



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TEMA:

**“EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Bacillus* spp TIPO SILVESTRE
VS *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ FRENTE A *Staphylococcus aureus*,
Escherichia coli y *Klebsiella* spp AISLADAS DE MASTITIS BOVINA”**

Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Médica Veterinaria, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Carrera de Medicina Veterinaria

AUTORAS:

Adriana Maribel Quincha Angulo
Mercy Alexandra Galeas Barragán

TUTOR:

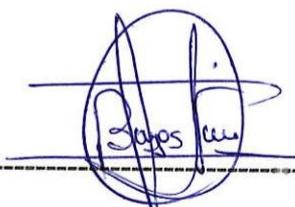
Dr. Favián Bayas Morejón Ph.D.

Guaranda – Ecuador
2023

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR

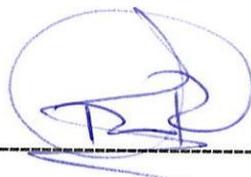
EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Bacillus spp* TIPO SILVESTRE VS
Bacillus subtilis ATCC® 6051™ FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* AISLADAS DE MASTITIS BOVINA.

REVISADO Y APROBADO POR:



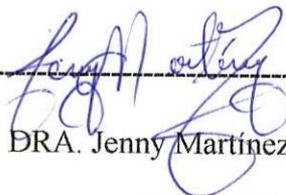
DR. Favián Bayas Morejón Ph.D.

TUTOR



DR. Edison Raveliño Ramón Curay M.Sc.

PAR LECTOR



DRA. Jenny Martínez Moreeira M.Sc.

PAR LECTORA



CERTIFICACIÓN DE AUTORIA

Yo, Adriana Maribel Quincha Angulo, con C.I. 0202287181 y Mercy Alexandra Galeas Barragan, con C.I. 0202425443, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

Adriana Maribel Quincha Angulo

C.I. 0202287181

AUTORA

Mercy Alexandra Galeas Barragan

C.I. 0202425443

AUTORA

DR. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN Ph.D.

TUTOR



Notaria Tercera del Cantón Guaranda
Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez
Notario



N° ESCRITURA: 20230201003P02637

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR: GALEAS BARRAGAN MERCY ALEXANDRA y

QUINCHA ANGULO ADRIANA MARIBEL

INDETERMINADA DI: 2 COPIAS

H.R. Factura: 001-006-000005064

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día veinticuatro de Noviembre del dos mil veintitrés, ante mi Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparece GALEAS BARRAGAN MERCY ALEXANDRA, soltera de ocupación estudiante, domiciliada en el Cantón San Miguel Provincia Bolívar y de paso por este lugar, con celular número (0994050947), su correo electrónico es alexandragaleas1999@gmail.com, y QUINCHA ANGULO ADRIANA MARIBEL, soltera de ocupación estudiante, domiciliada en el Cantón San Miguel Provincia Bolívar y de paso por este lugar, con celular número (0989570934), su correo electrónico es maribelquincha17@gmail.com, por sus propios y personales derechos, obligarse a quien de conocer doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruida por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertido de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguiente manifestamos que el criterio e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Bacillus spp* TIPO SILVESTRE VS *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* AISLADAS DE MASTITIS BOVINA" es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autoras, previo a la obtención del título de Médicas Veterinarias en la Universidad Estatal de Bolívar, Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que hacemos para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que le fue al compareciente por mí el Notario en unidad de acto, aquellas se ratifica quedando incorporada al protocolo de esta notaria y firma conmigo de todo lo cual doy Fe.

GALEAS BARRAGAN MERCY ALEXANDRA

C.C. 0202425443

MSC. AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

Notario Tercero

del Cantón Guaranda

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

QUINCHA ANGULO ADRIANA MARIBEL

C.C. 0202287181

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA

EL NOTA....

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis AdrianaQ&MercyG. (1).docx

AUTOR

Adriana y Mercy Quincha

RECUENTO DE PALABRAS

18253 Words

RECUENTO DE CARACTERES

102881 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

70 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

2.9MB

FECHA DE ENTREGA

Nov 21, 2023 5:20 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Nov 21, 2023 5:21 PM GMT-5

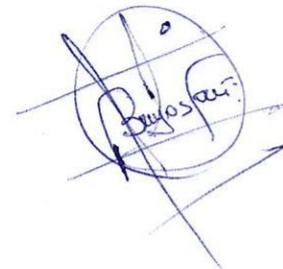
● **3% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base c

- 3% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossr

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Fuentes excluidas manualmente



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios por permitirme culminar y cumplir con la principal de mis más ansiadas metas, a mi familia en especial a mis adorados padres, puesto que sin ellos esto no hubiese sido posible, todos mis logros se los debo a ellos incluido este.

