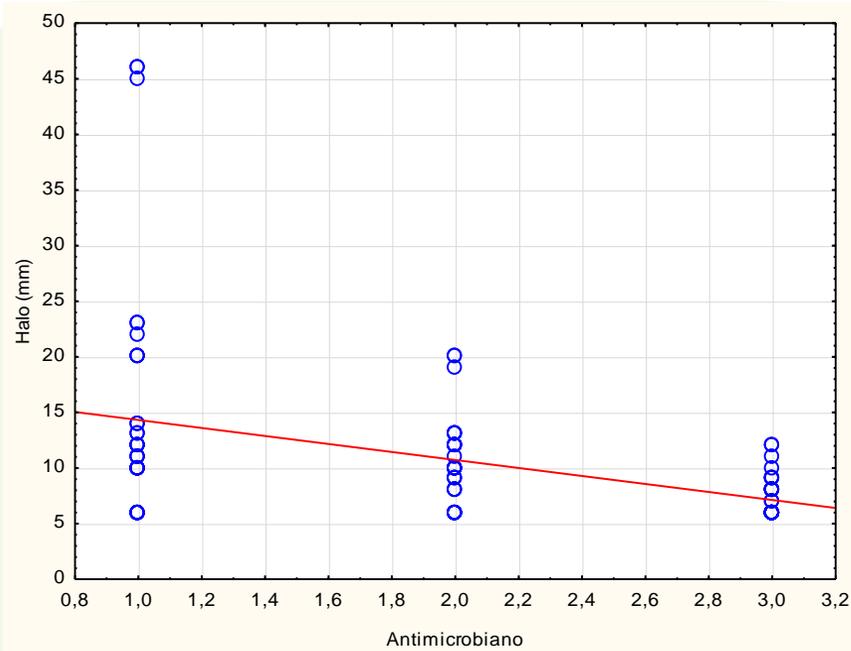


Hayes y colaboradores (2020) detallan que este grupo de microorganismos (**SAG**) es reconocido de manera universal por su susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos y sensibilidad a antimicrobianos que formen halos similares.

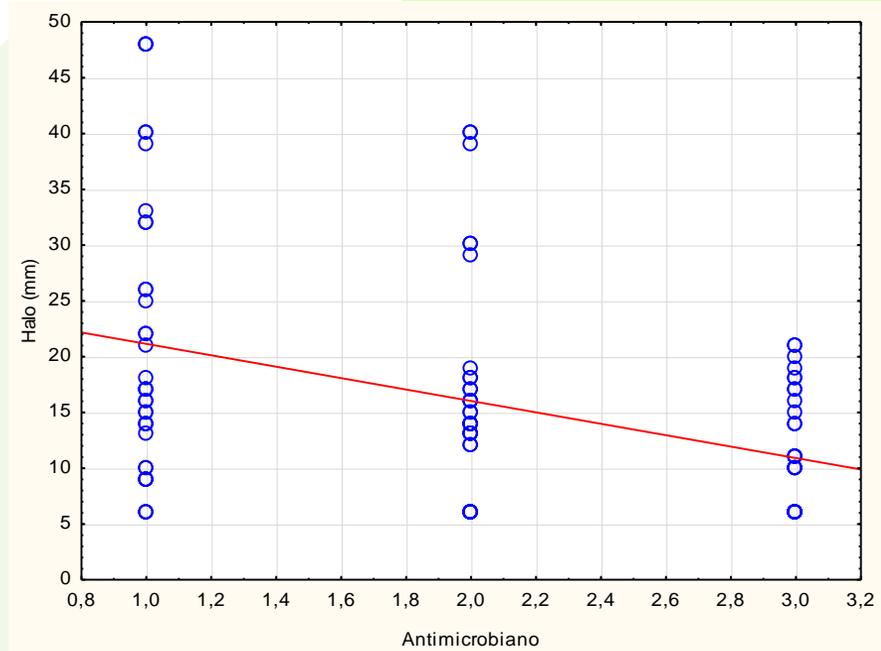


## FACTOR B (Antimicrobiano)

## Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2



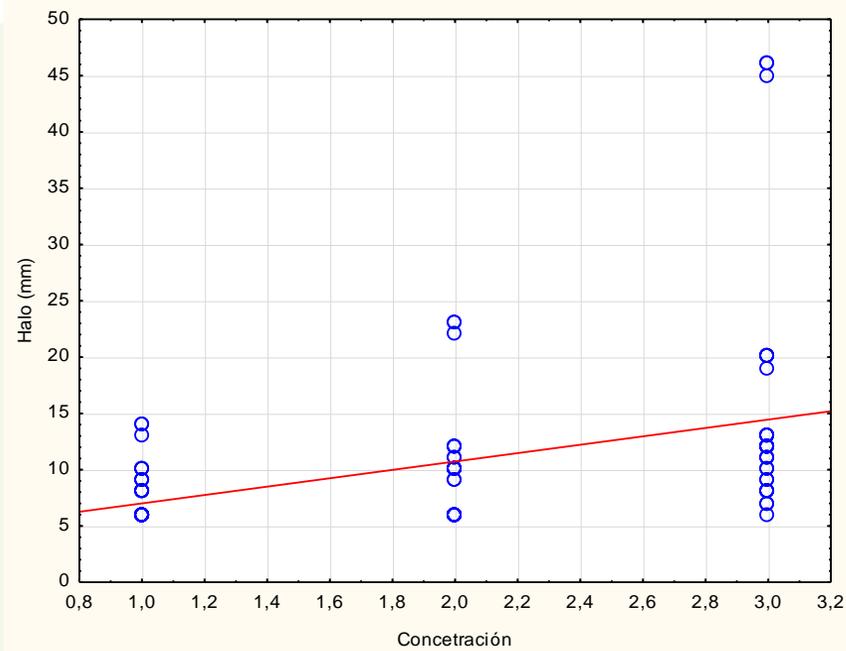
Luis y colaboradores (2014): el [aceite esencial de eucalipto](#) tiene Fitoalexinas fenólicas.

Lui y colaboradores (2020): la cascara es una mezcla de hesperidina, limoneno, delta gluconolactona y otros compuestos como el limoneno. La miel de abeja ha demostrado en estudios (Combarros Fuertes et al., 2018) ser eficiente frente a distintos patógenos.

