



**EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp COMO POSIBLE CONTROLADOR  
BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS *in vitro***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
NOVIEMBRE DE 2018  
BOGOTÁ D.C.**



**EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp COMO POSIBLE CONTROLADOR  
BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS *in vitro***

**Presentado por:**

**LORENA ALEJANDRA RAMÍREZ MOREA  
MARÍA ANGÉLICA SAINEA LANCHEROS**

**Ligia Consuelo Sánchez Leal MSc  
Asesora Interna**

**Jimmy Jolman Vargas Duarte Ph.D  
Asesor Externo**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
PROYECTO DE GRADO  
NOVIEMBRE DE 2018  
BOGOTÁ D.C.**

## DEDICATORIA

Queremos dedicar nuestro trabajo a nuestros padres por ser el cimiento fundamental en todo lo que somos, en nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A nuestros amigos por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional y en los buenos y malos momentos durante la elaboración de este trabajo.

Finalmente, a los maestros aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que nos ayudaron en asesorías y dudas presentadas.

*“Es preciso saber lo que se quiere; cuando se sabe, hay que tener el valor de decirlo, y cuando se dice, es menester tener el coraje de realizarlo”*

Marcel Mart

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos primero a Dios, por darnos la sabiduría para poder realizar y finalizar este trabajo. A nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente en cada paso que dimos para lograr esta meta.

Agradecemos a nuestros asesores, la docente Ligia Consuelo Sánchez y el docente Jimmy Jolman Vargas por guiarnos en este proceso, por permitirnos compartir con ellos este trabajo, por ser un ejemplo en nuestras vidas profesionales, como investigadores y personas de bien.

Asimismo, queremos agradecerles a nuestros docentes que estuvieron presentes en nuestra formación académica como profesionales, dándonos conocimiento y sabiduría.

A todos, muchas gracias por recordarnos que debemos tener en cada paso que damos, humildad, sabiduría, disciplina, constancia y amor por lo que hacemos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PÁG.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
1. ANTECEDENTES	17
2. MARCO REFERENCIAL	21
2.1 Control Biológico	21
2.1.1 Nemátodos	21
2.1.2 Bacterias	21
2.1.3 Hongos nematófagos	21
2.1.4 Hongos endoparásitos	22
2.1.5 Hongos con acción ovicida	22
2.1.6 Hongos depredadores	22
2.2 Generalidades del género <i>Bacillus</i> sp.	22
2.2.1 Esporas	24
2.2.2 Ciclo de esporulación	24
2.2.3 Biomasa quitinolítica	25
2.2.4 Expresión de quitinasas en bacterias	27
2.2.5 Descripción general de <i>B. sphaericus</i> , <i>B. pumilus</i> <i>B. subtilis</i>	27
2.2.5.1 <i>Bacillus sphaericus</i>	27
2.2.5.2 <i>Bacillus pumilus</i>	28
2.2.5.3 <i>Bacillus subtilis</i>	28
2.3 <i>Fasciola hepatica</i>	29
2.3.1 Ciclo biológico <i>Fasciola hepatica</i>	30
2.4 Ovinos	32
2.4.1 Fisiología del aparato digestivo	32

2.5 Resistencia de antihelmínticos contra <i>F. hepatica</i>	33
3. DISEÑO METODOLÓGICO	35
3.1 Universo, población, muestra	35
3.2 Tipo de estudio	35
3.3 Hipótesis	36
3.4 Variables del estudio	36
4. METODOLOGÍA	38
4.1 Fase 1: Evaluación de la pureza y viabilidad de las cepas <i>Bacillus</i> sp seleccionadas para el estudio.	39
4.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal.	40
4.3 Fase 3: Realización de bioensayos de biomasa bacteriana vs concentrados de huevos de <i>Fasciola hepatica</i>	42
5. RESULTADOS	47
5.1 Fase 1: Evaluación de la pureza y viabilidad de las cepas <i>Bacillus</i> sp seleccionadas para el estudio.	47
5.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal.	53
5.3 Fase 3: Realización de bioensayos de biomasa bacteriana vs concentrados de huevos de <i>Fasciola hepatica</i>	56
6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES	73
8. RECOMENDACIONES	74
9. REFERENCIAS	75
ANEXOS	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
Figura 1. Ciclo de esporulación de <i>Bacillus</i> sp.	24
Figura 2. Anatomía de trematodo	30
Figura 3. Ciclo biológico <i>Fasciola hepatica</i>	31
Figura 4. Cepas de <i>Bacillus</i> en caldo BHI	39
Figura 5. Sustratos de medio GTA	41
Figura 6. Pesaje muestras	42
Figura 7. Proceso de sedimentación	42
Figura 8. Sedimento final de las muestras en tubos Falcon	43
Figura 9. Concentrado de huevos con albendazol	44
Figura 10. Control negativo	44
Figura 11. Concentrado de huevos con cada cepa de <i>Bacillus</i> sp	45
Figura 12. Escalas 0.5, 1.0, 2.0 McFarland	46
Figura 13. Medio quitina (MQ)	54
Figura 14. Medio GTA	55

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁG.</b>
Tabla 1. Taxonomía de <i>Bacillus</i> sp.	23
Tabla 2. Taxonomía <i>Fasciola</i>	30
Tabla 3. Clasificación taxonómica de ovinos	32
Tabla 4. Identificación de las variables del estudio	36
Tabla 5. Nomenclatura de las cepas de <i>Bacillus</i> sp en el estudio	38
Tabla 6. Escala de valoración de crecimiento	40
Tabla 7. Estándares de la escala de McFarland usados	45
Tabla 8. Crecimientos de cepas de <i>Bacillus</i> sp en agar BHI postincubación	47
Tabla 9. Revisión microscópica de cada una de las cepas en frotis teñidos con Gram	50
Tabla 10. Resultados Bateria para Bacilos Gram Positivos cepas de <i>Bacillus</i> sp.	53
Tabla 11. Valoración de crecimiento en medio quitina (MQ)	54
Tabla 12. Valoración de crecimiento en medio mínimo de quitina (MMQ)	54
Tabla 13. Valoración cualitativa en medio GTA	56
Tabla 14. Recuento de huevos por gramo del pool de muestras	56
Tabla 15. Resultados de recuento de huevos por gramos de los controles positivos y negativos	57
Tabla 16. Resultados de recuento de huevos por gramo, día 10	57
Tabla 17. Resultados de porcentaje de reducción por suspensión y bacteria	59
Tabla 18. Resultados de porcentaje de reducción por tratamiento con Albendazol	60
Tabla 19. Revisión microscópica de los huevos post tratamiento con los controles	60

**PÁG.**

Tabla 20.	Revisión microscópica de huevos post tratamiento con las cepas bacterianas	61
Tabla 21.	Promedio de huevos por gramo en concentración 0.5	64
Tabla 22.	Promedio de huevos por gramo en concentración 1.0	65
Tabla 23.	Promedio de huevos por gramo en concentración 2.0	66
Tabla 24.	Porcentajes de reducción por concentración	67

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>PÁG</b>
Anexo 01. Composición BHI	85
Anexo 02. Tinción de Gram	85
Anexo 03. Composición medio mínimo de sales con quitina (MMQ)	86
Anexo 04. Composición medio con quitina (MQ)	86
Anexo 05. Composición medio GTA	86
Anexo 06. Sedimentación rápida	86
Anexo 07. Hojas de vida de las cepas utilizadas en este estudio	88



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp COMO POSIBLE CONTROLADOR  
BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS *in vitro***

**RESUMEN**

En Colombia, la explotación ovina es muy susceptible a la alta incidencia de parasitosis por *Fasciola hepática*, debido a los altos niveles de resistencia que ha adquirido este parásito frente a los antihelmínticos químicos, razón por la cual se buscan alternativas con productos biológicos, como bacterias del género *Bacillus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción biocontroladora de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus*, *in vitro* contra huevos de *Fasciola hepatica* procedente de ovinos. La metodología se desarrolló en tres fases, purificación de 11 cepas de *Bacillus* sp. usadas en el estudio, producción de biomasa quitinolítica y biomasa productora de endosporas terminales en medios especiales, y finalmente los bioensayos frente a concentrados de huevos de *Fasciola hepatica*. Las muestras positivas a *Fasciola* fueron recolectadas en el municipio de Concepción, Santander. Al final de los bioensayos se pudo observar que con relación al control positivo

(albendazol) BFH-05 mostró una mayor efectividad. Seguida por BFH-02, BFH-03, BFH-04 y BFH-08 que tuvieron porcentajes de reducción bastante similares sin lograr superar al control positivo. Las demás cepas mostraron una reducción cercana pero inferior, siendo BFH-07 la menos efectiva.

**Palabras clave:** *Bacillus* sp, control biológico, *Fasciola hepática*, quitinasas, endospora.

**Estudiantes:** Lorena Alejandra Ramírez Morea, María Angélica Sainea Lancheros

**Docentes:** Ligia Consuelo Sánchez Leal, Jimmy Jolman Vargas Duarte

**Fecha:** agosto de 2018

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

## INTRODUCCIÓN

El ovino es una especie que ha acompañado al pequeño y mediano productor agropecuario durante muchos años, siendo una fuente importante de alimento y sustento en Colombia<sup>(2)</sup>. La cría de ovinos proporciona múltiples productos a la familia: uso de carne magra con un alto contenido de proteínas y minerales, que pueden cubrir los requerimientos nutricionales en niños, mientras que en los adultos su consumo no representa una amenaza en los niveles de colesterol; uso de la leche para la elaboración de quesos y sus derivados; extracción de lana y piel para su uso a nivel artesanal o en la industria; y los abonos orgánicos mediante el uso del estiércol<sup>(3)</sup>.

Entre los principales problemas que afectan con mayor incidencia a los ovinos esta la parasitosis por *Fasciola hepatica*. La parasitosis causada por *Fasciola hepatica* en humanos es una zoonosis de importancia que afecta la salud pública en nuestro país y a nivel mundial. Es reportada en más de 60 países y la Organización Mundial de la Salud ha estimado que 2,4 millones de personas están infectadas y unos 180 millones están en riesgo de infección. En Colombia, la infección está limitada a zonas localizadas entre 1.700 y 2.700 msnm, lo cual compromete principalmente las cordilleras andinas, regiones montañosas del altiplano Cundiboyacense, altiplano de Nariño y oriente antioqueño<sup>(4)</sup>. Una de las razones por la cual la población de estos territorios se infecta con este parásito, es porque se realiza ovinocultura. Por medio de esta práctica, el mecanismo de transmisión de *Fasciola hepatica* es entrar en contacto con la forma infectante del parásito (metacercarias) que pueden estar presentes en alimentos que estuvieron en contacto con las heces de un animal infectado. Por lo tanto, puede conllevar a una enfermedad zoonótica llamada Fasciolosis, en la que este parásito se ubica en los canalículos biliares del hígado del hospedador que puede provocar una atrofia del parénquima hepático por compresión y cirrosis periportal. Por esta razón, en la salud pública y explotación ganadera, el uso de antihelmínticos representa una de las herramientas para el control de parásitos en estos animales <sup>(5,6)</sup>.

El control de los parásitos en la actualidad se lleva a cabo principalmente por el uso de productos químicos, pero estos están perdiendo rápidamente su eficacia como resultado de la resistencia derivada del uso indiscriminado. Además, estos pueden presentar un peligro para las personas, el medio ambiente, su acumulación residual y su efecto sobre organismos no objetivo, como insectos beneficiosos, aves, animales domésticos y, a veces, el propio hospedero del parásito. Una alternativa adecuada al problema creciente es el control biológico (natural). En condiciones ideales, el control biológico tiene sostenibilidad, que falta en los otros métodos de control de parásitos<sup>(1)</sup>.

El problema actual del uso de los antihelmínticos es el alto grado de resistencia frente a los compuestos químicos que lo conforman, lo que hace que las infecciones persistan; esta resistencia responde a múltiples factores dentro de los cuales se encuentran: "frecuencia de los tratamientos, aplicación de dosis incorrectas, uso erróneo de los antihelmínticos y combinación de distintos compuestos"<sup>(5,7)</sup>.

El control biológico es definido como "el estudio y uso de parásitos, depredadores y patógenos para la regulación de las densidades del huésped (plaga)". Los parásitos que pueden ser clasificados ya sea como ectoparásitos o endoparásitos son unos de los mayores agentes causales de enfermedades en tanto como en el ser humano, los animales y los cultivos, lo que ha generado un rendimiento pobre y una gran pérdida económica<sup>(1)</sup>.

Con este estudio se espera brindar una alternativa al control químico de la parasitosis con *Fasciola hepatica* por medio de control biológico utilizando las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus*. para eliminar al parásito en su estadio de huevo antes de que continúe su ciclo de vida teniendo como ventaja que este proceso sea amigable tanto para el ambiente como para el bolsillo de los productores, brindado al mismo tiempo una posibilidad de reducir la incidencia de esta parasitosis en los ovinos y su posible posterior contagio a los humanos a favor de la salud pública.

## **OBJETIVOS**

### **I. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la acción de *Bacillus* sp. como controlador biológico sobre huevos de *Fasciola hepatica* en ovinos *in vitro*.

### **II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer las condiciones para la producción de biomasa bacteriana quitinolítica y biomasa con producción de endospora terminal a partir de *Bacillus* sp.
- Determinar el efecto que produce la biomasa quitinolítica y la biomasa con capacidad de producción de endosporas de *Bacillus* sp. sobre huevos de *Fasciola hepatica in vitro*.

## 1. ANTECEDENTES

El control biológico se ha planteado como una alternativa de tratamiento para las infecciones parasitarias en ovinos, y dentro de este control biológico se han utilizado las bacterias del género *Bacillus* sp. Como en el estudio realizado por Charles, Terezinha Padilha *et al* en 1994, en el cual se utilizaron cuatro cepas diferentes de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstakien* huevos y larvas del nematodo *Haemonchus contortus* en distintas fases de su ciclo de vida. El resultado obtenido fue el efecto ovicida y larvicida por parte de las cepas usadas en los tratamientos<sup>(8)</sup>.

Después en 1999 Fairweather y Boray J describieron la resistencia a los benzimidazoles que se ha detectado en el campo y propusieron como estrategias para minimizar el desarrollo de la resistencia las cuales incluyen la búsqueda de alternativas a los medicamentos<sup>(9)</sup>. Mientras que Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD reportaron que en Centro América la fasciolosis es un problema de salud en las Islas del Caribe especialmente en zonas de Puerto Rico y Cuba. En 1983 en Cuba un brote afectó a más de 1.000 personas<sup>(72)</sup>.

Otra alternativa que se ha utilizado ha sido el uso de hongos como controladores biológicos Wallera P, Knox M y Faedo M en 2001 llevaron a cabo una serie de ensayos de alimentación con ovejas encerradas que albergan infecciones por *Trichostrongylus colubriformis*. A las cuales se les ofreció granos de cebada que apoyaban el crecimiento del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*. Se demostró que tan poco como 5 g de grano / oveja por día era suficiente para eliminar virtualmente el número de larvas del cultivo fecal. Este efecto persistió durante el tiempo que se alimentaron los granos de hongos, y hasta 2 días después del cese de la alimentación con este material<sup>(10)</sup>.

En 2004 Moghaddam A, Massoud J, Mahmoodi M, Mahvi A, Periago M, Artigas P *et al* documentaron que la fasciolosis se considera emergente en países

asiáticos como Irán y Vietnam, y Egipto en África. La situación más grave en el continente asiático se da en Irán con reportes entre 10.000 a 30.000 personas enfermas, y hasta 6 millones en riesgo de adquirir el parásito<sup>(69)</sup>. La enfermedad ocurrió de manera esporádica hasta 1989, año en que se presentó un brote que afectó a 10.000 personas.

En 2006 Mailles A, Capek I, Ajana F, Schepens C, Ilef D, Vaillant V informaron que en Europa la enfermedad se ha diagnosticado en 19 países. La mayoría de los casos se encuentra en Francia, Portugal, España y la antigua URSS. En Francia se reportó una importante área endémica con 300 personas infectadas<sup>(71)</sup>.