Adriana Maribel Quincha Angulo

Quiero ofrendar este trabajo a Dios por brindarme las herramientas para poder crecer profesionalmente, por permitirme encontrar y encaminarme paso a paso en mi propósito, igualmente dedico este arduo trabajo a mis padres, quienes han sabido ser incondicionales en cuanto apoyo moral, espiritual y material.

Mercy Alexandra Galeas Barragan

AGRADECIMIENTO

Con mucha alegría en estas líneas quiero expresar mis sinceros agradecimientos a todos mis seres queridos y personas a fines en la elaboración y culminación del presente trabajo de titulación.

Prioritariamente debo agradecerle a Dios por brindarme la efímera oportunidad de la vida, además de comprender que ha sido el quien me ha acompañado en este escarpado camino hacia mi meta profesional.

Mis sinceros agradecimientos a mi estimado padre Nelson Quincha y mi inefable madre Alicia Angulo, quienes para mi ha sido el apoyo y el soporte incondicional en todo momento y en las cosas más indispensables, a mis hermanos Alex, Elba, Jessica Quincha Angulo que me apoyan en lo que otras personas jamás me ayudarían, y a mis amigos en especial a mi amiga Alexandra Galeas con quien tuve el honor de compartir mi carrera universitaria y realizar esta tesis, ha sido un gran apoyo en este camino. Extiendo mis agradecimientos a mi alma mater la Universidad Estatal de Bolívar, la misma que con sus docentes, consiguieron formarme profesionalmente para obtener mi título de Médica Veterinaria.

Adriana Maribel Quincha Angulo

Expreso enormemente mis sentimientos de gratitud a Dios por asistirme en todo momento y guiarme en cada paso y meta cumplida, le agradezco por haberme concedido la fortuna de tener a los mejores padres Geovanny Galeas y Narcisa Barragán quienes han sido reflejo de amor, perseverancia, respeto y superación. A mis hermanos Rommel y Vanesa Galeas Barragán.

A mi incondicional y real amiga Adriana Quincha quien me ha brindado su amistad, confianza, apoyo y compañía en toda mi carrera universitaria, también agradezco a las prestigiosas autoridades de la Universidad Estatal de Bolívar, por fundamentar en mi el desarrollo personal y profesional.

Mercy Alexandra Galeas Barragan

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Pag.
CAPÍTULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. PROBLEMA.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. General.....	4
1.3.2. Específicos.....	4
1.4. HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO II.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Generalidades del órgano mamario de la vaca.....	6
2.2. Cisterna y conductos de la glándula mamarios.....	7
2.3. El pezón de la glándula mamaria.....	7
2.4. Paquete neurovascular de la glándula mamaria.....	7
2.5. Eyección de la leche.....	7
2.6. Protección del sistema mamario.....	8
2.7. Mastitis.....	10
2.8. Diagnóstico de la mastitis.....	11
2.9. Mastitis contagiosa.....	14
2.10. Mastitis ambiental.....	15
2.11. Etiología.....	16
2.12. Probiótico.....	33
2.13. Tratamiento de la mastitis.....	34
2.14. Metodologías para evaluar la actividad antibacteriana.....	34

2.15.	Espectrofotometría.....	38
CAPITULO III.....		39
3.	MARCO METODOLÓGICO.....	39
3.1.	UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	39
3.2.	Metodología	40
3.2.1.	Material experimental	40
3.2.2.	Factores en estudio.....	40
3.2.3.	Tratamientos	41
3.2.4.	Tipo de diseño	41
3.2.5.	Manejo del experimento	43
3.2.6.	Métodos de evaluación y datos a tomarse.....	45
3.2.7.	Análisis de dato.....	45
CAPÍTULO IV.....		46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	46
4.1.1.	Reanimación de cepas de Bacillus spp. tipo silvestre.....	46
4.2.	Estudio de varianza del efecto inhibitorio de los tratamientos en estudio de Bacillus frente patógenos comunes causantes de mastitis bovina.....	47
4.2.1.	Estudio de la susceptibilidad de Escherichia coli frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.....	50
4.2.2.	Estudio de la susceptibilidad de Klebsiella spp., frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.....	53
4.2.3.	Estudio de la susceptibilidad de Staphylococcus aureus frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.....	56