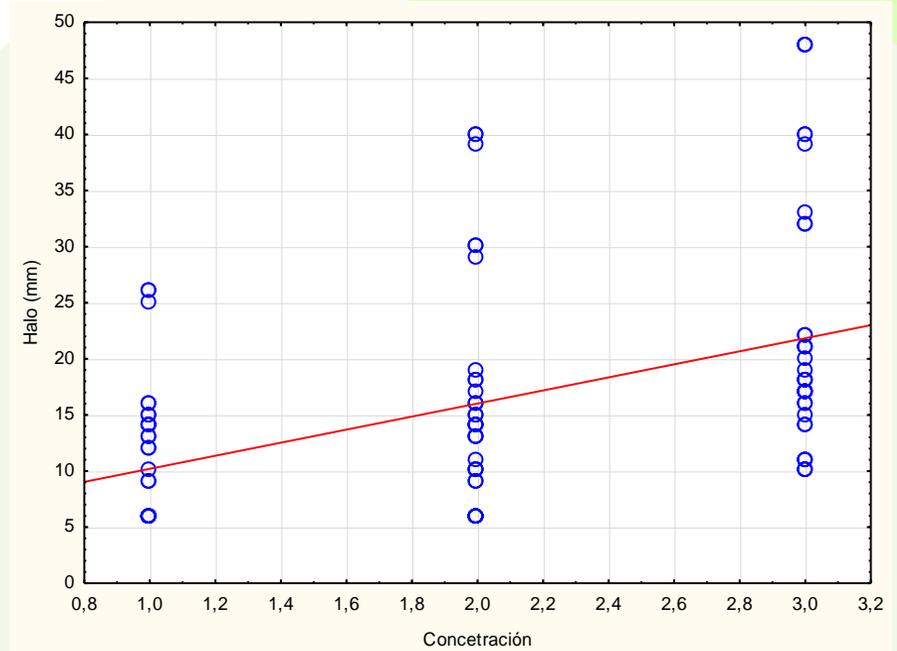


## FACTOR C (Concentración)

## Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2

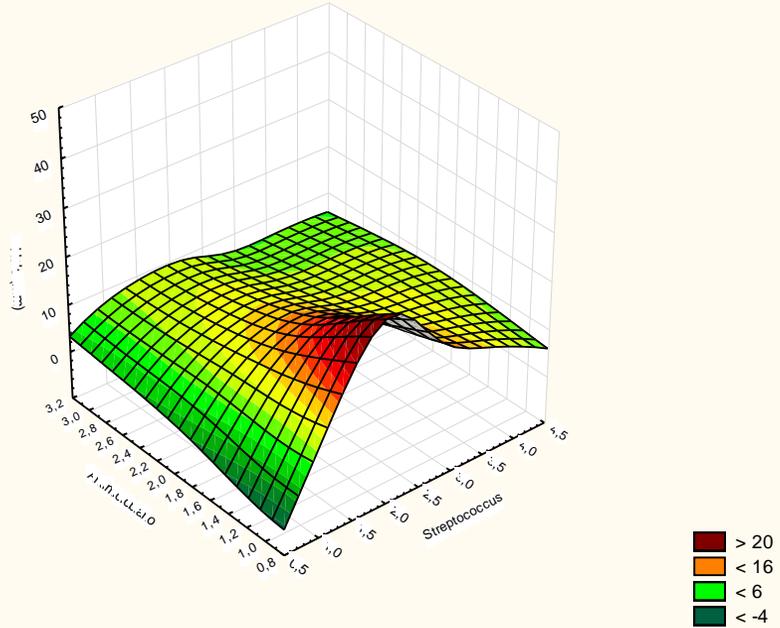


Al aumentar la concentración del antimicrobiano se produce una mayor eliminación del microorganismo (Canut Blasco et al., 2015).

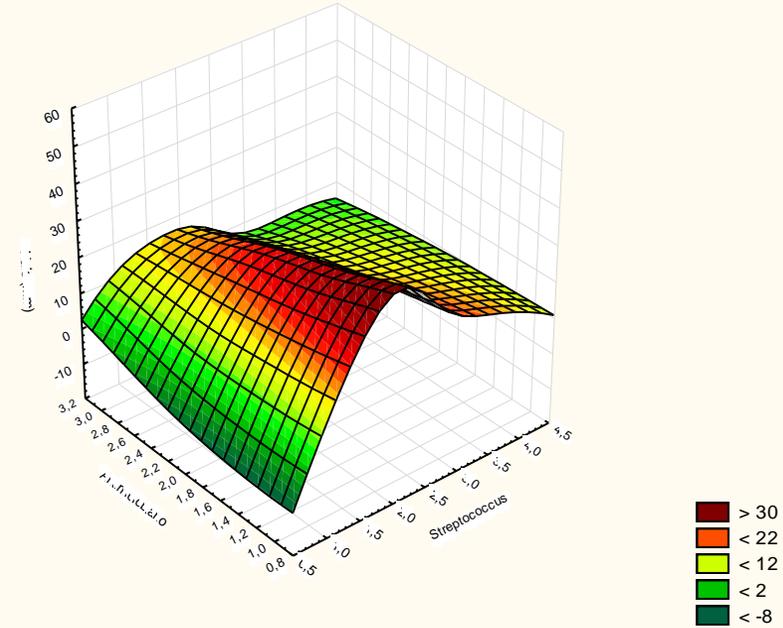


## INTERACCIÓN A\*B

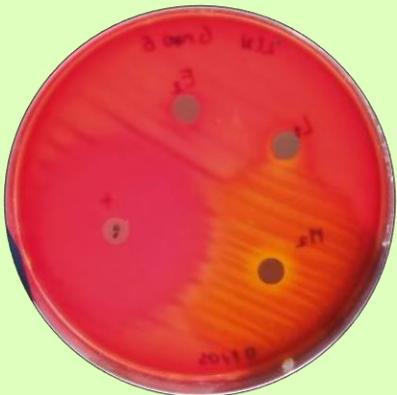
# Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2