Posteriormente en el 2009 Ashrafi K, Valero M, Massoud J, Sobhani A, Solaymani-Mohammadi S, Conde P, *et al* reportaron que un problema aún más grave ocurre en algunas zonas rurales endémicas de Egipto en provincias del Delta del Nilo, provincias altas y en la ciudad de Alejandría con prevalencias en humanos entre 7% y 17%, esto representa un número aproximado de 830.000 personas infectadas y un total de 27,7 millones en riesgo de infectarse<sup>(70)</sup>. Ese mismo año Romero S, Rodríguez C, Corrales L, realizaron un estudio en el cual evaluaron como opción viable la bacteria *Bacillus sphaericus*, y estudiaron su actividad larvicida que se debe a la producción de una inclusión cristalina denominada toxina binaria A y B de 41,9 y 51,4 kDa, las cuales, al ser liberadas en el intestino de los insectos susceptibles en su fase larvaria y tras ser solubilizada por el pH alcalino en la porción media del intestino, activan las proteasas causando deshidratación y muerte a los vectores<sup>(11)</sup>.

En el año 2010, Espinoza R., Terashima A., Herrera P., Marcos L. estudiaron la fasciolosis humana y animal en Perú, donde evaluaron la pérdida económica que producía este parásito a nivel de ganadería y describieron la importancia de esta zoonosis en la salud pública. Generando una pérdida ganadera anual por la fasciolosis es no menor de US\$ 50 millones. No se pudo determinar con exactitud el impacto económico de la fasciolosis humana por su estatus de

enfermedad desatendida, siendo endémica, y en algunos casos hiperendémica, reconociéndola como una emergencia de salud pública<sup>(12)</sup>. En este mismo año Corrales C, Sánchez L, Cuervo J, Bautista D, González L, Guevara M, hicieron un ensayo con 30 plantúlas de romero afectadas por *Fusarium* spp. utilizando *Bacillus liqueniformis* (B1), *Bacillus subtilis* (B2), *Bacillus megaterium* (B14), *Bacillus brevis* (E2) como biocontroladores obteniendo en las pruebas de antagonismo *in vitro* B1 y B2 presentaron entre el 70–100% de inhibición del micelio y B14 y E2 entre el 40–69%. Confirmando así la actividad biocontroladora de este género<sup>(13)</sup>.

En el año 2011 los autores Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales L, Sánchez L, evaluaron el efecto biocontrolador del género *Bacillus* sp contra hongos fitopatógenos de plantas, enfatizando en su acción biocontroladora mediada por su perfil bioquímico ya que son productores de múltiples metabolitos biológicamente activos, en el caso de *Bacillus subtilis* de Iturin A y fengycin y en *Bacillus brevis* de gramicidina S (1-5) son capaces de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de otros microorganismos<sup>(14)</sup>.

En el año 2012 los autores Yesid A, Sánchez L, evaluaron los metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* sobre *Fusarium* sp. Se identificó Iturina A, con una concentración aproximada de 151.805 mg/l y las pruebas de antagonismo *in vitro* expresaron un porcentaje de 70 a 100% de inhibición de crecimiento sobre *Fusarium* sp<sup>(15)</sup>. Demostrando que este género es productor de metabolitos secundarios capaces de generar un control sobre patógenos.

Los autores Piñeiro P, Cazapal C, Rodríguez M, Oliver A, Hernández J, Fernández M, *et al*, en el año 2013, plantearon un estudio con el objetivo de determinar la utilidad del empleo de hongos del suelo que desarrollan actividad frente a huevos de parásitos, como medida de prevención de trematodosis parasitarias en ganado bovino. Dando como resultados que *Mucor circinelloides* desarrollaba actividad capaz de romper la cubierta externa, penetrar en el interior y destruirlo<sup>(16)</sup>. En el mismo año, Palma L., Peña R.,

Becerra W, realizaron un estudio epidemiológico con el objetivo de determinar la prevalencia de fasciolosis humana y animal en el municipio de Pamplona, Santander. Este se realizó mediante tres fases, y se obtuvieron como resultados que la prevalencia para *F. hepatica* fue de un 0%(n=10) en los humanos y del 93,75%(n=16) para los bovinos; determinando algunos factores de riesgo como lo son, consumir agua directamente de tuberías, riego de cultivos con aguas de nacimientos, llevarse el pasto a la boca, consumo de agua de quebradas, consumo de berros. Además, recomiendan seguir trabajando en esta línea de investigación <sup>(17)</sup>. También en este año Uribe N y García C en su artículo Fasciolosis, zoonosis emergente y reemergente vista desde una dimensión ambiental (Revisión) describen como la fasciolosis ha sido reportada en 51 países de África, América, Asia, Europa y Oceanía y se estima que existen entre 2,4 a 17 millones de personas afectadas en el mundo, y 180 millones de personas en riesgo de adquirir el parásito<sup>(68)</sup> .

En el año 2014 se realiza un estudio en el municipio de Toca, por los autores Martín O, Corredor M, Anaya A, Becerra R, donde estudiaron los principales parásitos gastrointestinales que afectaban las principales explotaciones ovinas. Dando como resultado que el parásito *Fasciola hepatica* tiene una prevalencia del 7.8%. Evidenciando la importancia a nivel de salud pública de este parásito <sup>(18)</sup>. En este mismo año se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el departamento del Quindío, determinando la prevalencia de *Fasciola hepatica* en las heces de empleados del sector ganadero y en los bovinos. Se da como resultado la prevalencia de *F. hepatica* en bovinos de 3,74% y 0% en humanos<sup>(19)</sup>.

Mercado J., Velarde F., Díaz M., Montenegro Y., Acevedo J., Bores A, en el año 2015 llevaron a cabo un estudio con 5 extractos de plantas tropicales (*Lantana camara*, *Bocconiafrutescens*, *Piper auritum*, *Artemisia mexicana* y *Cajanus*) como biocontroladores contra *fasciola hepatica*. Concluyendo su prometedora actividad frente a este parásito<sup>(20)</sup>.

En el 2016 los autores Kelley J, Timothy P, Travis E, Glenn A, Skuce P, Spithill T, discutieron la amenaza actual que produce el TCBZ-R en *F. hepatica*, analizando la distribución global de la resistencia observada en el ganado, los posibles mecanismos de acción de los fármacos, los mecanismos propuestos y la base genética de la resistencia. Dándole importancia a las consecuencias negativas que produce este fenómeno de resistencia sobre la ovinocultura<sup>(21)</sup>. Ese mismo año Leguizamón A y Jara P realizaron la evaluación de 10 cepas de *Bacillus* sp productoras de biomasa quitinolítica y endosporas, que sembraron en medios MQ, MMQ y GTA, las cuales manejaron a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 para luego enfrentarlas a concentrados de huevos de nematodos aislados de ovinos. Al final obtuvieron una reducción significativa en los concentrados de huevos con los tratamientos de las bacterias BNQ-02 con 77.05%, BNQ-05 con 62.42%, BNQ-06 con 61.57%, y BNQ-01 con 55.45%; y además fue posible evidenciar daños en la estructura y morfología de los huevos debido a la acción ejercida por la biomasa bacteriana<sup>(50)</sup>.

## **2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1 Control biológico**

El control biológico es definido como “el estudio y uso de parásitos, depredadores y patógenos para la regulación de las densidades del huésped (plaga)”<sup>(1)</sup>.

Entre estos controladores biológicos se encuentran:

#### **2.1.1 Nematodos**

Se pueden clasificar en dos, como lo son los diplogastéridos, quienes capturan al nemátodo gracias a que poseen una ancha cavidad bucal, que contiene varios dientes filosos, los cuales actuarán como cuchillas y así desgarran los tejidos y acaban con el parásito. Y los monórquidos, que tienen una lanceta de gran tamaño, esta actuará como aguja hipodérmica, es decir atraviesa el cuerpo y succiona el contenido corporal<sup>(14)</sup>.

#### **2.1.2 Bacterias**

También pueden ejercer una actividad letal frente a los nemátodos, una de las más estudiadas en este campo es *Bacillus thuringiensis*, la cual desarrolla una espora con un cristal proteico que sirve de herramienta de control frente a estadios larvarios de los parásitos<sup>(14)</sup>.

#### **2.1.3 Hongos nematófagos**

Se encuentran en el suelo y son muy diversos, estos tienen la capacidad de infectar y alimentarse de los parásitos cuando se encuentran en estadios de vida libre. Estos microorganismos al momento de estar en contacto con los parásitos producen órganos especializados que capturan, destruyen y finalmente se alimentan de los tejidos de estos.

El caso de los hongos nematófagos ha sido más estudiado para el control de parásitos, lo que ha permitido establecer una clasificación según su modo de acción.

#### **2.1.4 Hongos endoparásitos**

Se caracterizan en la producción de esporas las cuales afectarán enquistando o adhiriéndose, permitiéndoles de esta forma penetrar la cutícula, o simplemente se forman los conidios los cuales ingerirá el nemátodo, y una vez dentro se desarrollan y alimentan de este.

#### **2.1.5 Hongos con acción ovicida**

Se adhieren o invaden los huevos ya sea penetrando con las hifas la cutícula del huevo o con un órgano específico de penetración conocido como apresorio, el cual se desarrolla a partir de la hifa, una vez el hongo penetra en el huevo consumen el contenido.

#### **2.1.6 Hongos depredadores**

Se caracterizan por poseer diversos órganos de captura, los cuales se especializan a partir de las hifas; dentro de los órganos se encuentran redes adhesivas, anillos simples o constrictores, dedos adhesivos, entre otros<sup>(14)</sup>.

### **2.2 Generalidades del género *Bacillus* sp.**

Los *Bacillus* son un grupo muy cohesionado. Su morfología define un tipo de morfología, los bacilos. Tienen forma de bastón alargado y presentan gran número de flagelos alrededor del cuerpo, aunque algunas especies son inmóviles. Responden positivamente a la tinción de gram. Sus esporas, endosporas, son refringentes y pueden aguantar grandes temperaturas gracias a su cubierta, por lo que es muy difícil deshacerse de ellas, pueden sobrevivir a la ebullición durante 20 minutos. De las 40 especies la mayoría son catalasas positivas. Viven en el suelo o agua y en organismos en descomposición, tanto animales vegetales. Principalmente son aerobios estrictos, aunque algunas especies pueden presentar anaerobia facultativa. Se pueden diferenciar de los

*Clostridium* porque su endospora central no deforma la bacteria. Sus condiciones óptimas de crecimiento en el laboratorio son 37°C y pH de 7.

Son un grupo de amplia distribución a nivel mundial. Son ubicuos, pueden aislarse tanto de agua como de tierra. Sus esporas son muy resistentes por lo que pueden sobrevivir en condiciones extremadamente hostiles. Algunas de sus especies pueden aislarse de la flora intestinal normal de animales <sup>(15)</sup>.

- Tabla 1. Taxonomía *Bacillus* sp<sup>(15)</sup>

Dominio	Bacteria
División	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>

Las bacterias del género *Bacillus* contienen una pared celular rica en peptidoglicano (mureína y ácidos teicoicos) que rodea a la membrana celular de la célula. Esta capa de peptidoglicano les confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram, permitiendo clasificar a este género dentro del grupo de las bacterias Gram positivas.

Otras estructuras características de este género son:

- Cápsula: algunos *Bacillus* poseen cápsula, como el caso de *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, y *B. licheniformis*, la cual contiene ácido poli D o L-glutámico. Mientras que otras especies como *B. circulans*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, producen cápsulas de hidratos de carbono.

- Flagelos: Muchas especies son móviles gracias a flagelos peritricos, los cuales no son muy abundantes. El flagelo no es una característica principal de este género, pero puede ayudar a identificar especies, por ejemplo, dentro de las especies no móviles se destacan *B. anthracis*, y *B. mycoides*<sup>(16)</sup>.

### 2.2.1 Esporas

El fenómeno de la esporulación de bacterias Gram positivas ha sido ampliamente investigado. Estos microorganismos son capaces de producir una espora por célula altamente resistente a condiciones ambientales adversas a través de una intrincada red de interacciones ADN-proteína y proteína-proteína. La espora, que en términos morfológicos difiere significativamente de la célula vegetativa, está compuesta en la mayoría de los casos por una envoltura externa conocida como exosporium, seguida hacia el interior por las capas de proteína de la cubierta y la corteza, que está conformada por peptidoglicano. Después de esta estructura se encuentra el protoplasto de la espora, que comprende pared celular de la célula germinal, membrana y el llamado núcleo, en el que se encuentran enzimas, ribosomas, dipicolinato de calcio y ADN asociado a proteínas pequeñas ácidos solubles (SASP por sus siglas en inglés) (22).

### 2.2.2 Ciclo de Esporulación

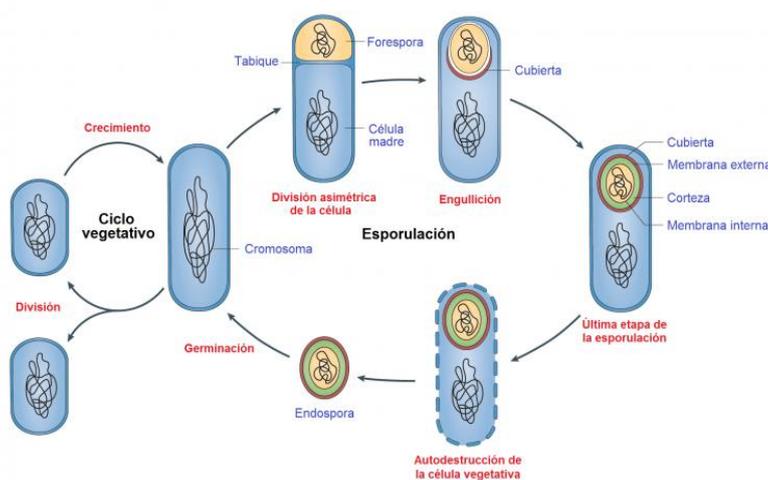


Figura 1. Ciclo de esporulación *Bacillus* sp. Tomado de <http://cbrn.es/?tag=resistencia>

El proceso de esporulación puede ser dividido en siete pasos (figura 1):

- I. Preseptación: con el ADN formando el filamento axial.
- II. Septación asimétrica, la membrana de la espora en desarrollo rodea el protoplasto de espora y se convierte en forma individual de la membrana de la célula madre.
- III. El pre espora así formado se rodea por el citoplasma de la célula madre y así está contenida dentro de polaridad opuesta.
- IV. La formación de la corteza de la espora comienza con una pared de célula primordial está previsto entre las membranas, al lado de la membrana interna de la preespora. la corteza (una capa más gruesa de peptidoglicano transparente, única para las endosporas bacterianas) es establecida en el exterior de esta pared célula primordial y exosporio, una delicada cubierta más externa proteico delgada, se puede formar en esta etapa.
- V. Capas de esporas proteicas se sintetizan y comienzan a depositar fuera de la corteza.
- VI. La espora madura y adquiere su refringencia y resistencia al calor.
- VII. Se libera la espora madura <sup>(23)</sup>.

### **2.2.3 Biomasa Quitinolítica**

La quitina es el compuesto orgánico que abunda más en el planeta después de la celulosa, otro polisacárido. Henry Braconot la descubrió en 1811 en algunas setas y E. Odier la redescubrió en 1823. El segundo le dio su nombre actual de "chitine", quitina, cuya etimología griega evoca el significado de túnica, porque la encontró en los élitros de algunos escarabajos y supuso que cumplía una función protectora de los tejidos animales. Más tarde sería descubierto que esta tiene un papel importante en la estructura anatómica de distintos organismos, puesto que su estructura molecular permite la formación de

auténticos tejidos que le confieren resistencia y soporte como componente estructural del exoesqueleto de artrópodos, arácnidos, insectos, nematodos, anélidos y otros invertebrados; a la concha exterior de crustáceos, braquiópodos y moluscos, así como a las paredes celulares de muchos hongos, dentro de la división de los Ascomycota y los Basidiomycota. Debido a esto, la actividad quitinasa ha sido encontrada en numerosas bacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados, desempeñando una función importante en el proceso de muda de los insectos y la digestión de alimentos quitinosos, y puede también servir como enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos<sup>(24)</sup>.