4.1.5. Estimación de la cinética de crecimiento de <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y a <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.	59
4.2. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	61
CAPÍTULO V	62
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
5.1. Conclusiones	62
5.2. Recomendaciones	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLA

N°	Detalle	Pag.
1.	Microorganismos bacterianos causantes de mastitis bovina.....	16
2.	Taxonomía de <i>E. coli</i>	17
3.	Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella</i> spp.	20
4.	Características patológicas de la <i>Klebsiella</i> spp.....	21
5.	Taxonomía del <i>S. aureus</i>	23
6.	Taxonomía del <i>Bacillus subtilis</i>	26
7.	Categoría interpretativa de la zona de inhibición del <i>Bacillus subtilis</i>	33
8.	Localización de la investigación.	39
9.	Situación geográfica del lugar de la investigación.....	39
10.	Descripción de la interacción de factores y tratamientos en estudio.	41
11.	Características numéricas del diseño.	42
12.	Paramétricas del Análisis de varianza (ANOVA).....	43
13.	Reanimación y caracterización de <i>Bacillus</i> spp., aislados de mastitis.....	46
14.	Estudio de la interacción de los tratamientos en estudio mediante diseño factorial con arreglo de tres factores.	47
15.	Comparativa de los promedios según Tukey al 5% de los valores registrados de las zonas de inhibición en cada interacción factorial.	48
16.	Susceptibilidad de <i>E. coli</i> causante de mastitis bovina frente a <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i>	50
17.	Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg contra <i>E. coli</i> que originan cuadros mastíticos.	52
18.	Resultados del promedio del área de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) contra <i>E. coli</i> que originan cuadros mastíticos.	52

19. Susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> spp., causante de mastitis bovina frente a <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.....	53
20. Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg contra <i>Klebsiella</i> spp que originan cuadros mastíticos.....	55
21. Resultados del promedio de halo de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) frente a <i>Klebsiella</i> spp.....	55
22. Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> causante de cuadros mastíticos contra <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.	56
23. Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg frente a <i>S. aureus</i> causante de mastitis bovina.	58
24. Resultados del promedio de halo de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) contra <i>S. aureus</i>	58
25. Frecuencias y Promedios de la interacción de la escala de la actividad antimicrobiana de <i>Bacillus</i> spp., en relación con el área inhibitoria.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Detalle	Pag.
1.	<i>Bacillus subtilis</i> y sus bondades.....	27
2.	Dendrograma basado en BLAST genómico del <i>Bacillus subtilis</i>	28
3.	Ruta metabólica acidogénica del <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.	Porosidad de la membrana y su relación en la retención de partículas	36
5.	Porcentaje de reanimación de <i>Bacillus</i> spp., en caldo MRS.....	46
6.	Medias marginales estimadas de las medidas de las áreas de inhibición (mm) de los tratamientos experimentados.	49
7.	Proporción de la susceptibilidad de <i>E. coli</i> causante de mastitis bovina, frente a <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.....	51
8.	Porcentaje de susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> spp., causante de mastitis bovina, frente a <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.	54
9.	Porcentaje de susceptibilidad de <i>S. aureus</i> causante de mastitis bovina, frente a <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051.....	57
10.	Curva de crecimiento de <i>Bacillus</i> spp., tipo silvestre y <i>Bacillus subtilis</i>	60
11.	Resumen de la comprobación de hipótesis planteadas en la presente investigación.	61

ÍNDICE DE ANEXOS

N°	Detalle
1.	Mapa de ubicación del lugar de investigación.
2.	Base de datos de los resultados obtenidos en la investigación.
3.	Fotografías de investigación.
4.	Glosario de términos.