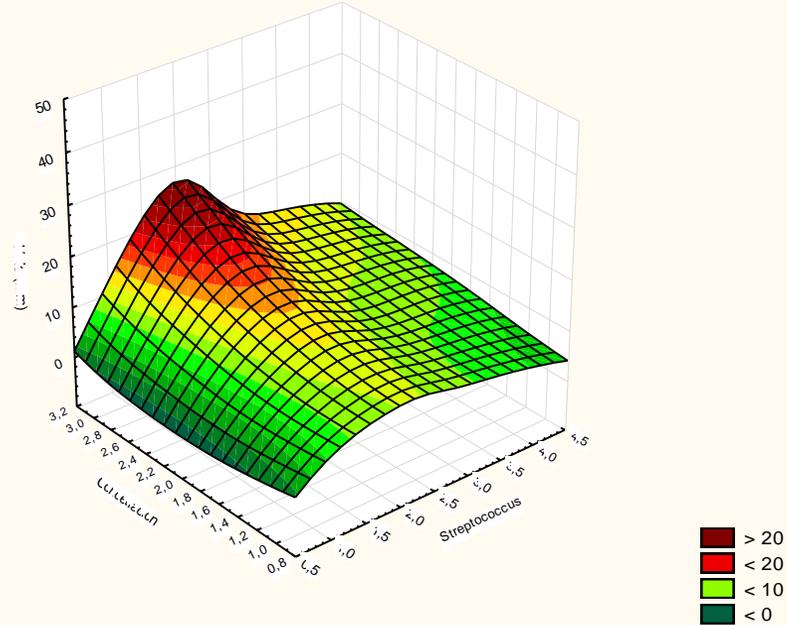


Jaramillo y colaboradores (2018) mencionan que los [SAG](#) han mostrado cambios en su comportamiento y respuesta, estas bacterias son más susceptibles ante el accionar del extracto de manera que presentan grandes halos de inhibición (Luis et al., 2014).

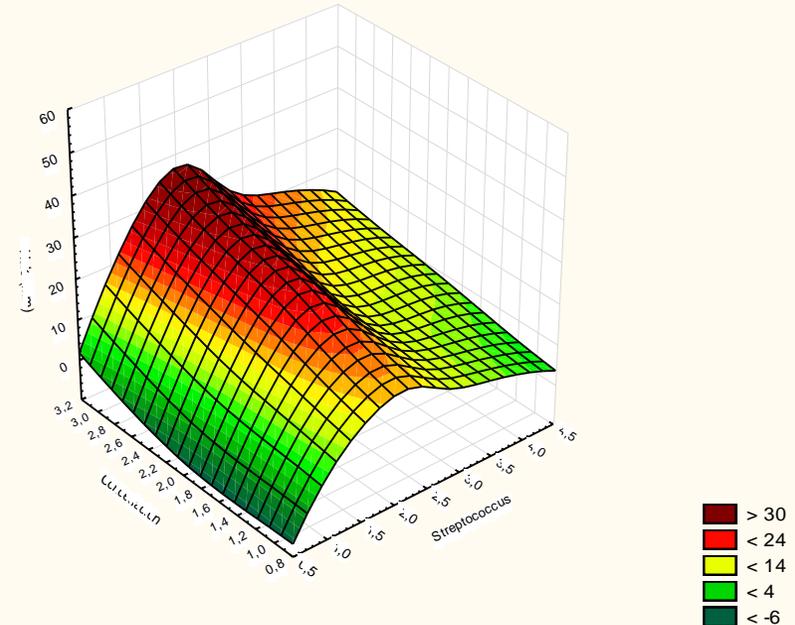


# INTERACCIÓN A\*C

## Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2

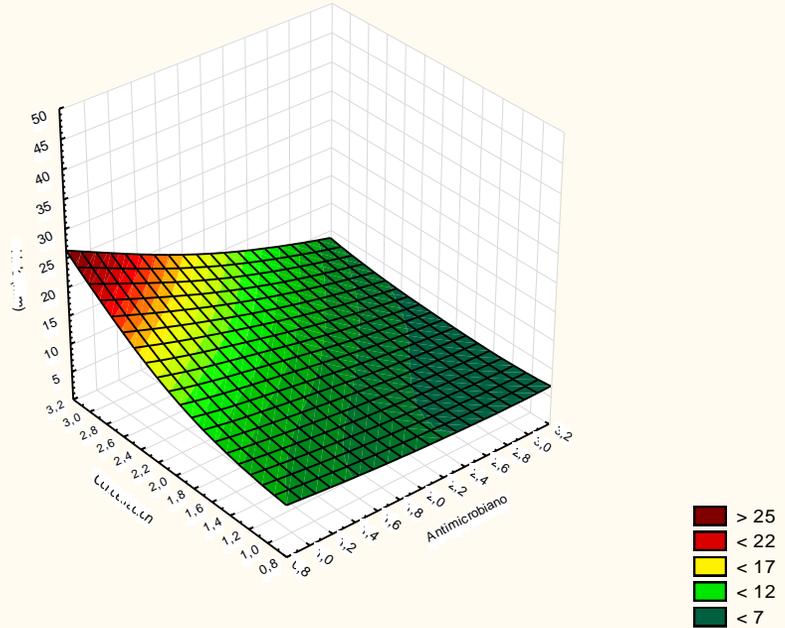


Jaramillo y colaboradores (2018) mencionan que los [SAG](#) han mostrado cambios en su comportamiento y respuesta, estas bacterias son más susceptibles ante el accionar del extracto de manera que presentan grandes halos de inhibición (Luis et al., 2014). Al aumentar la concentración del antimicrobiano se produce una mayor eliminación del microorganismo (Canut Blasco et al., 2015).