La quitina se encuentra principalmente en crustáceos, insectos y hongos. Posee una estructura lineal de alto peso molecular constituida por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -D (1,4). Es altamente insoluble y presenta baja reactividad. Para su síntesis necesita de un precursor activado de uridina difosfato N-acetilglucosamina y de la enzima quitina sintetasa<sup>(25)</sup>.

Las quitinasas son enzimas capaces de hidrolizar quitina en sus componentes oligo y monoméricos<sup>(26)</sup>. De acuerdo con la comisión de enzimas de la IUPAC (International Unión of Pure and Applied Chemistry), se agrupan en la clase tres, correspondiente a las glicosilhidrolasas. Dentro de esta clase, se agrupan dentro de las familias 18, 19 y 20. La familia 18 incluye enzimas presentes en organismos de todo tipo, mientras que la familia 19 incluye predominantemente quitinasas de plantas, relacionadas con el mecanismo de defensa frente a la infección por hongos<sup>(27)</sup>.

Las quitinasas se clasifican en dos grupos según su sitio de acción:

- **Endoquitinasas:** que se unen de manera aleatoria a sitios internos, lo cual genera multímeros de bajo peso molecular de GlcNAc.
- **Exoquitinasas:** que a su vez se dividen en quitobiosidasas (catalizadoras de la liberación de diacetilquitobiosa comenzando con los extremos terminales no reducidos de las microfibras de quitina) y las  $\beta$ -1-4 glucosaminosidasas (las  $\beta$ -

1-4 N-glucosaminosidasas se unen a productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas, generando monómeros de GlcNAc)

#### **2.2.4 Expresión de quitinasas en bacterias**

Son varios los géneros bacterianos que producen quitinasas, entre ellos se encuentran algunos representantes del género *Serratia*<sup>(26)</sup>. Dentro del género *Bacillus* se han reportado varias especies como productoras, teniendo como ejemplo a *Bacillus pumilus*, productor de dos tipos a través de la regulación de los genes *chiS* y *chiL*<sup>(28)</sup>. La mayoría de las quitinasas bacterianas, las cuales han sido aisladas y secuenciadas hasta el momento, están incluidos en la familia 18 de las glicosilhidrolasas. La expresión de los genes de quitinasas en microorganismos es controlada por medio de un sistema inductor/represor, en el cual, la quitina u otros productos de la degradación actúan como inductores del sistema, estimulando así la producción de quitinasas por parte del microorganismo<sup>(26)</sup>. Se considera que, con el fin de obtener suministros de nitrógeno y carbono como una fuente de nutrientes, las bacterias producen quitinasas y esta se da principalmente por la degradación de la quitina y su utilización como fuente de energía<sup>(27)</sup>.

#### **2.2.5 Descripción general de *B. sphaericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis***

##### **2.2.5.1 *Bacillus sphaericus*:**

Bacilo Gram positivo, aerobio estricto incapaz de utilizar azúcares para su crecimiento, en Agar Nutritivo crece en diferentes formas compactas difundiéndose en el medio. Algunas especies producen colonias rosas, se aísla a partir de sedimentos de río, sedimento marino, y algunos alimentos. Algunas cepas son reconocidas por su patogenicidad contra larvas y mosquitos. Presenta variedad de inclusiones las cuales son cuerpos elípticos que no cambian en apariencia en el paso del intestino a la larva. Los mosquitos ingieren las bacterias y la toxina altera el funcionamiento del intestino del

mosquito. Es biocontrolador de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex quinquefasciatus*. Este organismo es utilizado como insecticida biológico y es efectiva de una a cuatro semanas después de la aplicación. Es utilizado como patrón de las macromoléculas biológicas tales como enzimas, 8 proteínas de los receptores o ácidos nucleídos y estabilización térmica de los lípidos basados en estructuras, como la membrana <sup>(29)</sup>. Es una bacteria esporulante aerobia, ubicua, cosmopolita, con un esporangio terminal y una espora esférica, que posee propiedades insecticidas<sup>(30)</sup>.

#### **2.2.5.2 *Bacillus pumilus*:**

Es una bacteria esporulante aerobio o anaerobio facultativo, Gram positiva. Es una especie considerada mesófila, crece como una colonia lisa que se vuelve de color amarillo conforme avanza el tiempo de incubación. Es una especie móvil (posee flagelo), beta hemolítica en agar sangre, catalasa positiva, tolerante a las sales, susceptible a las penicilinas y no crece bajo estrictas condiciones anaeróbicas.

Posee propiedades tóxicas, efectos citopáticos en células Vero, produce lectinasa y actividad proteolítica de la caseína. Las esporas de este bacilo son notablemente resistentes a condiciones ambientales desfavorables, como la escasez de nutrientes desecación, radiación UV, desinfección química. Las endosporas, pueden sobrevivir a tratamientos de calor y a radiaciones UV fuertes<sup>(30)</sup>.

#### **2.2.5.3 *Bacillus subtilis*:**

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación la radiación los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente

de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Es un gran controlador biológico, *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp, y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogynes* pp) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del tallito” del algodónero<sup>(29)</sup>.

### **2.3 *Fasciola hepatica***

*Fasciola hepatica* es un helminto perteneciente a la subclase *Digenea*, posee cuerpo en forma aplanada que mide 2.9 cm x 1.4 cm, de color gris claro, opaco con dos bandas laterales más oscuras. La parte anterior del cuerpo está compuesta por una proyección cónica seguida de un par de hombros a los lados que convergen caudalmente. En su forma adulta se ubica en los canales biliares de su hospedador definitivo, los órganos internos como el aparato reproductor y digestivo son muy ramificados; posee una ventosa oral y una ventosa ventrales muy próximas entre sí, esta última tiene mayor tamaño y se ubica en su cuerpo a la altura de los hombros la cual le permite su fijación<sup>(26)</sup>.

Debido a las lesiones que causa el parásito al migrar por los conductos biliares produce desechos de tejidos y sangre lo cual le permite alimentarse, el alimento pasa desde de la boca a través de la faringe corta y muscular a un esófago y después a un intestino que se divide en dos ciegos, que son largos y ramificados con numerosos divertículos laterales que permiten su capacidad hematófaga<sup>(27)</sup>.

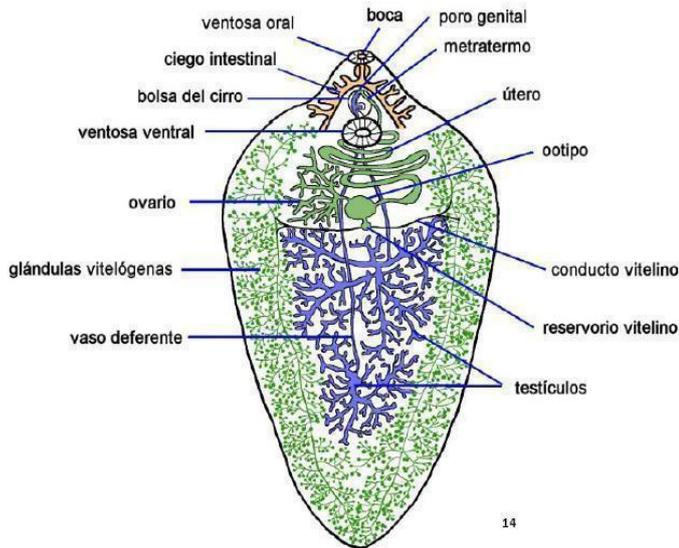


Figura 2. Anatomía de trematodo. Tomado de <https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/7C/Dibujo14.jpg>

- Tabla 2. Taxonomía *Fasciola* <sup>(30)</sup>

Reino	Animalia
Filo	Platyhelminthes
Clase	Trematoda
Orden	Echinostomida
Familia	Fasciolidae
Género	<i>Fasciola</i>

### 2.3.1 Ciclo biológico *Fasciola hepática*

Los parásitos se convierten en verticilos adultos en los conductos biliares de mamíferos infectados, que pasan huevos inmaduros en sus heces. La siguiente parte del ciclo de vida se produce en agua dulce. Después de varias semanas, los huevos eclosionan, produciendo una forma de parásito conocida como el miracidio, que luego infecta a un huésped de caracol. En condiciones óptimas, el proceso de desarrollo en el caracol puede ser completado en 5 a 7 semanas; las cercarias son luego vertidas en el agua alrededor del caracol. Las cercarias

pierden sus colas cuando enquistan como metacercarias (larvas infecciosas) en plantas de agua. A diferencia de las cercarias, las metacercarias tienen una pared externa dura del quiste y pueden sobrevivir durante períodos prolongados en ambientes húmedos<sup>(27)</sup>.

En los seres humanos, la maduración de las metacercarias en las láminas adultas tarda aproximadamente entre 3 y 4 meses. Las láminas adultas (*Fasciola hepatica*: hasta 30 mm por 13 mm, *F. gigantica*: hasta 75 mm) residen en los grandes conductos biliares del huésped mamífero. *Fasciola hepatica* infecta varias especies animales, en su mayoría herbívoros (animales que comen plantas)<sup>(28)</sup>.

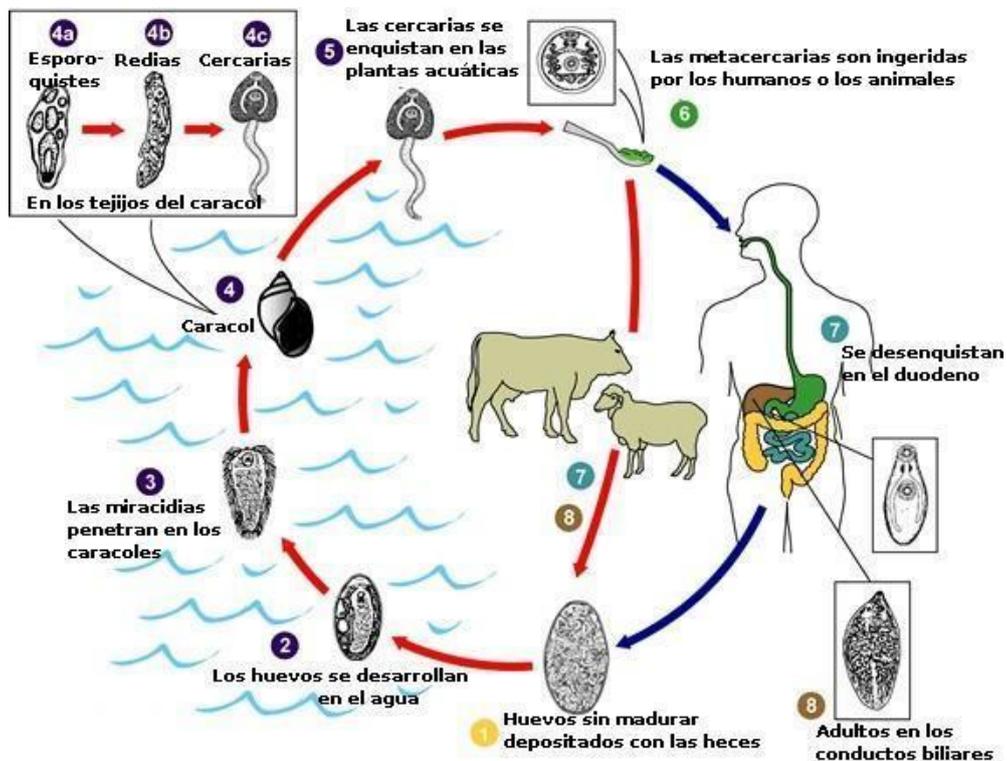


Figura 3. Ciclo biológico *Fasciola hepática*. Tomado de [http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/imagenes/d/Duela\\_del\\_higado\\_001.jpg](http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/imagenes/d/Duela_del_higado_001.jpg)

## 2.4 Ovino

La ovinocultura ha ganado un importante terreno en el país durante los últimos años. Esta actividad ancestral se ha convertido en sinónimo de rentabilidad y eficiencia gracias al proceso de formalización y enfoque empresarial que están impulsando los productores y asociaciones nacionales. El hato ovino colombiano asciende a 2 millones de cabezas en todo el país, de las cuales, cerca de un millón se encuentran en La Guajira, una región emblemática para la producción ovina. Pero gracias a su valor agregado y evolución, ya se desarrolla con firmeza en departamentos como Boyacá, Cundinamarca, Valle del Cauca, Santander y Cesar, en donde los productores han identificado el potencial y valor de esta actividad.<sup>(24)</sup> Existen más de 200 razas de ovejas y se dividen según su función económica en lana, leche, carne y piel.<sup>(3)</sup>

- Tabla 3. Clasificación taxonómica de ovinos<sup>(5)</sup>

Reino	Animal
Filum	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Ungulado
Suborden	Artiodáctyla
Familia	Bovidae
Tribu	Caprini
Género	<i>Ovis</i>
Especie	<i>Ovisories</i>

### 2.4.1 Fisiología del aparato digestivo

El alimento ingresa por la primera porción del conducto alimenticio, el cual está formado por la boca, la cual contiene lengua y dientes. De allí pasa a la faringe y junto con la saliva baja por medio del esófago al estómago, el cual contiene cuatro compartimentos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso, siendo el rumen el compartimiento más grande. El rumen es un gran compartimento de

fermentación que cuenta con más de 200 bacterias y 20 tipos de protozoos que ayudan al rumiante a utilizar piensos fibrosos y fuentes de nitrógeno no proteico. La presencia de microorganismos en el complejo retículo-rumen le permite al pequeño rumiante utilizar nutrientes presentes en los alimentos que no pueden ser degradados por enzimas producidas por mamíferos. Mientras que el retículo moverá el bolo por contracciones de las capas musculares que rodean el rumen. En el omaso se absorbe agua, sodio y potasio y el abomaso se encarga de segregar ácido clorhídrico y pepsina para la degradación de proteínas. Por último, el intestino delgado se lleva a cabo la absorción de ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos y agua a través de las vellosidades intestinales. Mientras que el intestino grueso reabsorbe, recircula y conserva el agua, además de la absorción de minerales<sup>(25)</sup>.

## **2.5 Resistencia de antihelmínticos contra *Fasciola hepática***

Según la FAO la resistencia de antihelmíntico (AR) es el resultado de la administración repetida del mismo antihelmíntico; además, su desarrollo se ha visto favorecido por un tratamiento ineficaz debido a la infradosificación. AR es el resultado de tratamientos repetidos del mismo antihelmíntico, aunque su desarrollo también se ve favorecido por la administración de dosis insuficientes o por sobredosis<sup>(31)</sup>.

Actualmente, el fármaco más comúnmente utilizado para controlar la fasciolosis pertenece a la familia del benzimidazol (BZ) y es el triclabendazol (TCBZ). TCBZ ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones de trematodos hepáticos en el ganado durante más de 20 años<sup>(32)</sup> ya que es el único antihelmíntico eficaz contra ambas etapas de *F. hepática*, inmaduras y maduras<sup>(33)</sup>. Sin embargo, hay varios informes que describen cepas resistentes de *F. hepática* a TCBZ en todo el mundo, en Australia <sup>(34)</sup>, Argentina <sup>(35)</sup> y también en diferentes países europeos<sup>(36,37)</sup>.