RESUMEN

De las patologías en la producción de leche bovina de mayor impacto negativo se encuentra la mastitis bovina, la misma es considerada una fuente en la diseminación de agentes bacterianos con grandes características de resistencia a los antimicrobianos. El objeto de la investigación fue; evaluar la efectividad antimicrobiana de *Bacillus spp* tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™, contra *Staphylococcus aureus*, *E coli* y *Klebsiella spp* responsables de ocasionar mastitis bovina. Se realizó aplicando el método de difusión en pozos, considerando la interacción de tres factores, donde el factor A es el método de difusión (difusión directa y difusión del microfiltrado), el factor B el tipo *Bacillus* (*Bacillus subtilis* ATCC 6051 y *Bacillus spp.* tipo silvestre), y el factor C bacterias patógenos (*E coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella spp.*). obteniendo en los resultados que la bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6051 mediante el método de difusión directa expresó en las medidas de la zona de inhibición promedios de 16.60 mm, 20.40 mm y 20.40 mm con *E coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella spp.* respectivamente, versus a los resultados del método de difusión del filtrado que demostró promedios mayores con unas medidas de 20.80 mm, 29 mm y 24 mm contra a *E coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* y respectivamente, mientras que *Bacillus spp.*, en el método de difusión directa obtuvo medias en el área de inhibición comprendidas por 0.60 mm, 0.80 mm y 6.40 contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* y *E coli* individualmente, además en el procedimiento de difusión del filtrado se obtuvo medias en el área de inhibición de 5 mm, 9 mm y 11.60 mm contra cepas de *E coli*, *Klebsiella* y *Staphylococcus aureus* equitativamente, además en la estimación de la curva de crecimiento analizada se evidenció una marcada diferencia en las fases de crecimiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6051 versus al *Bacillus spp.*, tipo silvestre, destacando que la patente ATCC6051 posee mayor capacidad de crecimiento en la fase exponencial versus al *Bacillus spp.*, de tipo silvestre, dicha diferencia esta determinada por la capacidad metabólica de cada una de los *Bacillus*. observando que *Bacillus subtilis* ATCC 6051 expresó mayor capacidad antimicrobiana frente a las bacterias en estudio.

Palabras clave: Mastitis, Kirby-Bauer, Difusión, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, Curva de Drecimiento.

SUMMARY

Among the pathologies in bovine milk production with the greatest negative impact is bovine mastitis, which is considered a source in the dissemination of bacterial agents with great characteristics of resistance to antimicrobials. The purpose of the research was to evaluate the antimicrobial effectiveness of *Bacillus* spp wild type vs *Bacillus subtilis* ATCC 6051. against *Staphylococcus aureus*, *E coli* and *Klebsiella* spp responsible for causing bovine mastitis. It was carried out by applying the diffusion method in wells, considering the interaction of three factors, where factor A is the diffusion method (direct diffusion and microfiltrate diffusion), factor B the *Bacillus* type (*Bacillus subtilis* ATCC 6051 and *Bacillus* spp. wild type), and factor C pathogenic bacteria (*E coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* spp.). obtaining in the results that the bacterium *Bacillus subtilis* ATCC 6051 by means of the direct diffusion method expressed in the measurements of the inhibition zone averages of 16.60 mm, 20.40 mm and 20.40 mm with *E coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* spp. respectively, versus the results of the filtrate diffusion method which showed higher averages with measurements of 20.80 mm, 29 mm and 24 mm against *E coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* and respectively, while *Bacillus* spp, in the direct diffusion method obtained averages in the inhibition area comprised by 0.60 mm, 0.80 mm and 6.40 against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* and *E coli* individually, also in the filtrate diffusion procedure averages in the inhibition area of 5 mm, 9 mm and 11. 60 mm against strains of *E coli*, *Klebsiella* and *Staphylococcus aureus* equally, also in the estimation of the growth curve analyzed a marked difference in the growth phases of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 versus the *Bacillus* spp, The difference was determined by the metabolic capacity of each of the *Bacillus*. It was observed that *Bacillus subtilis* ATCC 6051 expressed greater antimicrobial capacity against the bacteria under study.

Key words: Mastitis, Kirby-Bauer, Diffusion, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, Growth Curve.

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN.

En vacas lecheras, la ubre es el órgano más ignorado en términos de su patología y sus posibles consecuencias para el bienestar de la vaca, además de ser uno de los órganos más explotados económicamente (Lavon *et al.*, 2019).