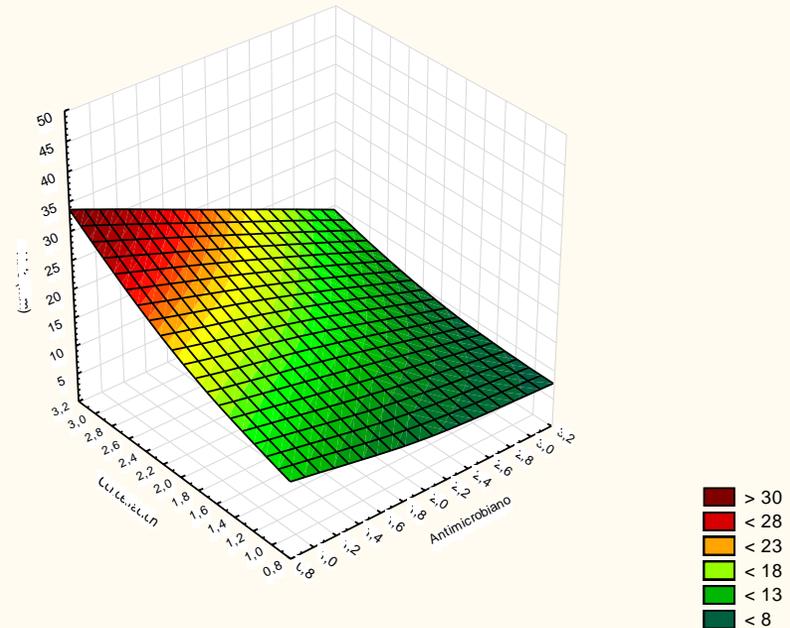


## INTERACCIÓN B\*C

# Prueba de Tukey para la evaluación de los factores



Método 1



Método 2



Luis y colaboradores (2014): AE de eucalipto tiene fitoalexinas que se dirigen hacia patógenos específicos. Al aumentar la concentración del antimicrobiano se produce una mayor eliminación del microorganismo (Canut Blasco et al., 2015).



# INTERACCIÓN A\*B\*C

## Prueba de Tukey para la evaluación de los factores

| A | B | C | Halo (mm) Media | Grupos Homogéneos |
|---|---|---|-----------------|-------------------|