Por lo tanto, la detección temprana de la resistencia es esencial, ya que la reversión a la susceptibilidad no parece ocurrir <sup>(38)</sup>. Se han desarrollado algunas

pruebas in vivo e in vitro para detectar AR en rumiantes. Entre las pruebas in vivo, la prueba de reducción de recuento fecal de huevo (FECRT) se basa en la reducción del número de huevos en las heces después del tratamiento antihelmíntico <sup>(39)</sup>. Con respecto a las pruebas in vitro, se ha descrito un ensayo de eclosión de huevos (EHA) para detectar la resistencia a BZ en Trichostrongylidae<sup>(40,41)</sup>. La EHA se basa en las propiedades ovicidas de algunas BZ, y en la capacidad de los huevos de aislados resistentes para embrionar y eclosionar en concentraciones más altas que las de un aislado susceptible <sup>(42)</sup>. Aunque el EHA se diseñó originalmente para detectar AR en nematodos gastrointestinales (GIN), se han llevado a cabo algunos estudios con huevos de *F. hepatica* de vesícula biliar y / o heces utilizando TCBZ, albendazol (ABZ) y sus metabolitos de sulfóxido<sup>(43,44)</sup>.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Universo, población, muestra

- Universo: Microorganismos con capacidad antiparasitaria frente a *Fasciola hepatica* de ovinos.
- Población: Bacterias productoras de distintas sustancias con capacidad de ejercer control sobre trematodos de ovinos.
- Muestra: Cepas nativas y de referencia de las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus* depositadas en el banco de cepas de la UCMC productoras de sustancias capaces de ejercer control sobre trematodos de ovinos.

#### 3.2 Tipo de estudio

Este trabajo corresponde a una investigación de tipo cuantitativa con un diseño de tipo descriptivo.

- Cuantitativa: Dado que se buscará evaluar el crecimiento de distintas cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus* en un medio de cultivo que permita evaluar su capacidad de control biológico, por medio de bioensayos con huevos de *Fasciola hepatica* de ovinos.
- Descriptiva: Porque se presentará una interpretación del estudio basada en el porcentaje de reducción que puedan ejercer las cepas *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus* sobre los huevos de *Fasciola hepatica* a partir de un análisis estadístico.

### 3.3 Hipótesis

La posible acción de *Bacillus* sp. por medio de su biomasa quitinolítica y su biomasa productora de endosporas le permitirá actuar como un controlador biológico contra *Fasciola hepatica* en ovinos.

### 3.4. Variables del estudio

En la tabla 4 se enunciarán las variables identificadas para el estudio.

- Tabla 4. Identificación de las variables del estudio.

TIPO DE VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN TEÓRICA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIABLE
Independiente	Cepas quitinolíticas	La elección de las cepas se basa en revisión bibliográfica y la capacidad es estas en su actividad productora de biomasa quitinolítica y endospora.	Cualitativa
Independiente	Temperatura (27 – 30°C)	La temperatura influye en el crecimiento y producción de biomasa quitinolítica y endosporas de las cepas en estudio. El control de temperatura se realiza en la incubadora.	Cuantitativa
Independiente	Huevos <i>Fasciola hepatica</i>	Se seleccionaron debido a su gran importancia en la salud pública, y resistencia en antihelmínticos, con el fin de ejercer un control biológico sobre ellos.	Cualitativa
Independiente	Huevos por	Se mide la cantidad	Cuantitativa

	gramo de heces (hpg)	que hay de huevos por gramo de heces en las muestras de ovinos.	
<b>Dependiente</b>	Porcentaje de reducción	Se evalúa el porcentaje de reducción de huevos en todos los ensayos <i>in vitro</i> , con el fin de obtener un porcentaje que sea significativo.	Cuantitativa

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Fase 1: Evaluación de la pureza y viabilidad de las cepas de *Bacillus* sp. seleccionadas para el estudio.

Se llevó a cabo la activación de 11 cepas de *Bacillus* sp. de las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus* previamente identificadas por métodos moleculares y procedentes del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. En la tabla 5 se enuncia la nomenclatura de las cepas de *Bacillus* que se utilizarán en el estudio.

- Tabla 5. Nomenclatura de las cepas de *Bacillus* sp. en el estudio.

CEPA	GÉNERO-ESPECIE	NOMBRE
Bp01	<i>Bacillus pumilus</i> nativo del suelo	BFH01
BpC01	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 4884	BFH02
BS01	<i>Bacillus sphaericus</i> nativo del suelo	BFH03
BSC01	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 4525	BFH04
BI07	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	BFH05
CH4	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH06
U2-01	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de plantas de cultivos de uchuva	BFH07
CH7B	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH08
BIO10	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	BFH09
TB2	<i>Bacillus subtilis</i> con actividad antagónica frente a <i>Fusarium</i>	BFH10
Control TB2	<i>Bacillus subtilis</i> con nativo del suelo	BFH11

Las muestras se encontraron congeladas en el caldo BHI y 10% de glicerol, mediante el procedimiento establecido por Sánchez y Corrales <sup>(17)</sup>. Se retiraron del congelador los viales que se hallaban a -70°C; y una vez descongelados, se

procedió a la recuperación de las cepas en caldo de enriquecimiento BHI, realizando una siembra con un asa estéril (Figura 4). Posteriormente, se llevó a incubación a 27°C por 24 horas.

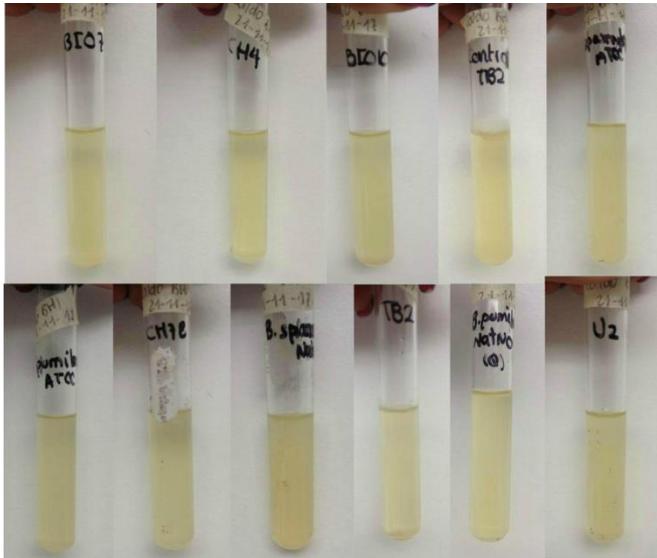


Figura 4. Cepas de *Bacillus* en caldo BHI. Realizado por investigadoras.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se hizo la siembra del contenido de los tubos a agar BHI (Anexo 1) por técnica de agotamiento y se llevaron a incubación a 27°C por 24 horas. Después se verificó cada una de las siembras en el agar BHI para analizar la pureza y viabilidad de cada una de las cepas utilizadas, observándose las características macroscópicas de las colonias y características microscópicas a través de coloración de Gram (Anexo 2).

Finalmente, se verificó en cada cepa de *Bacillus* su comportamiento bioquímico mediante pruebas bioquímicas en tubo para bacilos Gram positivos.

#### **4.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal**

### - Obtención de biomasa quitinolítica de *B. pumilus* y *B. subtilis*

Se realizó un medio de cultivo mínimo de sales con quitina (MMQ) y un medio de cultivo únicamente con quitina (MQ) para evaluar la actividad quitinolítica por parte de las cepas de *Bacillus* sp. usando el protocolo propuesto en el 2015 por Cristancho, González, y Buitrago <sup>(18)</sup>.

Para la preparación del medio de cultivo mínimo de quitina (MMQ) se implementaron sales minerales (Anexo 3) que aportan cofactores importantes para el buen crecimiento y desarrollo de la bacteria. El medio quitina (MQ) (Anexo 4) se realizó con el fin de verificar y confirmar la capacidad del microorganismo de utilizar la quitina como única fuente de energía.

Cada una de las cepas correspondiente a *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* fue sembrada por técnica de agotamiento e incubadas a 27°C durante 24, 48 y 72 horas para evaluar el crecimiento que presentaban y seleccionar entre ambos medios, el más adecuado para el mantenimiento de las cepas hasta la fase experimental de los bioensayos.

La valoración de crecimiento se realizó cualitativamente como se observa en la tabla 6.

- Tabla 6. Escala de valoración de crecimiento

<b>No crecimiento</b>	(-)
<b>Crecimiento escaso</b>	(+)
<b>Crecimiento Moderado</b>	(++)
<b>Crecimiento abundante</b>	(+++)

Se realizó tinción de Gram a las 72 horas para verificar el desarrollo de las

cepas en los medios de cultivo y descartar contaminación por otras bacterias.

**- Obtención de biomasa con capacidad de producción de endospora terminal de *B. sphaericus*:**

Se manejó el protocolo propuesto por Calderón, González y Parra <sup>(19)</sup> para la realización de un medio de cultivo que permite un rendimiento óptimo de *Bacillus sphaericus* en cuanto a producción de biomasa y esporas. Según este protocolo, el medio de cultivo GTA (garbanzo-trigo-arveja) permitió la obtención de una buena cantidad de esporas (endospora terminal) y de biomasa por parte de la cepa. Para la preparación, se dejaron en remojo cada uno de los sustratos: garbanzo, trigo y arveja (Figura 5) 13 horas previas a la elaboración del medio; posteriormente se licuaron, para lograr una consistencia homogénea. Luego se añadieron los sustratos, las sales y el agar-agar (Anexo 5).



Figura 5. Sustratos medio GTA. Realizado por investigadoras.

El medio de cultivo se dejó en refrigeración durante 24 horas con el fin de que adquiriera una mejor consistencia. Se realizó la siembra de las dos cepas de *Bacillus sphaericus* (BFH03 y BFH04) que se llevaron a incubación por 24

horas a 27°C y posteriormente se realizó coloración de Schaeffer Fulton para la visualización microscópica de la endospora terminal de las cepas.

### **4.3 Fase 3: Realización de bioensayos de biomasa bacteriana vs concentrados de huevos de *Fasciola hepatica*:**

#### **- Recolección de muestras fecales**

En este estudio se utilizaron 30 muestras de materia fecal en ovinos, provenientes de una finca, ubicada en el municipio de Concepción, Santander.

La toma de muestra fue directamente tomada del ano de la oveja, para evitar posibles contaminaciones con nemátodos de vida libre.

El protocolo que se realizó para la toma de muestra fue el siguiente: 1. Con un guante de plástico se introdujo un dedo en la ampolla rectal del animal. 2. Se extrajo la muestra directamente. 3. Una vez tomada la muestra, se reversó el guante. 4. Se cerró con un nudo eliminando la mayor cantidad de aire dentro de este, a fin de reducir la concentración de oxígeno y evitar la eclosión de los huevos presentes en la muestra<sup>(23)</sup>.

#### **- Obtención y recuperación de huevos de *Fasciola hepatica*.**

Se realizó la técnica parasitológica de sedimentación rápida (Anexo 6) a las 30 muestras obtenidas, con el fin de conocer si las muestras eran positivas o negativas para detectar *Fasciola hepática*.



Figura 6: Pesaje muestras.  
Realizado por investigadoras.



Figura 7: Proceso de sedimentación.  
Realizado por investigadoras.



Figura 8: Sedimento final de las muestras en tubos Falcon. Realizado por investigadoras.

Luego de identificar las muestras positivas para este parásito, se formó un pool para ser trabajado. Este pool de muestras fue conservado a una temperatura de 4°C en una bolsa, con la menor cantidad de oxígeno adentro para evitar la eclosión de los huevos.

Posteriormente, se realizó un análisis coprológico a través de la técnica parasitológica de sedimentación rápida. Con el fin de llevar a cabo un recuento de huevos por gramo.

## -Realización de bioensayos

La elaboración de los bioensayos se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Genético Animal, en el Instituto de Genética, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Con el fin de evaluar la actividad de las cepas quitinolíticas *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* y las cepas productoras de endospora terminal de *Bacillus sphaericus* frente a los huevos de *Fasciola hepatica* tomados de muestras de heces fecales de ovinos se realizaron un total de 105 bioensayos distribuidos de la siguiente manera:

- Control positivo: Huevos de *Fasciola hepatica* frente un antihelmíntico comercial (3 tubos de concentrado de huevos con albendazol) (Figura 9)
- Control negativo: Huevos de *Fasciola hepatica* sin ninguna adición (3 tubos solamente con el concentrado de huevos) (Figura 10)
- Tratamiento con las cepas: (3 tubos de concentrado de huevos con cada cepa de *Bacillus* sp) (Figura 11)
- Huevos más biomasa en agar quitina (MQ) de las cepas BFH-01, BFH-02, BFH-05, BFH-06, BFH-07, BFH-08, BFH-09, BFH-10 pertenecientes a *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*.
- Huevos más biomasa en agar GTA de *Bacillus sphaericus* de las cepas BFH-03 y BFH-04.
- 



Figura 9. Concentrado de huevos con albendazol. Realizado por investigadoras.



Figura 10: Control negativo. Realizado por las investigadoras.



Figura 11: Concentrado de huevos con cada cepa de *Bacillus* sp. Realizado por investigadoras.

Cada uno de los bioensayos con las cepas se realizó en tres repeticiones, cada una con una respectiva suspensión 0.5, 1.0, y 2.0 en escala de McFarland (Figura 12). La concentración de bacterias para cada escala corresponde a la siguiente:

- Tabla 7. Estándares de la escala de McFarland usados para los bioensayos.

Standard McFarland	Recuentos de bacterias aproximados ( $\times 10^8$ )
0.5	1.5
1.0	3.0
2.0	6.0



Figura 12: Escalas 0.5, 1.0 y 2.0 de McFarland. Realizado por investigadoras.

Tanto el control positivo como el control negativo fueron realizados a 3 repeticiones cada uno, contando con un total de 105 tubos correspondientes al bioensayo. En cada tubo se le agregó 2 gramos de materia fecal + 2 ml de concentración McFarland. Las condiciones de incubación de los bioensayos fueron: temperatura: 27°C – tiempo de incubación: 10 días. La lectura se realizó al día 10.

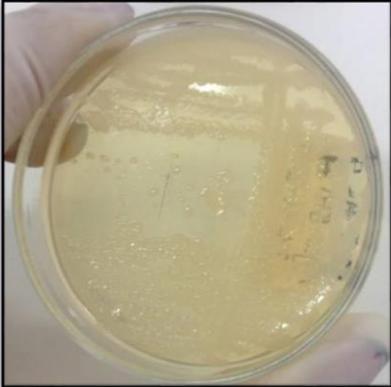
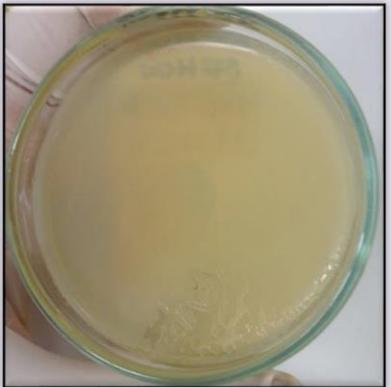
Finalizado el tiempo de incubación para cada lectura, a cada uno de los tubos se les realizó la técnica parasitológica de sedimentación rápida para llevar a cabo el respectivo conteo de huevos por gramo en cada uno de los tratamientos y observar, la viabilidad e integridad de los huevos en cada concentrado.

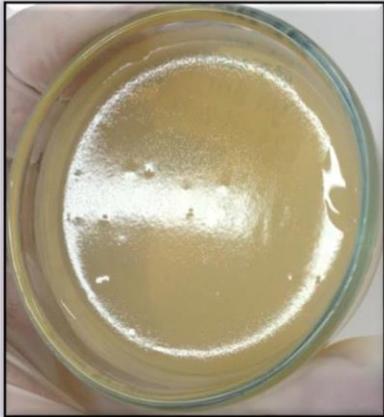
## 5. RESULTADOS

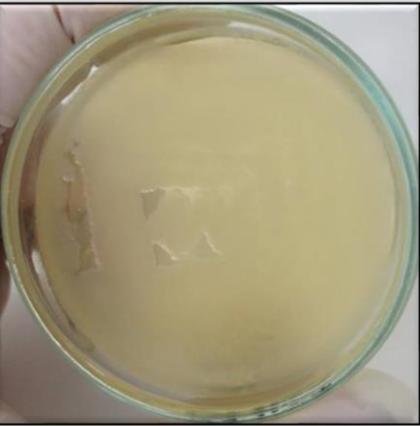
### 5.1 Fase 1: Evaluación de la pureza y viabilidad de las cepas de *Bacillus* sp. seleccionadas para el estudio.