Décadas de selección genética orientados para una mayor producción han resultado en una mayor susceptibilidad a la mastitis, la ubre lactante cumple un proceso fisiológico destacable y significativo en el suministro nutricional que le confiere protección al ternero recién nacido, ya que es el principal suministro de calostro el cual contiene anticuerpos valiosos, pero también elementos de respuesta mediada por células, enzimas protectoras y citoquinas. La glándula mamaria tiene un mecanismo intrínseco de protección contra patógenos, en donde son los neutrófilos y macrófagos residentes los que participan como células efectoras en la eliminación (Narayana *et al.*, 2018).

La mastitis se puede clasificar como clínica cuando los cambios inflamatorios en la glándula mamaria o la leche son evidentes visualmente, o subclínica cuando la enfermedad está presente pero los cambios inflamatorios no se pueden detectar visualmente. Además, la mastitis puede clasificarse según su progresividad en base a al tiempo y los daños a nivel histológico producidos en, subaguda, aguda y crónica siendo la ultima la que mayor perjuicio ocasiona a la vaca tanto localmente como sistémicamente (Souza *et al.*, 2020).

Dentro de la dinámica de la infección es necesario saber que para el establecimiento de un cuadro mastítico la interacción de factores como el tipo de ambiente, la capacidad de respuesta inmunitaria de la vaca, el tipo de agente etiológico, las características de transmisión de los patógenos involucrados, influyen directamente sobre su fisiopatología (Hertl *et al.*, 2018).

Un ejemplo de esto se ve en sistemas de producción con ineficiencias ambientales y sanitarias donde lo más recurrente es la mastitis causada por coliformes, la cual es considerada potencialmente mortal debido al desarrollo de alteraciones sistémicas propiciadas por acción de las endotoxinas liberadas por las bacterias gramnegativas. Los microorganismos causales son; *E coli*, *Klebsiella* spp. *P*

aeruginosa, *E aerogenes*, y Las vacas son más susceptibles a este tipo de mastitis inmediatamente después del parto, mientras que las infecciones por *Staphylococcus aureus* a menudo persisten como infecciones subclínicas durante semanas o meses (Dalanezi *et al.*, 2020).

La mastitis clínica generalmente se tratará con antibiòticoterapia y las tasas de curación clínica son variables y dependerán del patògeno. Las tasas de curación bacteriològica pueden variar desde el 90 % para la mayoría de las infecciones por coliformes, hasta el 25 % o menos con *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp* y en ocasiones este índice puede ser nulo cuando se trata de infecciones originadas por *Mycoplasmas spp* (Griffioen *et al.*, 2021).

Hasta la actualidad el enfoque clínico y terapéutico de la mastitis se ha limitado en el uso correcto y racional de algunas familias de antimicrobianos acorde a las necesidades diagnosticas establecidas en la patología, sin embargo, existe la posibilidad alternativa que permite la utilización de agentes fitofarmacològicos como los extractos naturales de origen vegetal y otros agentes (van der Voort *et al.*, 2021).

La utilización oportuna de microorganismos con actividad biològica benéfica ha estado en estudio, los principales microorganismos que son considerados dentro de este grupo son los bacilos Gram positivos con capacidad ácido-láctica, como los *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium*, entre otros, a los cuales se les atribuye la capacidad de inhibición microbriana y han sido utilizados con el principio probiòtico, por sus características intrínsecas para el control de infecciones causadas por agentes microbianos patògenos (Zamojska *et al.*, 2021).

1.2. PROBLEMA

El punto crítico en un animal de alta producción lechera es la glándula mamaria, ya que esta posee un determinado grado de susceptibilidad a diferentes factores que pueden condicionar su funcionalidad, esta condición es originada principalmente por cambios celulares e histológicos que pueden desencadenar un cuadro inflamatorio o infeccioso a nivel intramamarias (IMI) el cual también es conocido como mastitis.

La mastitis es considerada una patología del área productiva del ganado lechero cuyo asentamiento es principalmente el tejido secretor de la glándula mamaria su asentamiento repercute directamente sobre el performance productivo de la vaca.

Generalmente, este proceso infeccioso a nivel intramamario es ocasionado por la interacción entre microorganismos de distintas índoles que por sus características intrínsecas o factores de virulencia activan mecanismos de respuesta inmunitaria, que cuando resultan ser insuficientes, comprometen la fisiología de este órgano y también repercute en la cantidad y composición de leche que se produce, además de que es considerada la responsable de altas pérdidas económicas.