| 1 | 1 | 1 | 6,000           | X                 |
| 2 | 1 | 3 | 45,667          | X                 |

Método 1  
12 Grupos

| A | B | C | Halo (mm) Media | Grupos Homogéneos |
|---|---|---|-----------------|-------------------|
| 1 | 1 | 1 | 6,000           | X                 |
| 2 | 1 | 3 | 48,000          | X                 |

Método 2  
14 Grupos

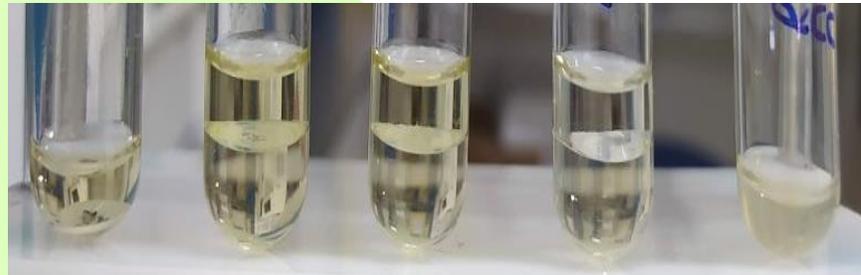
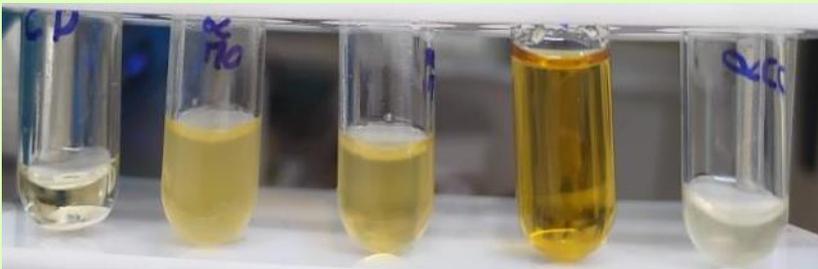
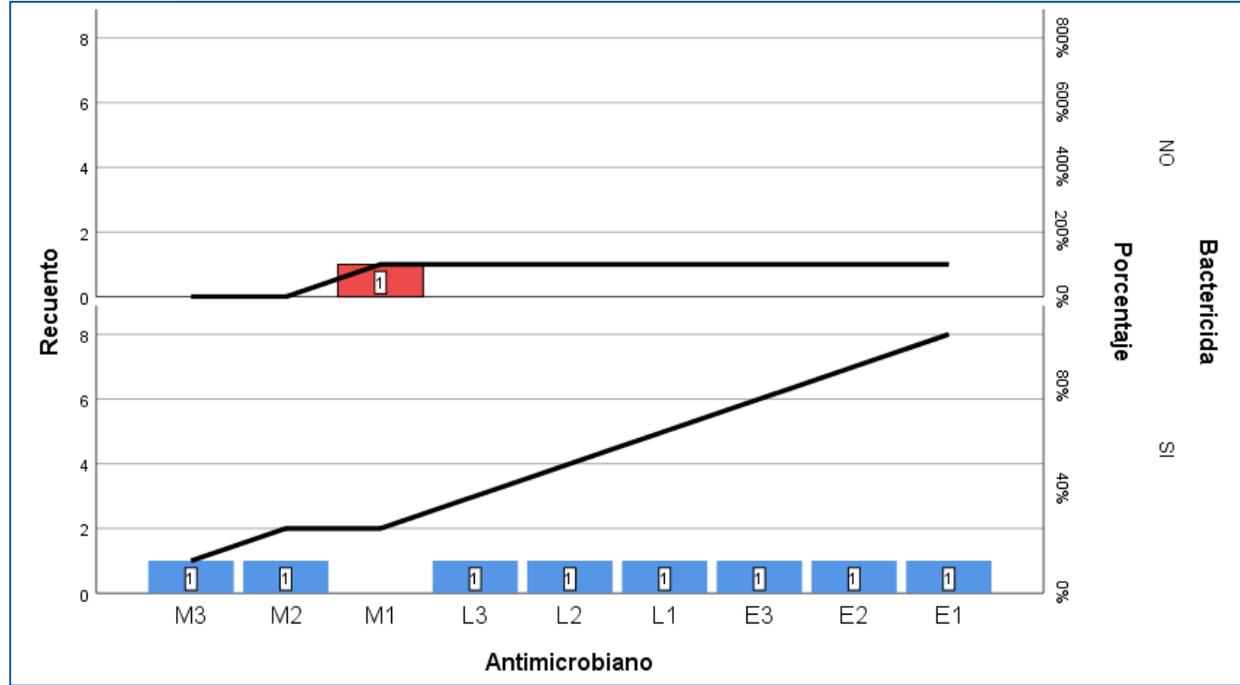
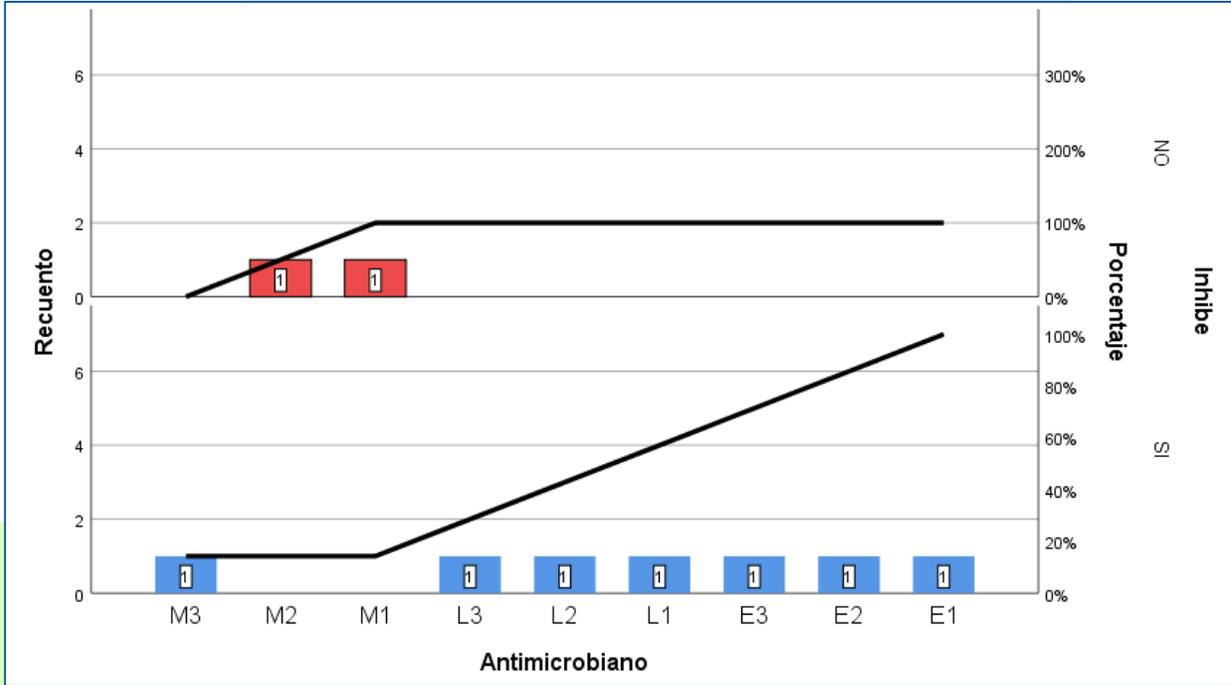