En la tabla 8 se observan las características macroscópicas de las colonias obtenidas en el agar BHI. En general se obtuvo un buen crecimiento de todas las cepas con un solo tipo de colonia y con características definidas (Tabla 8).

- Tabla 8. Crecimiento de cepas de *Bacillus* sp en agar BHI post-incubación.

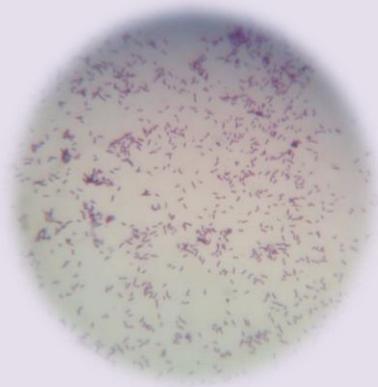
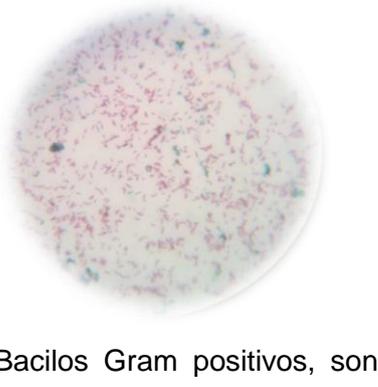
CEPA	CRECIMIENTO	CEPA	CRECIMIENTO
<b>BFH-01</b>	 <p>Colonias irregulares, pequeñas, planas, con bordes ondulados, blanquecinas, textura lisa y brillantes.</p>	<b>BFH-07</b>	 <p>Colonias irregulares, con bordes ondulados, planas, de textura lisa, opacas, de consistencia mucóide.</p>
<b>BFH-02</b>		<b>BFH-08</b>	

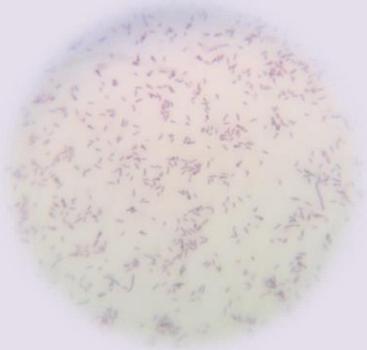
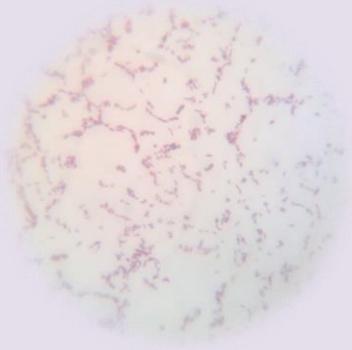
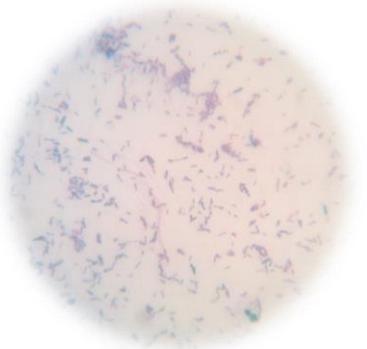
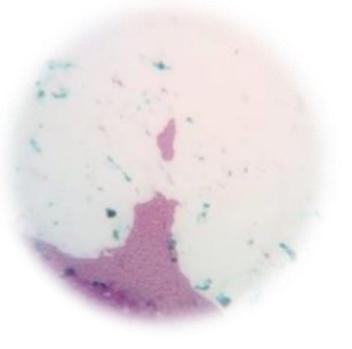
	Colonias irregulares, con bordes ondulados, planas, textura lisa y brillantes.		Colonias redondas, con bordes homogéneos, planas, presentan una textura lisa, brillantes y de consistencia mucóide.
<b>BFH-03</b>	 <p>Colonias irregulares, con bordes homogéneos, pequeñas, planas, textura lisa y brillantes.</p>	<b>BFH-09</b>	 <p>Colonias irregulares, blanquecinas, planas, de textura lisa, opacas.</p>
<b>BFH-04</b>	 <p>Colonias irregulares, pequeñas, con bordes ondulados, planas, textura lisa y brillantes.</p>	<b>BFH-10</b>	 <p>Colonias irregulares, presentan bordes homogéneos, son planas, opacas, consistencia rugosa.</p>

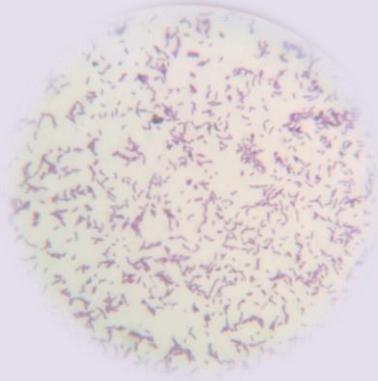
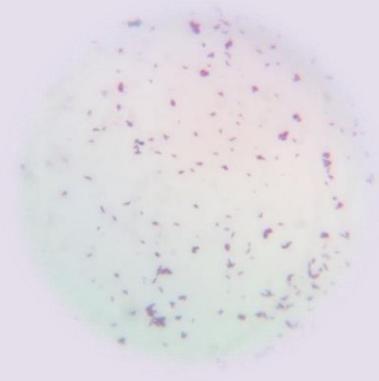
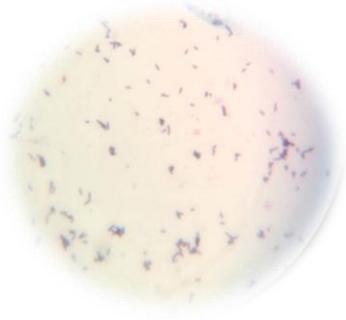
<p><b>BFH-05</b></p>	 <p>Colonias irregulares, grandes, presentan bordes ondulados, planas, con textura lisa, brillante y consistencia mucoide.</p>	<p><b>BFH-11</b></p>	 <p>Colonias irregulares, presentan bordes homogéneos, son planas, opacas, consistencia rugosa y color blanco.</p>
<p><b>BFH-06</b></p>	 <p>Colonias irregulares, grandes, presentan bordes ondulados, planas, de textura lisa, opacas y de consistencia mucoide.</p>		

Las características microscópicas de las cepas se visualizaron a través de tinción de Gram (Tabla 9). En general, se observaron Bacilos Gram positivos, con presencia de esporas terminales o sueltas o sin esporas.

- Tabla 9. Revisión microscópica en 100x, de cada una de las cepas, en frotis teñidos con Gram

CEPA	GRAM	CEPA	GRAM
<b>BFH-01</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, presentados individualmente, de aspecto corto y pequeño.</p>	<b>BFH-07</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos que tienden a asociarse en parejas, o cadenas, son muy grandes, gruesos y largos.</p>
<b>BFH-02</b>	 <p>Se ven bacilos Gram positivos, en forma de vara corta, y están de manera individual.</p>	<b>BFH-08</b>	 <p>Bacilos Gram positivos, son como varas pequeñas, cortas, están distribuidos de manera agrupada.</p>

<b>BFH-03</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos individuales medianos y presencia de esporas terminales, dando apariencia de raqueta por lo que se deforma el bacilo.</p>	<b>BFH-09</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos que tienden a asociarse en parejas, o cadenas, medianos, cortos.</p>
<b>BFH-04</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos individuales, algunos presentan formación de endospora la cual es visible ya que deforma el bacilo dando apariencia de raqueta, y además se ven esporas.</p>	<b>BFH-10</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, pequeños, cortos, gruesos agrupados.</p>

<p><b>BFH-05</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, cortos, los cuales están agrupados.</p>	<p><b>BFH-11</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos que tienden a asociarse en parejas, o de manera individual, pequeños, cortos.</p>
<p><b>BFH-06</b></p>	 <p>Se ven bacilos Gram positivos, pequeños algunos asociados en cadena.</p>		

Posteriormente, en la tabla 10, se observan los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para cada cepa.

- Tabla 10. Resultados Bateria para Bacilos Gram Positivos cepas de *Bacillus* sp.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11
TSI	A/K	A/K	K/K	K/K	A/A	A/A	A/K	A/K	A/A	A/A	A/A
CITRATO DE SIMMONS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BILIS ESCULINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALMIDÓN	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
MOTILIDAD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7,5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO NITRATOS	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
SACAROSA	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
GLUCOSA	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ARABINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XILOSA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MALTOSA	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
MANITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por las investigadoras.

## 5.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal

### - Obtención de biomasa quitinolítica de *B. pumilus* y *B. subtilis*

En la figura 13 se observó uno de los medios utilizados en el estudio. En las tablas 11 y 12 se presenta la valoración en escala cualitativa de crecimiento para cada una de las cepas en los medios MQ y MMQ a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

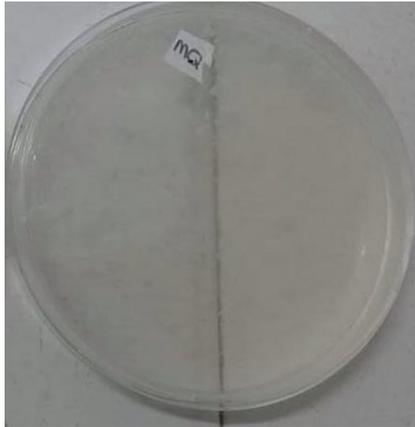


Figura 13. Medio quitina (MQ). Realizado por investigadoras.

- Tabla 11. Valoración de crecimiento en medio quitina (MQ)

CEPA	TIEMPO		
	24 horas	48 horas	72 horas
BFH-01	+	+	+
BFH-02	+	++	++
BFH-03	+	++	+++
BFH-04	+	++	+++
BFH-05	+	++	+++
BFH-06	+	++	+++
BFH-07	+	++	+++
BFH-08	+	++	+++
BFH-09	+	++	+++
BFH-10	+	++	+++
BFH-11	+	++	+++

- Tabla 12. Valoración de crecimiento en medio mínimo de quitina (MMQ)

CEPA	TIEMPO		
	24 horas	48 horas	72 horas
BFH-01	-	+	+
BFH-02	-	+	+

<b>BFH-03</b>	-	+	+
<b>BFH-04</b>	-	+	+
<b>BFH-05</b>	-	+	+
<b>BFH-06</b>	-	+	+
<b>BFH-07</b>	-	+	+
<b>BFH-08</b>	-	+	+
<b>BFH-09</b>	-	+	+
<b>BFH-10</b>	-	+	+
<b>BFH-11</b>	-	+	+

La tinción de Gram a las 72 horas de incubación evidenció población bacteriana única compatible con Bacilos Gram positivos con características microscópicas observadas para cada una de las cepas.

**- Obtención de biomasa con capacidad de producción de endospora terminal de *B. sphaericus*:**

Una vez realizado el medio GTA (Figura 14), y posterior a la siembra de las cepas correspondiente a *Bacillus sphaericus* (BFH-03 y BFH-04). En la tabla 13 se presenta la valoración en escala cualitativa de crecimiento para cada una de las cepas en el medio mencionado.



Figura 14: Medio GTA. Realizado por investigadoras

- Tabla 13. Valoración cualitativa en medio GTA

CEPA	TIEMPO		
	24 horas	48 horas	72 horas
BFH-03	++	+++	+++
BFH-04	++	+++	+++

### 5.3 Fase 3: Realización de bioensayos de biomasa bacteriana vs concentrados de huevos de *Fasciola hepatica*:

#### - Recolección de muestras fecales

En la tabla 14 se observan los resultados de recuentos de huevos por gramo en el pool de muestras, del cual se realizaron tres lecturas y obtener un promedio con el fin de saber cuántos huevos por gramo, hay en cada tubo.

- Tabla 14. Recuento de huevos por gramo del pool de muestras

LECTURA	Hpg
1	19
2	20
3	19

Se realizó un promedio de las tres lecturas dando como resultado, 19hpg

#### -Realización de bioensayos

En la tabla 15, se observan los resultados para el control negativo (sin tratamiento) y control positivo (tratamiento con el antihelmíntico albendazol).

- Tabla 15. Resultados de recuento de huevos por gramo de los controles positivo y negativo.

Recuento de controles de huevos por gramo		
CONTROL	Hpg	MEDIA
NEGATIVO	23	19.6
	21	
	15	
POSITIVO	5	3
	3	
	1	

En la tabla 16, se evidencian los recuentos de huevos por gramo realizados post-incubación en el día 10 con los tratamientos de las cepas sobre los concentrados en cada una de las suspensiones

- Tabla 16. Resultados de recuento de huevos por gramo, día 10.

Recuento de huevos por gramo por suspensión en escala McFarland						
CEPA	0.5	MEDIA	1.0	MEDIA	2.0	MEDIA
BFH-01	11	9	5	7.3	9	5
	8		11		2	
	8		6		4	
BFH-02	4	7	1	2.6	2	4.3
	12		4		7	
	5		3		4	
BFH-03	3	3.6	1	6.3	7	6.3
	7		13		2	
	1		5		10	
BFH-04	3	5.3	3	4.3	2	4
	7		5		3	
	6		5		7	
BFH-05	1	3	6	3	2	1.6

	3		1		2	
	5		2		1	
<b>BFH-06</b>	2	<b>2.3</b>	10	<b>8</b>	7	<b>5</b>
	3		8		3	
	2		6		5	
<b>BFH-07</b>	7	<b>6.6</b>	19	<b>11.3</b>	6	<b>6.3</b>
	9		8		3	
	4		7		10	
<b>BFH-08</b>	1	<b>7.6</b>	4	<b>4.6</b>	4	<b>3</b>
	15		1		3	
	7		9		2	
<b>BFH-09</b>	3	<b>7.3</b>	7	<b>5.6</b>	3	<b>6.3</b>
	9		3		8	
	10		7		8	
<b>BFH-10</b>	5	<b>3.3</b>	11	<b>6</b>	11	<b>9.3</b>
	1		5		8	
	4		2		9	
<b>BFH-11</b>	6	<b>6.6</b>	6	<b>7.3</b>	4	<b>6.3</b>
	8		7		5	
	6		9		10	

La actividad de las cepas de *Bacillus* sp. sobre los huevos de *Fasciola hepatica*, se evaluó mediante el porcentaje de reducción. Este porcentaje se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$100 \times (1 - (\text{huevos con tratamiento} / \text{huevos sin tratamiento}))$$

En la tabla 17, se evidencia los resultados obtenidos de porcentaje de reducción de huevos por tratamiento con cada cepa, en la tabla 18 se evidencia los resultados obtenidos de porcentaje de reducción de huevos por tratamiento con Albendazol.

El porcentaje más alto se obtuvo con la cepa quitinolítica BFH-05, que corresponde a *Bacillus subtilis* con porcentaje de reducción de 87.1% en promedio por bacteria, 84.7% para la suspensión 0.5, 84.7% para la suspensión 1.0 y 91.8% para la suspensión 2.0 de McFarland. El siguiente porcentaje más alto fue por la cepa con producción de biomasa de endosporas, BFH-04 la cual corresponde a *B. sphaericus* ATCC, con porcentaje de reducción de 76.9% en promedio por bacteria, 73% para la suspensión 0.5, 78.1% para la suspensión 1.0 y 79.6% para la suspensión 2.0 de Mac Farland. Sugiriendo de esta forma que las cepas con producción de ambas biomasas tienen gran actividad ovicida en el ensayo.

- Tabla 17. Resultados de porcentaje de reducción por suspensión y por bacteria.