En la actualidad los esfuerzos diagnósticos se han centrado en la identificación oportuna del agente etiológico de dicha patología, esta labor puede ser el punto inicial para emprender una terapéutica ajustada a las necesidades etiopatológicas en el animal.

La terapéutica farmacológica instaurada de manera incorrecta ha sido el blanco de muchos estudios dado a que resulta ser el principal cimiento de la generación de resistencia a los antimicrobianos por parte de los agentes etiológicos que causan infección intramamaria y su desenvolvimiento, los antibióticos son motivo de especial preocupación debido a su efecto potencial sobre las poblaciones bacterianas humanas en términos de resistencia antibiótica. Ciertos antibióticos reservados para su uso en condiciones especiales en pacientes humanos destacan su uso en medicina veterinaria, y la clínica veterinaria debe ser consciente de estas preocupaciones y preguntarse si se puede justificar el uso de este tipo de medicamentos en un manera rutinaria y generalizada.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Evaluar la efectividad antimicrobiana de *Bacillus spp* tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™. frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* aisladas de mastitis bovina

1.3.2. Específicos

- Reanimar cepas de *Bacillus spp.*, tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™.
- Evaluar la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* aislados de mastitis bovina con cepas de *Bacillus spp* tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™.
- Establecer la actividad antagónica del microfiltrado de los cultivos en caldo de *Bacillus spp* tipo silvestre y del *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ sobre las bacterias patógenas.
- Medir la curva de crecimiento de *Bacillus spp* tipo silvestre y del *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ utilizados como inhibidores de crecimiento mediante espectrofotometría.

1.4. HIPÓTESIS

HO: No existe actividad antimicrobiana in-vitro de *Bacillus* spp de tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™. frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* spp ocasionantes de mastitis

HI: Existe actividad antimicrobiana in-vitro de *Bacillus* spp de tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™. frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* spp ocasionantes de mastitis

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del órgano mamario de la vaca

Este órgano está referido a una modificación histológica de tipo glandular con una especialización funcional relativamente alta, dependiendo de la especie se va a determinar su función y características anatómicas, esta suele estar dividida en dos o más cuartos mamarios, constituidas de un cuerpo y un pezón (Cohick, 2022)

La funcionalidad de la glándula mamaria está determinada por un conjunto de estructuras histológicas y celulares, las cuales inician los procesos metabólicos, moleculares e iónicos para la formación de la secreción láctea, a partir de los componentes sanguíneos vinculados (Sharmin, 2021)

2.1.1. Morfo-fisiología de la glándula mamaria

Una serie de estructuras anatómicamente diferenciadas proporcionan a este órgano su ubicación y tamaño en relación al cuerpo del animal, sistemáticamente confiriéndole la capacidad de transformar productos catabolizados en solutos lácteos (Xu *et al.*, 2021).

2.1.1.1. Soporte y sostén de la glándula mamaria

Existen componentes anatómicos de características fibroelásticas que mantienen estable y correctamente ubicada a la ubre, entre ellos el principal ligamento involucrado en la suspensión longitudinal de la ubre en relación al cuerpo, es el ligamento suspensorio medial, el cual origina dos ramas que definen el proceso de amortiguamiento en la porción media de la ubre, estos ligamentos se encuentran sujetos a variación debido a sus capacidades adaptativas en función a las variaciones referentes al tamaño en circunstancias como cuando la ubre se encuentra llena o en animales de edad avanzada (Kaur *et al.*, 2021).

A nivel lateral de la ubre está soportada por los ligamentos sinfisarios originarios en la sínfisis pélvica e insertados en porciones laterales de la ubre, es el responsable de aproximadamente el 70% de la fijación y estabilidad del órgano cuestionado, el otro 30% está determinado por el ligamento lateral con sus dos ramas laterales que intervienen hasta el piso de la ubre (Sandrine *et al.*, 2021).