Luis y colaboradores (2014): la acumulación de metabolitos (fitoalexinas) secundarios del eucalipto es inducido por medio de un ataque de patógenos, tienen actividades de amplio espectro.



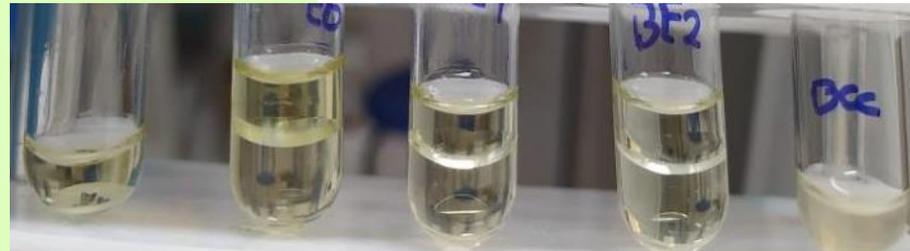
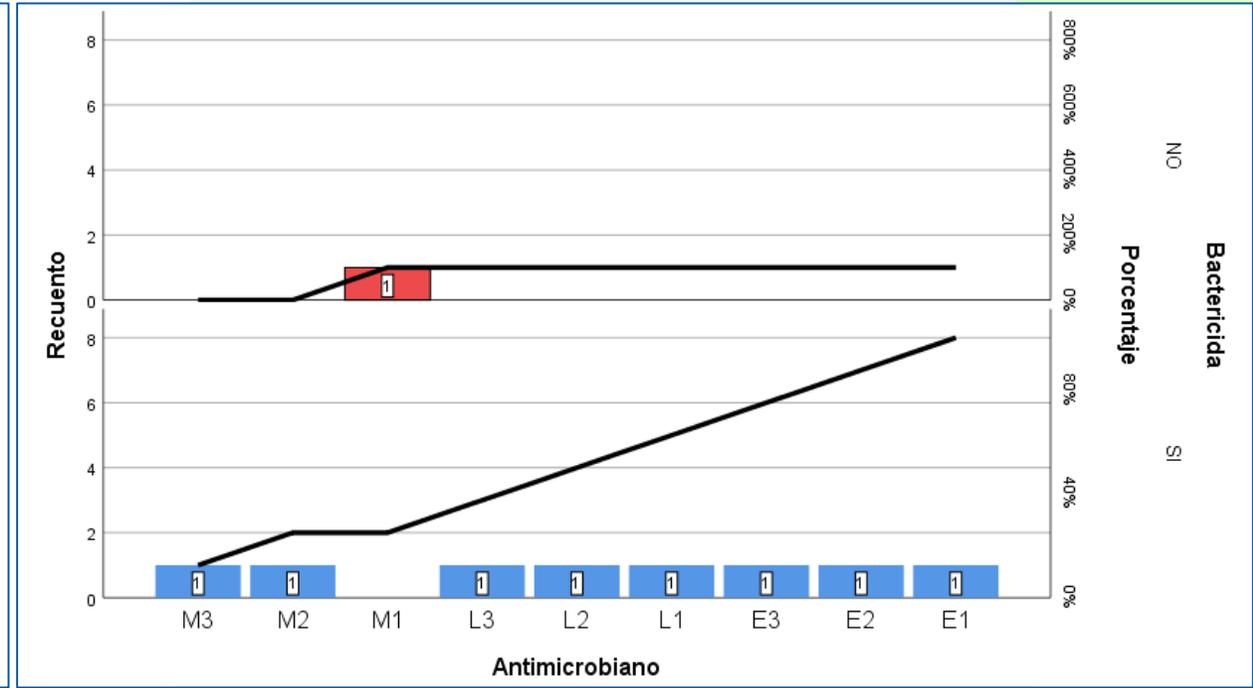
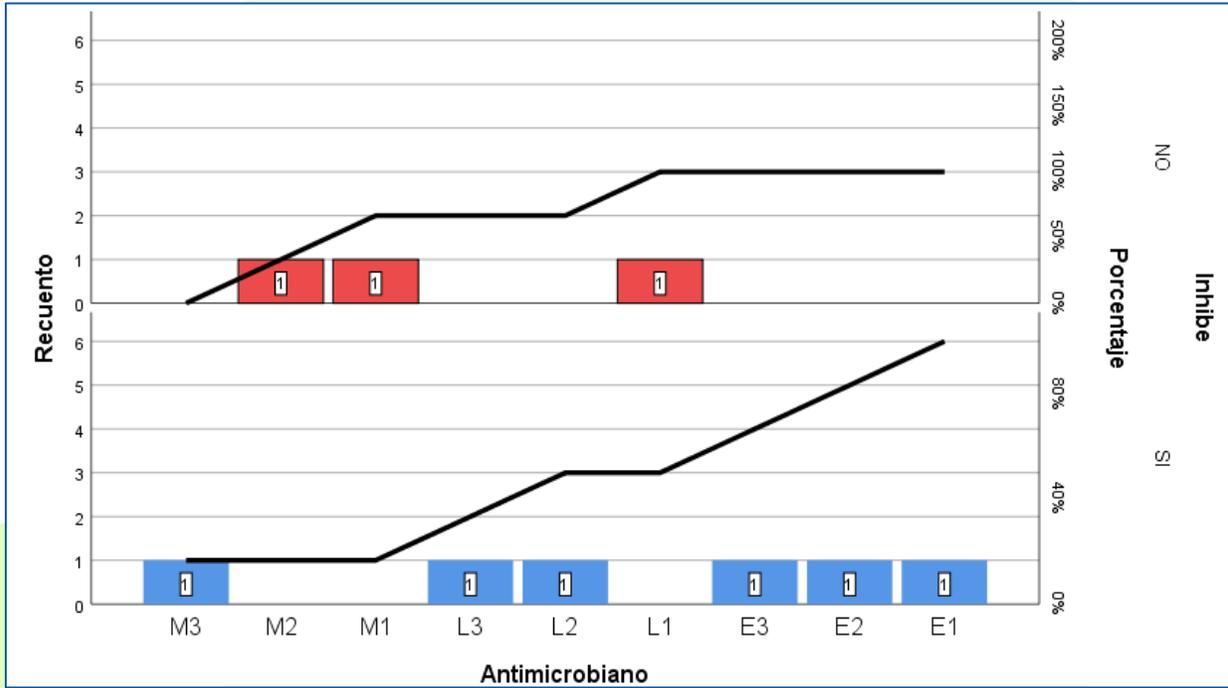
# Microorganismo 1 (*S. viridans*.)