**Porcentaje de reducción de huevos por tratamiento con *Bacillus* sp. (%)**

CEPA	0.5	1.0	2.0
BFH-01	54.1	62.8	74.5
BFH-02	64.3	86.7	78.1
BFH-03	81.6	67.9	67.9
BFH-04	73	78.1	79.6
BFH-05	84.7	84.7	91.8
BFH-06	88.3	59.2	74.5
BFH-07	66.3	42.3	67.9
BFH-08	61.2	76.5	84.7
BFH-09	62.8	71.4	67.9
BFH-10	83.2	69.4	52.6
BFH-11	66.3	62.8	67.9

- Tabla 18. Resultados de porcentaje de reducción por tratamiento con Albendazol.

Porcentaje de reducción de huevos por tratamiento con Albendazol (%)	
Control positivo: Albendazol	84.7

La actividad de la biomasa bacteriana de las cepas sobre los huevos de *Fasciola hepatica* también se valoró mediante la observación microscópica de la viabilidad de los huevos. En la tabla 19, se pueden observar las diferencias entre huevos del control negativo (sin tratamiento) y huevos del control positivo (huevos tratados con albendazol).

- Tabla 19. Revisión microscópica de los huevos post-tratamiento con los controles.

Revisión microscópica de los huevos controles		
Control positivo: Albendazol		Huevos con adelgazamiento de cutícula, alteración morfológica, siendo no viables.
Control negativo		Huevos viables, ovoides, con características morfológicas definidas.

Al realizar la revisión microscópica de los huevos post-tratamiento con las cepas de *Bacillus* sp., pueden observarse cambios morfológicos en los huevos,

que indican que no son viables. En la tabla 20, se describen las características microscópicas al observar los concentrados de huevos post-tratamiento.

- Tabla 20. Revisión microscópica de los huevos post-tratamiento con las cepas bacterianas

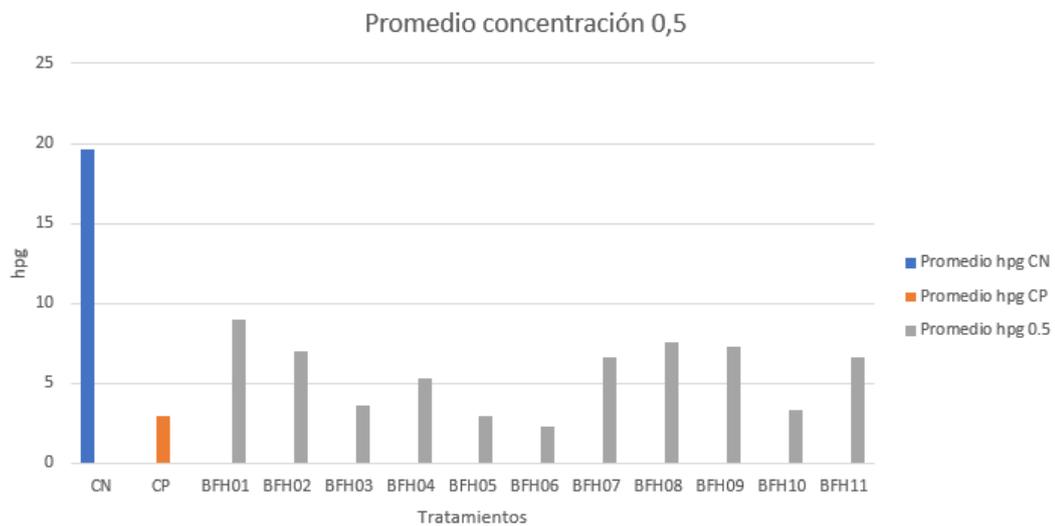
Revisión microscópica de los huevos post tratamiento con las cepas de <i>Bacillus</i> sp		
CEPA	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
BFH-01		Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido.
BFH-02		Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial de su contenido.
BFH-03		Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento o pérdida total de cutícula y aclaramiento en sus mórulas.

<b>BFH-04</b>		<p>Huevos amorfos, presentan adelgazamiento de cutícula y aclaramientos de cutículas. Algunos, presentan pérdida parcial de su contenido.</p>
<b>BFH-05</b>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido.</p>
<b>BFH-06</b>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido y disminución en su tamaño</p>
<b>BFH-07</b>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido, y ruptura de cutícula.</p>

<p><b>BFH-08</b></p>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial.</p>
<p><b>BFH-09</b></p>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento de cutícula, aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido y pérdida de su opérculo.</p>
<p><b>BFH-10</b></p>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento o pérdida total de cutícula y aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan apertura de su opérculo.</p>
<p><b>BFH-11</b></p>		<p>Huevos amorfos, presentan un adelgazamiento o pérdida total de cutícula y aclaramiento en sus mórulas. Algunos presentan pérdida parcial o total de su contenido y ruptura de su cutícula.</p>

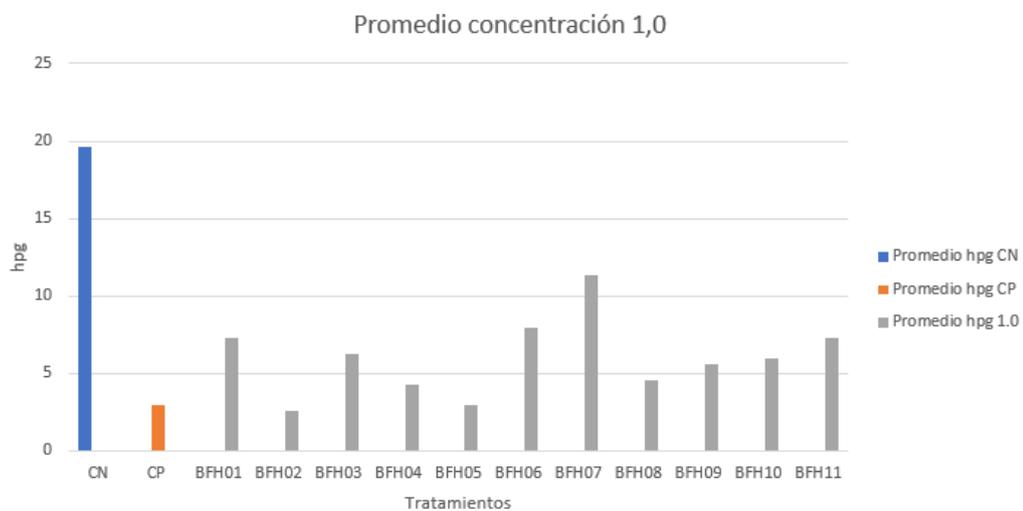
En la tabla 21, se puede observar que en relación con el control negativo todas las cepas lograron disminuir la concentración de huevos por gramo presentes en los tratamientos. Con relación al control positivo que se presumía sería el más efectivo, se pudo apreciar que la cepa BFH-06 redujo en mayor cantidad la concentración de huevos presentes mostrando una mayor actividad ovicida que este, seguida por BFH-05 que mostró la misma efectividad que el control positivo. BFH-03 y BFH-10 mostraron también gran efectividad, pero sin lograr superar al control positivo. Por su parte, las demás cepas obtuvieron menor disminución siendo sus números muy similares entre ellas, sin embargo, BFH-01 la menos efectiva.

- Tabla 21. Promedio de huevos por gramo en concentración 0.5



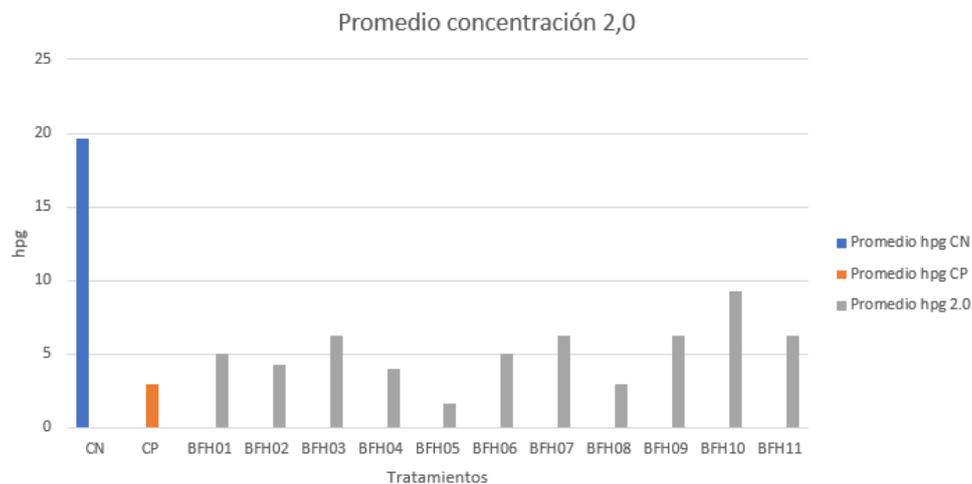
En la tabla 22, la concentración 1.0 se muestra que, con relación al control negativo, todas las cepas lograron disminuir la concentración de huevos por gramo presentes en los tratamientos. Con relación al control positivo que se presumiría el más efectivo, se pudo apreciar que la cepa BFH-02 mostró mayor efectividad, seguida por BFH-05 que evidenció una efectividad igual al control positivo. BFH-04 y BFH-08 que, si bien, no superaron al control positivo o lo igualaron, si mostraron una alta efectividad. Por otra parte, las demás cepas disminuyeron la cantidad de huevos por gramo. Sin embargo, mostraron menor efectividad, siendo la BFH-07 la menos eficiente.

- Tabla 22. Promedio de huevos por gramo en concentración 1.0



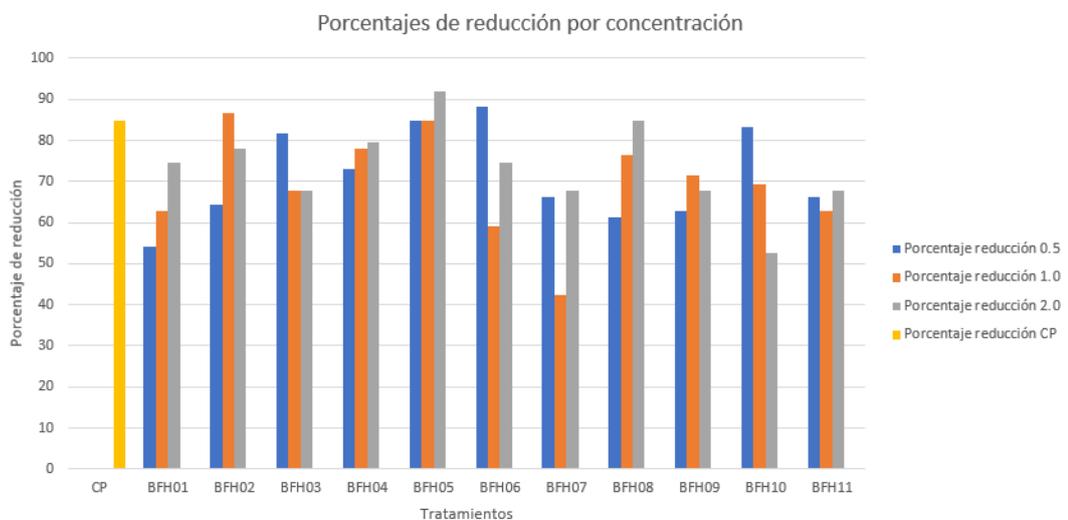
En la tabla 23, en la concentración 2.0 se puede observar respecto al control negativo que todas las cepas lograron disminuir la concentración de huevos por gramo presentes en los tratamientos. Con relación al control positivo que se presumía sería el más efectivo, se pudo apreciar que la cepa BFH-05 mostró mayor efectividad al momento de disminuir la cantidad de huevos por gramo presentes en el tratamiento, seguida por BFH-08 que tuvo la misma efectividad que el control positivo y BFH-04, BFH-02 y BFH-01 que mostraron también una disminución significativa. Las demás cepas mostraron menos efectividad, siendo la menos efectiva BFH-10.

- Tabla 23. Promedio de huevos por gramo en concentración 2.0



En la tabla 24, se puede evidenciar que en relación con el control positivo la mayoría de las cepas, independientemente de la concentración, mostraron un buen porcentaje de reducción de huevos por gramo. En el caso las cepas BFH-01, BFH-02, BFH-04, BFH-08 y BFH-09 la concentración 0.5 fue la que presentó menos efectividad, mientras que en las cepas BFH-06, BFH-07 y BFH-11 fue la concentración 1,0. La que evidenció menos efecto y el único caso en que la concentración 2.0 mostró menor efectividad en la reducción del porcentaje de huevos por gramo, fue en la cepa BFH-10. De esto se concluye, que la concentración 2.0 es la más efectiva, seguida por la 1.0 y finalmente la que menor reducción presenta es la 0.5.

- Tabla 24. Porcentajes de reducción por concentración



## 6. DISCUSIÓN

Fuentes M, en su estudio realizado en el 2006 describe como la fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* en varios países sudamericanos ubicados en las laderas del Andes ha sido reconocida como un importante problema de salud pública. Sin embargo, la importancia de este parásito ha sido descuidada hasta la última década. Países como Perú y Bolivia se consideran áreas hiperendémicas para la fasciolosis humana y animal, y otros países como Chile, Ecuador, Colombia y Venezuela también se ven afectados<sup>(51)</sup>. Por este motivo es importante en Colombia, a nivel de salud pública llevar a cabo un mejor manejo del tratamiento de la parasitosis por *Fasciola* en el ganado de producción y de la zoonosis que se puede generar.

Es inevitable que la producción de carne y productos lácteos tendrá que expandirse para satisfacer las demandas de un mundo en aumento de población. La producción eficiente de ganado rumiante es crucial para lograr este objetivo, especialmente en áreas en que la tierra no es apta para el cultivo <sup>(52)</sup>. Estudios en el Reino Unido estiman que el costo de las nematodosis parasitarias de las ovejas es aproximadamente de 99 millones de euros por año <sup>(53)</sup>, y en Suiza, el costo de la fasciolosis se ha estimado en 52 millones de euros por año en ganado solo <sup>(54)</sup>. Dentro de la Unión Europea en su conjunto, las ventas anuales de medicamentos antihelmínticos utilizados para controlar estas infecciones en los rumiantes se han estimado en el orden de 400 millones de euros <sup>(55)</sup>. El desarrollo y la implementación de enfoques innovadores para el control de parásitos, dirigidos a la escala regional apropiada, es un requisito previo para reducir la enorme carga de parasitismo por helmintos que se impone en la producción ganadera de rumiantes<sup>(56)</sup>. Una alternativa innovadora es el control biológico a partir de microorganismos como las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, quienes han sido ampliamente documentadas por su capacidad quitinolítica, producción

de endosporas, entre otras funcionalidades y además, esta alternativa sería especialmente útil como mecanismo para dar solución a la creciente preocupación por parte de la población a cerca de la cantidad de químicos presentes en los productos de origen animal que consumen y sus repercusiones para la salud. Adicionalmente, combatir la resistencia a antihelmínticos que se ha ido desarrollando en los recientes años a causa del uso indiscriminado de medicamentos, que además ha generado un aumento de las pérdidas económicas en la industria.

Estudios como el de Beesley N, Williams D, Paterson S, Hodgkinson J realizado en el año 2017 demuestran que altos niveles de diversidad genética, tienen posibles implicaciones en la resistencia a los antihelmínticos<sup>(57)</sup>. Otros estudios como el llevado a cabo en el 2012 por Daniel R, van Dijk J, Jenkins T, Akca A, Mearns R, Williams J, describen la resistencia al tricobendazol en huevos de *Fasciola hepatica* <sup>(58)</sup>. Igualmente, Álvarez M, Mainar R, García J, Vázquez F en 2006 documentaron la resistencia de *Fasciola hepatica* al tricobendazol y albendazol en ovejas en España <sup>(59)</sup>.

Castro *et al* en el 2011, refieren que la actividad quitinasa ha sido encontrada en numerosas bacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados y también puede servir como enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos <sup>(60)</sup>. Se conoce que la expresión de los genes de quitinasas en microorganismos es controlada por medio de un sistema inductor/represor el cual es inducido por la quitina, estimulando así la producción de quitinasas<sup>(61)</sup>.