## CMI - CMB



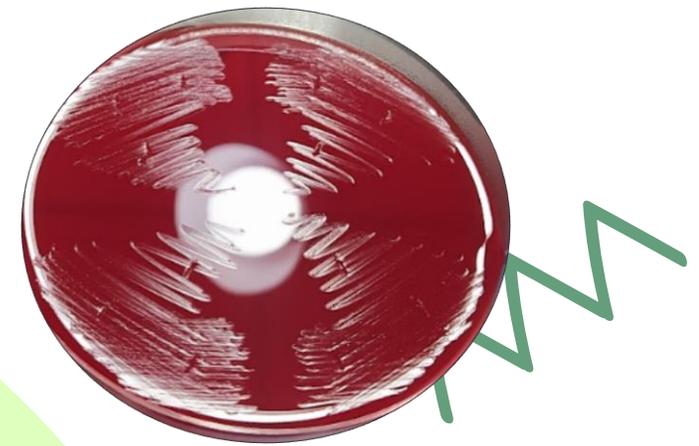
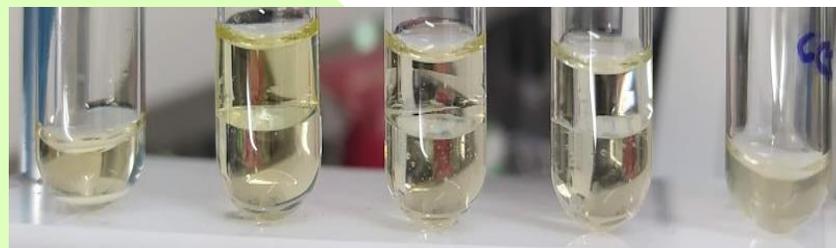
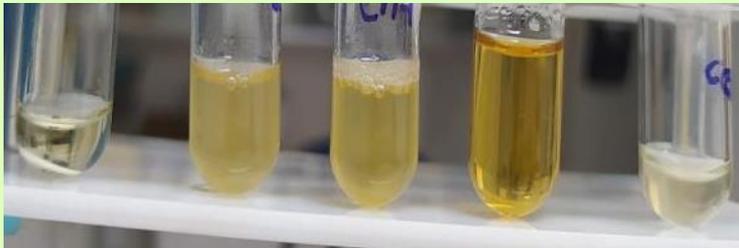
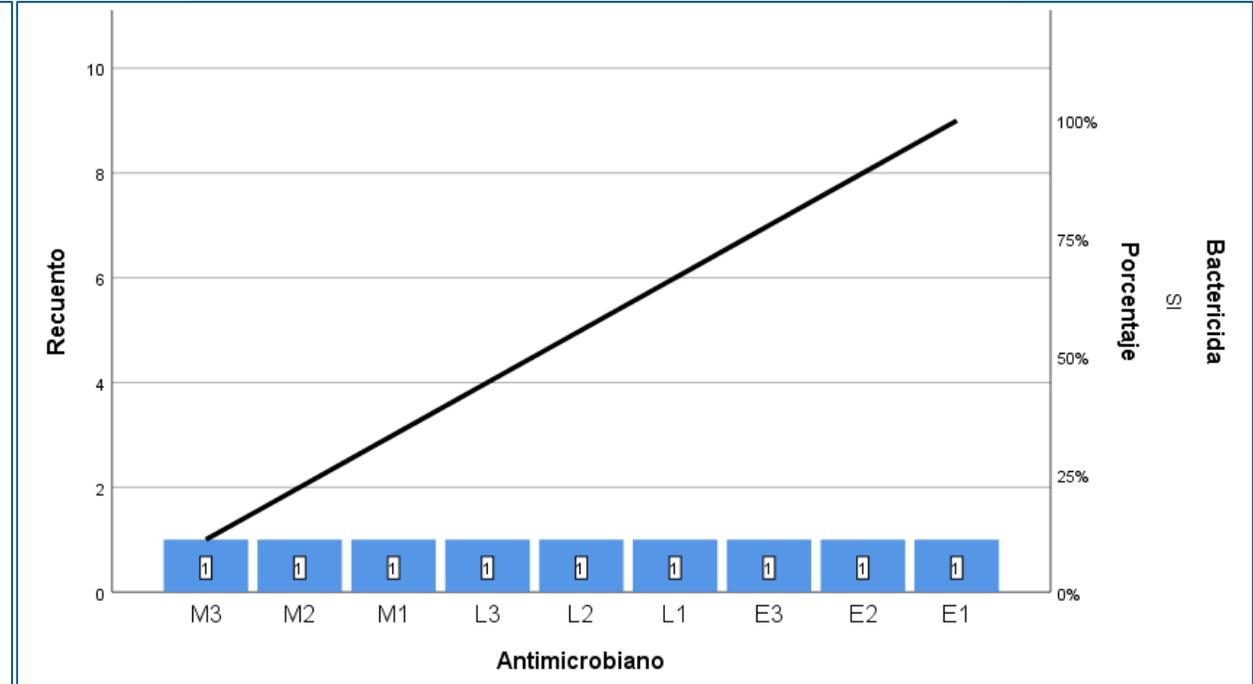
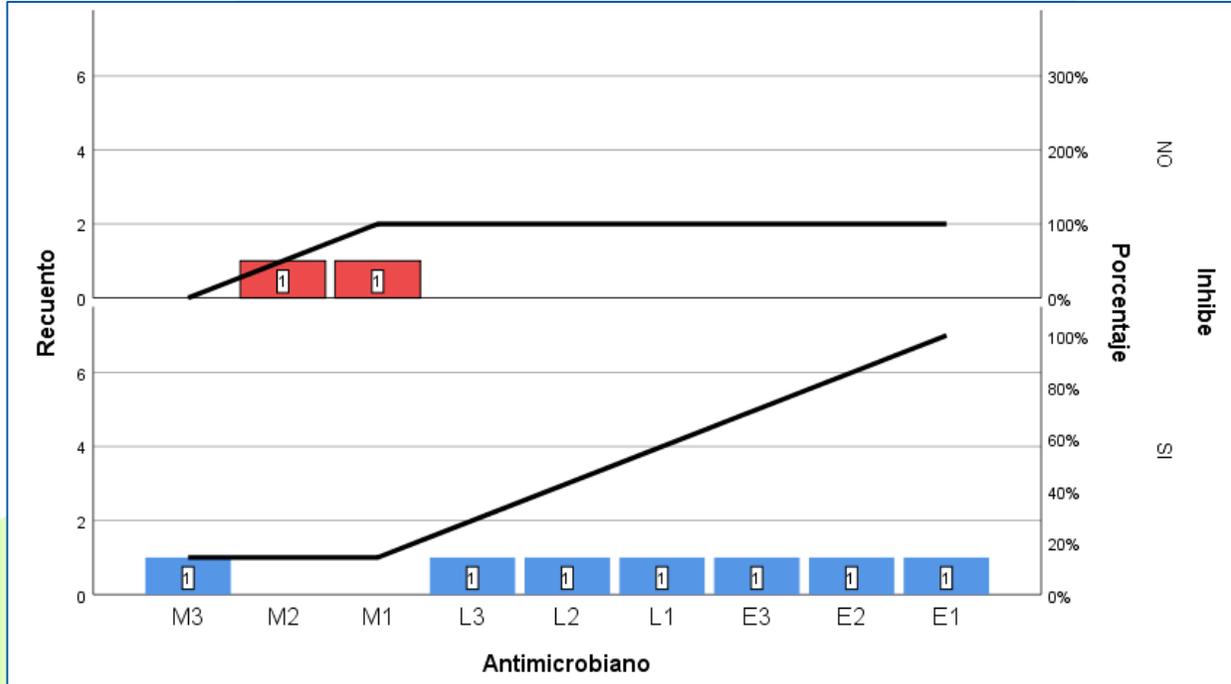
# Microorganismo 2 (*S. agalactiae*)

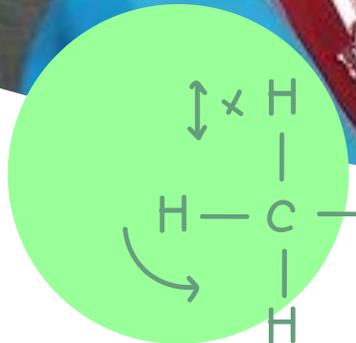
## CMI - CMB



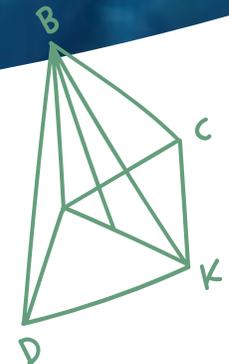
# Microorganismo 4 (Grupo C y G)

## CMI - CMB

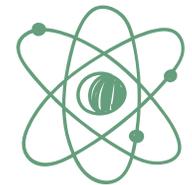


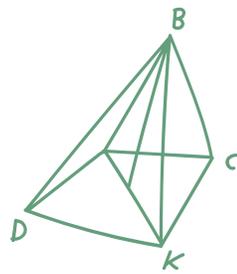


5

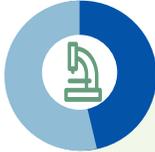


# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES





# Conclusiones



## Factor A (*Streptococcus*)

- Se acepta la hipótesis nula.
- El Grupo G fue el más resistente.
- El más sensible fue *S. agalactiae*
- CMI y CMB los cuatro microorganismos actuaron de manera similar.

## Factor B (Antimicrobiano)

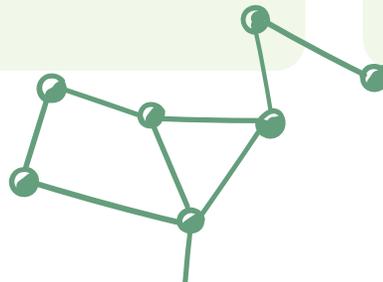
- Se acepta la hipótesis nula.
- El aceite esencial de eucalipto tuvo la mejor actividad antimicrobiana.
- La miel obtuvo la menor actividad antimicrobiana.

## Factor C (Concentración)

- Se acepta la hipótesis nula.
- la concentración más alta (100%) tuvo mayor efecto.

## A\*B\*C

- El aceite esencial de eucalipto al 100% inhibiendo el crecimiento bacteriano de *S. agalactiae* logró la mejor actividad antibacteriana.
- El AE de eucalipto, AE de limón y la miel tuvieron efecto antimicrobiano en las tres concentraciones evaluadas tanto en los dos métodos de sensibilidad probados así como en el análisis de la CMI y CMB



$$A+B=C$$

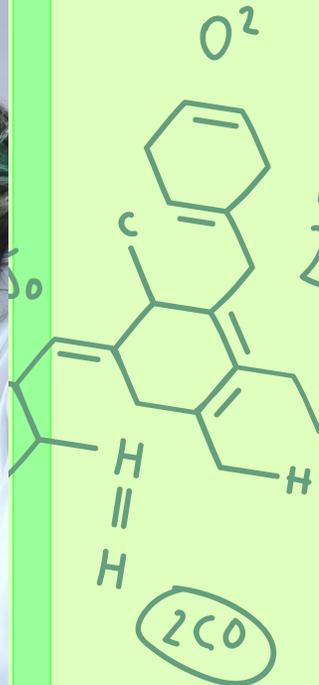
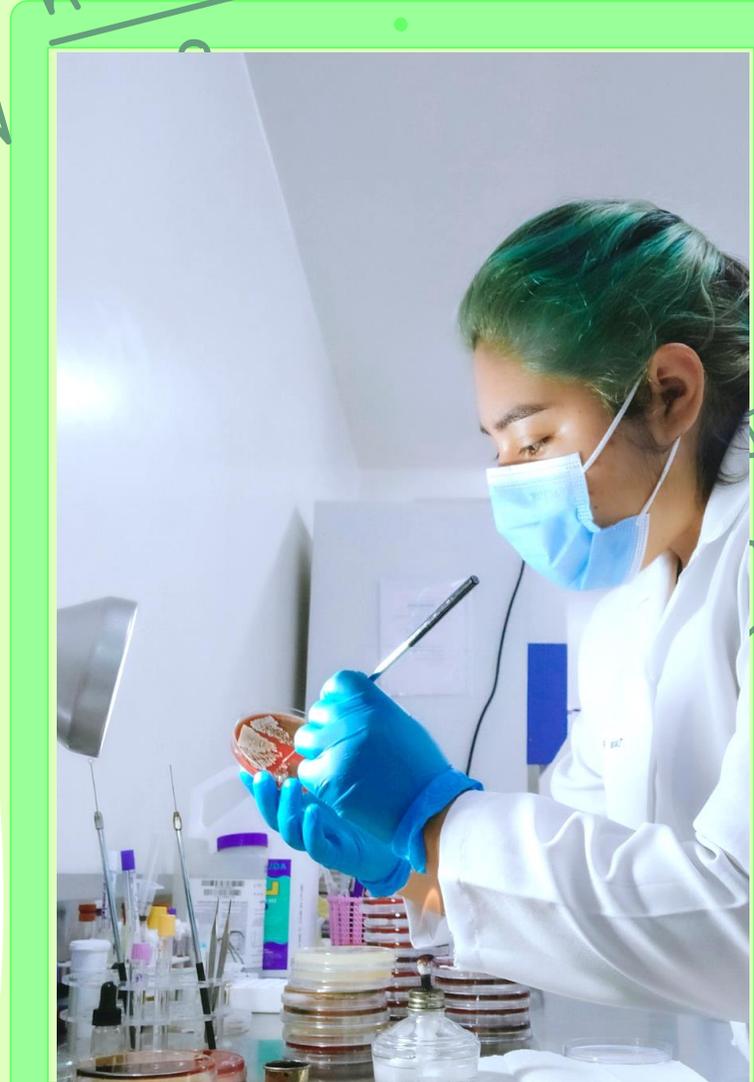
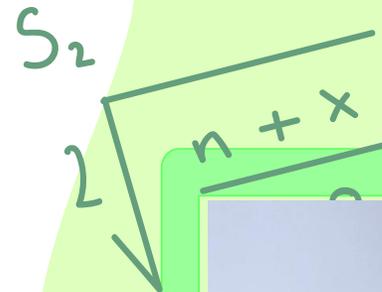
## Recomendaciones

Se recomienda realizar análisis en donde se ponga a prueba concentraciones más bajas de las probadas en este estudio, para obtener un rango referencial mayor que ayude a encontrar una concentración a la cual sus principios activos o metabolitos actúan ante los microorganismos.

Poner a prueba a estos agentes en mayor variedad de bacterias patógenas para los humanos o animales.

Para una mejor percepción de resultados se sugiere realizar las pruebas de CMI comprobando la turbidez mediante espectrofotometría.

Se aconseja la búsqueda de más agentes antibacterianos que ayuden con información para poder combatir la resistencia a antibióticos que existe en la actualidad.





# Gracias por su atención