Leguizamon A, Jara P., en el año 2016 analizaron el desarrollo de las cepas en los medios para producción de biomasa quitinolítica en medio mínimo de quitina (MMQ) y medio quitina (MQ), observaron el crecimiento y presencia de población bacteriana en los dos medios

implementados confirmadas mediante tinción de Gram, mostrando mayor crecimiento en el MQ (con quitina como único sustrato) que en el MMQ donde se le suministraban elementos esenciales como magnesio, nitrógeno y fósforo para permitir a las bacterias la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos<sup>(50)</sup>. En el año 2011, Tasharrofi N, Adrangie S, Fazelia M, Rastegarc H, Khoshayandd M, Faramarz M, buscaron, examinaron y optimizaron los factores más importantes que afectan la producción de quitinasas de *Bacillus pumilus*, donde se encontró que la producción de enzimas quitinolíticas se ve afectada por los intervalos de concentración de los compuestos MgSO<sub>4</sub> y FeSO<sub>4</sub> en el medio, donde pequeñas variaciones pueden dar efectos diferentes en el crecimiento del microorganismo <sup>(62)</sup>, lo cual se evidenció en nuestro estudio, donde hubo menor crecimiento en el medio MMQ, ya que pudo existir una variación mínima al pesar la cantidad de sales agregadas.

La quitina desempeña un papel importante en la formación de la cutícula del huevo actuando como una barrera importante para proteger a los parásitos de la infección por microorganismos patógenos. Enzimas como las quitinasas, debido a su alta actividad quitino-degradante, se han utilizado como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos, insectos y nemátodos <sup>(63)</sup>. En el presente estudio, 9 cepas con biomasa quitinolítica obtuvieron un porcentaje de reducción de huevos óptimo en cada tratamiento, alterándolos morfológicamente, haciéndolos posiblemente inviables, lo cual se pudo deber a la acción de las enzimas quitinasas y otras como lipasas y proteasas, ya que no se puede afirmar que únicamente el mecanismo usado para la digestión de los huevos haya sido el quitinolítico.

En el caso de las cepas utilizadas en el presente estudio, todas obtuvieron un porcentaje de reducción mayor al 55% de efectividad, confirmando lo documentado en el año 2016 por Tolba I, Magda N, que *Bacillus* sp es un agente eficaz en el control biológico, atribuido por la

producción de quitinasas, otras enzimas y metabolitos capaces de actuar contra los parásitos <sup>(64)</sup>.

Margino S, Behar C, Asmara W en 2012 evaluaron la acción de las quitinasas producidas por *Bacillus* sp frente al nemátodo de la papa *Globodera rostochiensis*, donde provocó una eclosión temprana de los huevos. Allí explican, que esto es posible debido a que la enzima ataca los huevos debido a su composición, consta de una capa interna lipídica, una capa de quitina, y la capa externa vitelina, por tanto, la quitinasa afecto la cutícula del huevo específicamente la quitina de este haciéndolo inviable para la eclosión <sup>(65)</sup>. Lo anterior se puede comparar con los resultados obtenidos en nuestro estudio, que se documenta en las imágenes, donde se observó alteración morfológica, consecuencia de quitinasas producidas por *B. pumilus* y *B. subtilis*, y al hacer una eclosión prematura en los huevos.

La presencia de endosporas le confiere al género *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas. Por lo anterior, la formación de endosporas resistentes al calor y disecación es una característica de importancia para la formulación de productos biotecnológicos a base de cepas de este género bacteriano <sup>(66)</sup>. Orberá T, Serrat M, González Z en el año 2009, realizaron la evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria del crecimiento que ejercen bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE) sobre hongos fitopatógenos aislados de plantas ornamentales. La actividad biocida se determinó mediante la coinoculación de los hongos y los aislados bacterianos en placas Petri con agar papa dextrosa Biocen. Se presentaron las curvas de inhibición del crecimiento para cada hongo y el control superior al 62% <sup>(67)</sup>. En correlación con nuestro estudio, la segunda cepa que obtuvo un mayor porcentaje de reducción en huevos fue *Bacillus sphaericus* ATCC 4525 (BFH 04), la cual tiene la capacidad de producir biomasa de endospora terminal, esto se pudo deber a que además de ser una estructura que

confiere resistencia, esta produce una inclusión cristalina, formada por la toxina binaria Bin, que está compuesta por dos proteínas BinA y BinB, que se cocrystalizan para formar una única inclusión paraesporal. BinB, el dominio conector, funciona como un determinante de especificidad, mientras BinA, el dominio tóxico, une BinB para amplificar su toxicidad<sup>(73)</sup>.

Por lo anterior, se puede evidenciar que la actividad de *Bacillus* como un biocontrolador ha sido ampliamente documentada, enfocándose en la actividad quitinolítica y su acción sobre los nemátodos. Sin embargo, aspectos como los son la actividad biocontroladora mediada por endosporas y su capacidad de acción contra tremátodos, como *Fasciola hepatica* no han sido estudiados a profundidad, ni documentados. Por lo tanto, este estudio deja un precedente para la investigación en estos dos campos, ya que la actividad que se obtuvo fue buena, llegando a superar en porcentaje de reducción y daños morfológicos en comparación con Albendazol, mostrando que la actividad de control biológico puede llegar a ser superior a los antihelmínticos utilizados convencionalmente para el tratamiento de esta parasitosis. Asimismo, las cepas productoras de endosporas mostraron muy buenos resultados, lo cual es interesante ya que en estudios anteriores realizados con estas cepas en otros parásitos como lo son los nematodos, como en el estudio realizado por Jara P, Leguizamón A en 2016, estas cepas no obtuvieron buenos resultados.<sup>(50)</sup> Es importante estudiar la razón de discrepancia en esta actividad.

*Bacillus* sp como controlador biológico sobre huevos de *Fasciola hepatica*, es una alternativa para la creciente resistencia que ha generado este parásito, su importancia en salud pública y preocupación que hay en la actualidad por los químicos encontrados en los productos de origen animal para consumo.

## 7. CONCLUSIONES

- Se pudo generar producción de biomasa quitinolítica en nueve cepas de *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* en los medios MQ y MMQ y producción de biomasa de endospora terminal en dos cepas de *Bacillus sphaericus* en medio GTA.
- Las 11 cepas de *Bacillus* utilizadas en el estudio obtuvieron un porcentaje de reducción mayor al 55% de efectividad, causaron daños morfológicos, haciendo posiblemente inviables los huevos de *Fasciola hepatica*, por medio de su actividad quitinolítica y de endospora terminal.
- El control positivo con albendazol con un 84.7% de reducción, fue superado por la actividad ovicida de la cepa BFH-05 *Bacillus subtilis* con un 87.1% de reducción. Esto hace que el control biológico con *Bacillus* sp. sea una buena alternativa sobre *Fasciola hepatica*.
- El control biológico con *Bacillus* sp, es una alternativa que puede ayudar a la reducción de parásitos en animales, contaminación ambiental, residuos químicos encontrados en los productos de origen animal y mitigar problemas en salud animal y salud pública.

## 8. RECOMENDACIONES

- Ampliar la investigación en control biológico sobre los tremátodos. Pudiendo hacer enfoque en la actividad biocontroladora de *Bacillus* sobre *Fasciola hepatica*, debido a que se obtuvo buenos resultados en este estudio
- Desarrollar metodologías que permitan evaluar el mecanismo por el cual la biomasa productora de endosporas de *Bacillus* realiza una acción inhibitoria en el desarrollo de huevos, ejerciendo una actividad biocontroladora.
- Generar bioensayos en los que se evalúe a *Bacillus* como controlador biológico en los hospederos intermediarios del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
- Generar estrategias para poder ensayar la actividad biocontroladora de *Bacillus* sp sobre los huevos de *Fasciola hepatica* in vivo.

## 9. REFERENCIAS

1. Tebit E. Natural Remedies in the Fight Against Parasites. IntechOpen. 2017. Disponible en: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/55437.pdf>
2. Reyes D, Padilla L, Grialdo I, Toro J, Mercedes M, Osorio C. Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el departamento del Quindío-Colombia 2012-2013. Infectio. 2014 [citado 15 Jul 2017];18(4):153-157. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.09.001>
3. Barrios C. Guía práctica de ovinocultura. enfocada hacia la producción de carne. BACOM Ltda. Bogotá, agosto de 2007. Documento PDF. [citado 13 octubre 2016]. Disponible en: <http://goo.gl/37YS6Z>
4. González D. Pequeños Rumiantes: Un Proyecto con Posibilidad de Rentabilidad. Conexión Agropecuaria JDC. 2011 [citado 15 Jul 2017]; 1(1):67-74. Disponible en: <file:///C:/Users/salatec35/Downloads/102-389-1-PB.pdf>
5. Toro A, Rubilar L, Palma C, Pérez R. Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. Archivos de medicina veterinaria. 2014. [citado 15 Jul 2017]; 46(2): 247-252
6. Herrera O, Ríos O, Zapata S. Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. Revista MVZ Córdoba. 2013. [citado 15 Jul 2017]; 18(3): 3851-3860.
7. Vázquez A, Bravo A, Mendoza P, Liébanos E, Hernández I, Yáñez N., et al. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa

- de control en nematodos de importancia veterinaria: Revisión. Rev. Mexicana de ciencias pecuarias. 2012. [citado 10 agosto de 2017]; 3(1): 77- 88.
8. Reyes O. La ganadería ovina vive su mejor momento en Colombia. Cg. 2013 [citado 20 Jul 2017] Disponible en <http://www.contextoganadero.com/reportaje/la-ganaderia-ovina-vive-su-mejor-momento-en-colombia>
  9. García T. Anatomía y fisiología del aparato digestivo de los rumiantes. Cg. [citado 20 Jul 2017] Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/manejo\\_del\\_alimento/02-anatomia\\_fisiologia\\_digestivo.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/02-anatomia_fisiologia_digestivo.pdf)
  10. Berrueta T. Trematodos. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2016 [citado 20 Jul 2017]. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trematodos.html>
  11. Miguel C, Francisco A, Antonio M. Parasitología Veterinaria. DPDx. 2000. [citado 22 Jul 2017] Disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
  12. Cuéllar A. Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016 [citado 22 Jul 2017] Disponible en <http://imap.borrego.com.mx/descargas/opciones.pdf>
  13. University of Wisconsin, Madison. Biological Control. Vegetable crop entomology [citado 01 agosto 2017] Disponible en <http://labs.russell.wisc.edu/vegento/ipm/biological-control/>

14. Mejía, A. Alternativa de control biológico de parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes: Hongos nematófagos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2014 [citado 01 agosto 2017] Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4120/Alternativadecontrolbiologicodeparasitos.pdf?sequence=1>
15. Contreras R. El género *Bacillus*. La guía de Biología. 2014 [citado 01 agosto 2017] Disponible en <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>
16. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. 2010 [citado 01 agosto 2017] Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
17. Sánchez L, Corrales L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Revista NOVA. 2005. [citado 20 diciembre del 2017]; 3(4). Disponible en: <http://goo.gl/JaHd8U>
18. Cristancho S, González C, Buitrago M. Desarrollo de un medio de cultivo para valorar el crecimiento de microorganismos de género *Bacillus* reportados como productores de quitinasas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2015. [citado 20 diciembre del 2017] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
19. Calderón M, Gonzalez L, Parra N. Desarrollo de un medio de cultivo para la producción de biomasa y esporas de *Bacillus sphaericus* como alternativa de control biológico sobre *Tuta absoluta* y *Plutella xylostella*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2014. [citado 20

diciembre del 2017]. Disponible en:  
[http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001507580](http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001507580)

20. Mansfield H, Gamble R, Fetterer H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*. Structural components. *Comp. Biochem.* [citado 20 diciembre del 2017];103B (3): 681-686. Disponible en:  
<http://goo.gl/EnZUld>
21. Kelley J, Timothy P, Travis E, Glenn A, Skuce P, Spithill T. Comparative Proteomic Analysis of Triclabendazole Response in the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. Liverpool School of Tropical Medicine. 2016. [citado 8 de febrero del 2018] Disponible en:  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/pr1000785>
22. Pérez X, Montoya D. Formación de endosporas en *Clostridium* y su interacción con el proceso de solventogénesis. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. *Revista colombiana de biotecnología*. 2013. [citado 10 febrero de 2018] Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a20.pdf>
23. Velasco L. Efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas y del polvo de aceituna en la inactivación de *Bacillus cereus* en una bebida de vegetales. Pontificia Universidad Javeriana. 2009. [citado 10 febrero de 2018] Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis201.pdf>
24. Ruiz J. La quitina. *Revista Investigación y Ciencia*. 1993. [citado 9 Julio de 2018]. Disponible en:  
<https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/ondas-ssmicas-73/la-quitina-5023>

25. Gutiérrez E, Mármol Z, Paéz G, Rincón M. Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU. 2012. [citado 9 Julio de 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/235431334\\_Quitina\\_y\\_Quitosano\\_polimeros\\_amigables\\_Una\\_revision\\_de\\_sus\\_aplicaciones](https://www.researchgate.net/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones)
26. Castro R, Álvarez A, Machado A, Mendoza M, Gómez R, García P. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. Revista Scielo. 2011. [citado 9 Julio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v77n2/a02v77n2.pdf>
27. Hamid R, Khan M, Ahmad M, Ahmad M, Abdin, M, Musarrat J, et al. Chitinases: An update. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences. 2013; 5(1), 21–29. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>
28. K. Morabbi Heravi, A. Shali, N. Naghibzadeh, G. Ahmadian. Characterization of cis-acting elements residing in the chitinase promoter of *Bacillus pumilus* SG2. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014; 30 (5):1491-1499
29. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. 2010. [citado 10 febrero de 2018] Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
30. Hidalgo C. Selección y caracterización de la patogenicidad de una cepa de *Bacillus pumilus* activa contra la mosca de la fruta de Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). 2010. [citado 10 febrero de 2018] Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/19225647.pdf>

31. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO. 2003.
32. Brennan G, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy M, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol.* 2007; 82:104–9.
33. Boray J, Crowfoot P, Strong M, Allison J, Schellenbaum M, von Orelli M, et al. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec.* 1983; 113:315–7.
34. Overend D, Bowen F. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J.* 1995; 72:275–6.
35. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol.* 2011; 178:364–6.
36. Mitchell G, Maris L, Bonniwell M. Triclabendazole resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec.* 1998; 143:399.
37. Moll L, Gaasenbeek C, Vellema P, Borgsteede F. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2000; 91:153–8.
38. Roos M, Kwa M, Grant W. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Today.* 1995; 11:148–50.

39. Coles G, Bauer C, Borgsteede F, Geerts S, Dlei T, Taylor M, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *VetParasitol.* 1992; 44:35–44.
40. Martínez M, Famularo M, Fernández N, Cordero C, Castañón L, Rojo F. Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. *Parasitol Res.* 2012; 10:2083–7.
41. Martínez M, Martínez J, Robles D, Cordero C, Famularo M, Fernández N, et al. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *VetParasitol.* 2013; 191:177–81.
42. Whitlock H, Kelly J, Porter C, Griffin D, Martin I. In vitro screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *VetParasitol.* 1980; 7:215–32.
43. Álvarez L, Moreno G, Moreno L, Ceballos L, Shaw L, Fairweather I, et al. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *VetParasitol.* 2009; 164:211–6.
44. Fairweather I, McShane D, Shaw L, Ellison S, O'Hagan N, York E, et al. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *VetParasitol.* 2012; 183:249–59.
45. Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta trópica.* 2003. [citado 10 de febrero de 2018] 88(3), 177-186. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.05.001>

46. Márquez D. Nuevas Tendencias para el Control de los Parásitos de Bovinos en Colombia: Corpoica. 2003. [citado 10 de febrero de 2018] Disponible en: <https://goo.gl/0Cwf7B>
47. Rodríguez A. Mederos A, Ciappesoni G. Buenas prácticas de para recolección y traslado de materia fecal para examen coprológico. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. [citado 24 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://goo.gl/Lu1aSr>
48. Sixtos C. Procedimientos y técnicas para la realización de estudios coproparasitológicos. Revista Virbac. [citado 28 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://goo.gl/GYikvA>
49. Kennedy P, Dinks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. 2013; 11(1): 33-44
50. Leguizamón A, Jara P. Evaluación de la posible acción biocontroladora de *Bacillus* sp. sobre nemátodos en ovinos. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad Ciencias de la Salud. 2016.
51. Fuentes M. Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: review and update of an ongoing interdisciplinary Project. GeospatialHealth. 2006;1: 59-70.
52. Chiotti, QP, Johnston, T. Extending the boundaries of climate change research—A discussion on agriculture. J. Rural Stud. 1995; 11: 335–350.
53. Nieuwhof G, Bishop C. Costs of the major endemic diseases in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. Anim. Sci. 2005; 81: 23–29.

54. Schweizer G, Braun W, Deplazes D, Torgerson P. The economic effects of bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 2005; 157: 188–193.
55. Selzer P. Preface. In *Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery. From Molecular Targets to Drug Candidates*; Wiley-Blackwell: Hoboken, USA. 2009; 11–12.
56. Charlier J, van der Voort M, Hogeveen H, Vercruyse J. A novel tool to evaluate the economic importance of worm infections on the dairy farm. *Vet. Parasitol.* 2012; 184: 204–211.
57. Beesley N, Williams D, Paterson S, Hodgkinson J. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. *International Journal for Parasitology.* 2017; 47: 11–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.007>
58. Álvarez M, Mainar R, García J, Vázquez F. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.* 2006; 159: 424–425
59. Daniel R, van Dijk J, Jenkins T, Akca A, Mearns R, Williams J. A composite faecal egg count reduction test to detect resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. *Vet. Rec.* 2012; 171: 153. Disponible en: doi: 10.1136/vr.100588
60. Castro R, Álvarez A, Machado E, Mendoza M, Gómez R, García P. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev. Soc. Quím. Perú, Lima.* 2011; 77(2). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v77n2/a02v77n2.pdf>
61. Fortuna J. Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*, Tesis de maestría en ciencias en

biotecnología genómica, Instituto Politécnico Nacional. 2009; 22-30.  
Disponible en: [goo.gl/90up1q](http://goo.gl/90up1q)

62. Tasharrofi N, Adrangi S, Fazeli M, Rastegar H, Khoshayand M, Faramarzi M. Optimization of Chitinase Production by *Bacillus pumilus* Using PlackettBurman Design and Response Surface Methodology. *Iran J Pharm Res.* 2011; 10(4): 759–768. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813072/pdf/ijpr-10-759.pdf>
63. Chen, Lin *et al.* Enhanced nematocidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. *ScientificReports.* 2015; 5: 14395. Disponible en: DOI: 10.1038/srep14395
64. Tolbal, Magda N. Effect of Chitinase Producing Bacteria and Humate on Growth, Productivity and Root Knot Nematode Control of Flame Seedless Grapevines. *Nature and Science.* 2016;14(6). Disponible en: [http://www.sciencepub.net/nature/ns140616/01\\_30399nsj140616\\_1\\_14.pdf](http://www.sciencepub.net/nature/ns140616/01_30399nsj140616_1_14.pdf)
65. Margino S, Behar C, Asmara. Isolation and Purification of Chitinase *Bacillus* sp. D2 Isolated from Potato Rhizozfer. *Indonesia Journal of Biotechnology.* 2012; 17(1): 69-78.
66. Villareal M, Villa E, Cira L, Estrada M. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implication in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2018; 101-103.
67. Orberá T, Serrat M, González Z. Potentials of Aerobic Endospore Forming Bacteria (AEFB) for Biocontrol in Ornamental Plants. *Fitosanidad.* 2009; 3(2).
68. García C, Uribe N. Fasciolosis, zoonosis emergente y reemergente vista desde una dimensión ambiental (Revisión). *Revista VITAE.* 2013

69. Moghaddam A, Massoud J, Mahmoodi M, Mahvi A, Periago M, Artigas P *et al.* Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitol Res.* 2004; 94: 61-69.
70. Ashrafi K, Valero M, Massoud J, Sobhani A, Solaymani-Mohammadi S, Conde P, *et al.* Plant-borne human contamination by fascioliasis. *Am J TropMedHyg.* 2006; 75(2): 295–302.
71. Mailles A, Capek I, Ajana F, Schepens C, Ille D, Vaillant V. Commercial watercress as an emerging source of fascioliasis in Northern France in 2002: results from an outbreak investigation. *EpidemiolInfect.* 2006; 134: 942–945.
72. Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull WHO.* 1999; 77: 340-6.
73. Correa D, Rodriguez M. Evaluación de medios de cultivo a base de sustratos orgánicos para producir toxinas de *Bacillus sphaericus*. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad Ciencias de la Salud. 2011.

## ANEXOS

### Anexo 01. Composición Agar BHI

Se realizó el medio de cultivo BHI para evaluar la pureza y viabilidad de las cepas de *Bacillus* sp. seleccionadas.

COMPONENTE	CANTIDAD
Agar BHI	10.4 g
Agua destilada	200 ml

### Anexo 02. Tinción de Gram

1. Etiquetar las láminas portaobjetos por uno de sus extremos con los nombres de las cepas.
2. Preparar los frotis bacterianos a partir del medio de cultivo.
3. Fijar con calor (mechero).
4. Agregar cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (3 a 5 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
5. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
6. Agregar lugol en cantidad suficiente para cubrir la lámina (3 a 5 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
7. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordente.
8. Decolorar con alcohol acetona durante 30 segundos.
9. Lavar con agua para eliminar el exceso de disolvente.
10. Agregar fuscina de gram en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (3 a 5 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
11. Lavar con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
12. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
13. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.

### **Anexo 03. Composición Medio mínimo de sales con quitina (MMQ)**

El medio mínimo de sales con quitina, se desarrolló debido a que aporta cofactores importantes para el buen crecimiento y desarrollo de las cepas de *Bacillus* sp. Además se le agregó quitina para evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados de utilizar este componente para su crecimiento y energía. Como soporte para los nutrientes se le agregó Agar-Agar.

### **Anexo 04. Composición Medio con quitina (MQ)**

El medio de cultivo se realiza exclusivamente con quitina, para verificar y confirmar la capacidad de las cepas de *Bacillus* sp seleccionadas, para utilizar la quitina como su única fuente de energía. Como soporte para el crecimiento se le agregó Agar- Agar.

### **Anexo 05. Composición Medio GTA**

Se realizó el medio de cultivo GTA con sustratos naturales como garbanzo, lenteja y trigo, realizado para obtención de biomasa y endosporas terminales de *Bacillus sphaericus*.

### **Anexo 06. Sedimentación rápida**

Se realizó la técnica parasitológica de sedimentación rápida, que permitió un análisis coprológico y recuento de huevos por gramo (hpg)

1. Pesar 3-5 gramos de materia fecal fresca.
2. Homogenizar las heces con agua corriente en un tubo cónico de 50 ml de capacidad.
3. Trasvasar la mezcla a través de un tamiz de 150-200 micras, a una botella plástica de 1000 ml de capacidad. Completar el volumen con

agua, pasándolo a través del tamiz para mejorar la limpieza de la muestra.

4. Dejar sedimentar durante 20 minutos.
5. Decantar 800 ml del sobrenadante. Volver a completar con agua corriente hasta 500 ml y resuspender el sedimento, empleando con un agitador de vidrio.
6. Dejar sedimentar durante 20 minutos
7. Decantar 400 ml de sobrenadante. Trasvasar los 100 ml restantes a dos tubos Falcon de 50 ml.
8. Dejar sedimentar durante 20 minutos
9. Decantar 25 ml de sobrenadantes de cada tubo y mezclar los sedimentos de los tubos en uno solo.
10. Finalmente, resuspender el sedimento empleando la succión y evacuación con una pipeta Pasteur, inmediatamente coleccionar 1 ml de solución y llenar la cámara de Mac Master, para poder observar en el microscopio (4x/10x)
11. Leer 10 ml (10 cámaras Mac Master) para así informar la cantidad de huevos (huevos por gramo: hpg)

-Una muestra se considera positiva con la presencia de 1 huevo de *Fasciola hepatica*.

-Una muestra se considera negativa al leer 5 cámaras, sin observar ningún huevo de *Fasciola hepatica*.

## Anexo 07. Hoja de vida de las cepas utilizadas en el estudio

### BFH-01

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 107**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	ANGELA LOZA
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	ICA
DIRECCION	Carrera 41 # 17-3
TELEFONO	3122700
E-MAIL	angelalozas@icac.gov.co
FORMA DE ADQUISICION	DONACION POR CONTRATO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacterias gramulas
GENERO	Escherichia
ORIGEN - HABITAT	Cepas confirmadas por ICA
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bojana
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCESAMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en subcultivo liquido Cabel BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal

### BFH-02

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 108**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Freddy Alonzo Plaza Fonseca y Milton Tobo Fonseca
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 18 - 01
TELEFONO	3412000
E-MAIL	cmh@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	CONTRATA POR ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION A LA CCM-UCMC

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacterias gramulas ATCC 24469
GENERO	Staphylococcus
ORIGEN - HABITAT	Copa comprada en Implementaria Ltda por estudiantes - Loopo Microbiología
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Atenas CDC
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCESAMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en subcultivo liquido Cabel BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal

### BFH-03

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 101**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	ANGELA LOZA
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	ICA
DIRECCION	Carrera 41 # 17-3
TELEFONO	3122700
E-MAIL	angelalozas@icac.gov.co
FORMA DE ADQUISICION	DONACION POR CONTRATO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacterias gramulas
GENERO	Escherichia
ORIGEN - HABITAT	Cepas confirmadas por ICA
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bojana
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCESAMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en subcultivo liquido Cabel BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal

### BFH-04

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 106**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Lara Emerencia Lopez Fonseca y Cesar Eddy Hernandez Rodriguez
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 18 - 01
TELEFONO	3412000
E-MAIL	cmh@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	CONTRATA POR ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION A LA CCM-UCMC

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacterias gramulas ATCC 4312
GENERO	Staphylococcus
ORIGEN - HABITAT	Copa comprada en Implementaria Ltda por estudiantes - Loopo Microbiología
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Atenas CDC
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCESAMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en subcultivo liquido Cabel BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal
Agosto 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Liga Contreras Sanchez Leal

**BFH-05**

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCM**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARJO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 148**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Beltrán Detha y Beto Macy
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 28 - 02
TELEFONO	3418800
E-MAIL	caud@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	ASILADA POR LOS ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION AL CEPARJO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Bacillus subtilis</i> 2007
GENERO	<i>Bacillus</i>
ORDEN - FAMILIA	<i>Bacillus</i>
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Aislamiento de cultivos de <i>Bacillus pasteurii</i>
PRECISA - HORA DE AISLAMIENTO	Bogota
PRECISA - AÑO DE AISLAMIENTO	2007
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido Cabel RBE con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Mayo 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2013	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal

**BFH-06**

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCM**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARJO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 149**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Aguirre Vargas y Lisseth Soto
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 28 - 02
TELEFONO	3418800
E-MAIL	caud@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	ASILADA POR LOS ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION AL CEPARJO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Bacillus subtilis</i> 2007
GENERO	<i>Bacillus</i>
ORDEN - FAMILIA	<i>Bacillus</i>
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Aislamiento de chismosa de restaurantes de pollo
PRECISA - HORA DE AISLAMIENTO	Bogota
PRECISA - AÑO DE AISLAMIENTO	2008
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido Cabel RBE con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Mayo 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2013	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal

**BFH-07**

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCM**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARJO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 151**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Jorles Toledo y Anabela Rodriguez
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 28 - 02
TELEFONO	3418800
E-MAIL	caud@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	ASILADA POR LOS ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION AL CEPARJO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Bacillus pasteurii</i> 2011
GENERO	<i>Bacillus</i>
ORDEN - FAMILIA	<i>Bacillus</i>
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Aislamiento de platos de cultivos de alcornoque
PRECISA - HORA DE AISLAMIENTO	Bogota
PRECISA - AÑO DE AISLAMIENTO	2011
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido Cabel RBE con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Mayo 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2013	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal

**BFH-08**

  
**COLECCION DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCM**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - AREA CEPARJO**  
**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACION**

**CODIGO 147**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Estudiantes Aguirre Vargas y Lisseth Soto
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCION	Calle 20 No 28 - 02
TELEFONO	3418800
E-MAIL	caud@colegiomayor.edu.co
FORMA DE ADQUISICION	ASILADA POR LOS ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACION AL CEPARJO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Bacillus pasteurii</i> 2011
GENERO	<i>Bacillus</i>
ORDEN - FAMILIA	<i>Bacillus</i>
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Aislamiento de chismosa de restaurantes de pollo
PRECISA - HORA DE AISLAMIENTO	Bogota
PRECISA - AÑO DE AISLAMIENTO	2011
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido Cabel RBE con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Diciembre 2008	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Octubre 2009	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Mayo 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2012	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2013	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Enero 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal
Abril 2014	Sistema rigido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sanchez Leal

**BFH-09**

  
**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - ÁREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

**CODIGO 09**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	Emmanuel Esteban Irujo y Erika Irujo
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
DIRECCIÓN	Calle 30 No 19 - 02
TELÉFONO	2421000
E-MAIL	emmanuelirujoyerika@gmail.com
FORMA DE ADQUISICIÓN	ANEXADA POR LOS ESTUDIANTES PARA TRABAJO DE GRADO Y POSTERIOR DONACIÓN AL CEPARDO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacteria ácido láctico
GÉNERO	Lactobacillus
ORIGEN - HABITAT	Aislamiento de cubitos de Gelatina pectinosa
LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN	Características de las coliformas. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACIÓN	RESPONSABLE
Diciembre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abel 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led

**BFH-10**

  
**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - ÁREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

**CODIGO 10**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	ANGELA LORA
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	UCA
DIRECCIÓN	Carrera 41 # 27-4
TELÉFONO	3127700
E-MAIL	angelalora@uca.edu.co
FORMA DE ADQUISICIÓN	DONACIÓN POR CORRESPONDO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Bacteria ácido láctico
GÉNERO	Lactobacillus
ORIGEN - HABITAT	Cepas identificadas por Cepagan
LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN	Características de las coliformas. Pruebas bioquímicas

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACIÓN	RESPONSABLE
Diciembre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abel 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Enero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led

**BFH-11**

  
**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS - CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**LABORATORIO CENTRAL - ÁREA CEPARDO**  
**SISTEMA DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

**CODIGO 11**

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	EMMANUEL ESTEBAN IRUJO Y ERIKA IRUJO
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
DIRECCIÓN	Calle 30 No 19-02
TELÉFONO	2421000
E-MAIL	emmanuelirujoyerika@gmail.com
FORMA DE ADQUISICIÓN	DONACIÓN POR CORRESPONDO

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	Sistema mixotrofo
GÉNERO	Serratia
ORIGEN - HABITAT	25 Cepas aisladas por Secretaría de Salud Bogotá - Servicio Microbiología
LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA - HORA DE AISLAMIENTO	2009
PROCEDIMIENTO ESPECIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar McConkey
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -100°C en subcultivo líquido caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN	Pruebas bioquímicas en tubo. Sistema rápido BBL CRYSTAL y Sistema rápido CRYSTAL

FECHAS	TIPO DE CONFIRMACIÓN	RESPONSABLE
Junio 2009	Pruebas bioquímicas en tubo	Orlando Cordero
Noviembre 2009	Pruebas bioquímicas en tubo	Erika Irujo
Junio 2010	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Marzo 2010	Pruebas bioquímicas en tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Noviembre 2010	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abel 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Febrero 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Diciembre 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Octubre 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2014	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Julio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Noviembre 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Junio 2013	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Coronado Sánchez Led
Enero 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led
Abril 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Coronado Sánchez Led