2.2. Cisterna y conductos de la glándula mamarios

La salida de la leche hacia el ambiente extramamarios se encuentra determinado por una serie de canales y conductos, los cuales generalmente están activos cuando las cisternas de almacenamiento se encuentran llenas, esto debido a que la producción de leche por parte de las unidades funcionales es constante, para que este procedimiento se lleve a cabo y el metabolismo de las células epiteliales se active debe ocurrir una serie de sucesos neuroendocrinos de características aferentes (Wellnitz & Bruckmaier, 2021)

2.3. El pezón de la glándula mamaria

Es considerado como la principal puerta de salida de la leche, está estructura al estar más vinculado con el ambiente externo también puede ser la puerta de entrada de sustancias y patógenos, sin embargo, esta estructura posee componentes que determinan un estado de protección físico de la ubre ya que su esfínter y la formación continua de un tapo estéril de quitina limitan la entrada de sustancias tóxicas y de patógenos (Narayana *et al.*, 2018).

2.4. Paquete neurovascular de la glándula mamaria

El riego arterial está determinado por las arterias mamarias craneales y caudales, las cuales se originan de las arterias ilíacas, este riego sanguíneo es de vital importancia tanto para la nutrición celular como para la difusión de moléculas y componentes lácteos, inmunológicamente existe un nódulo linfático específico de la glándula mamaria, el cual se encarga de la liberación de células inmunitarias y otras sustancias quimiotácticas, neurológicamente en la glándula mamaria interviene el conjunto del plexo mesentérico caudal y el nervio inguinal con sus ramas sensoriales externas e internas, los mismos que se encuentran involucrados en la transmisión de estímulos vía neural, para controlar la liberación de endocrina de ciertas sustancias que estimulan la bajada de la leche (Filor *et al.*, 2022).

2.5. Eyección de la leche

La configuración celular de las principales unidades formadoras de la leche se encuentra mediada por las células epiteliales y mioepiteliales, las cuales metabolizan componentes sanguíneos en sólidos lácteos su unión conforma el

alveolo, el cual responde contrayéndose, debido a estímulos oxitocinoddependientes, contrayéndose para que exista un descenso de la leche desde esta estructura hacia las cisternas respectivamente (Kumar *et al.*, 2022).

La activación de las estructuras involucradas en la secreción y excreción láctea se encuentra regulada por una serie de factores, en donde la pubertad y el parto desencadenan cuatro eventos principales conocidos como mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis e involución mamaria, cada uno de estos están controlados por el eje del hipotálamo y la hipófisis y empieza desde el periodo fetal hasta después del segundo parto y de manera indefinida (Notcovich, 2021).

Debemos entender que el sistema mamario funciona de manera progresiva y en dependencia de estímulos que provocan una secreción pulsátil de determinadas hormonas de carácter reproductivo como los principales esteroides, además el lactógeno placentario, y otras hormonas como la oxitocina y prolactina además de hormonas que regulan el metabolismo, crecimiento y multiplicación celular como la hormona del crecimiento (GH), corticosteroides, tiroxina, insulina, hormona paratiroidea, las cuales intervienen en el control metabólico de componente extra celulares para metabolizarlo y trasportarlos desde la sangre hacia la leche conformando el perfil composicional de dicha secreción (Notcovich, 2021).

Ciertos estímulos externos contribuyen en la activación neural por la vía aferente de los receptores nerviosos del pezón para que se produzca el proceso de eyección “bajada de la leche”, dando como resultado el mantenimiento de la lactancia hasta el vaciado de la ubre establecido por señales neuroendocrinas (Notcovich, 2021).

2.6. Protección del sistema mamario

La protección de este órgano glandular se encuentra mediada por un complejo sistema de estructuras físicas, químicas y celulares las cuales se encuentran distribuidas tanto en los componentes anatómicos como en la leche y en las células de respuesta inmunitaria (Nagahata *et al.*, 2021).

2.6.1. Componentes físicos de protección

Dentro de los principales componentes físicos que le confiere protección a la glándula mamaria se encuentra el pezón con su forma y las estructuras anatómicas

que sellan su canal limitando la entrada y exposición de microorganismos, un fallo de estas condicionaría su protección y propiciaría infecciones recurrentes (Nobrega *et al.*, 2020).

Las estructuras involucradas en este proceso activo son el esfínter de la punta del pezón, el cual se mantiene cerrado entre los procesos de ordeño, generalmente cuando sufre trasgresiones como la fibrosis de este esfínter determina una barrera permeable para los microorganismos, el diámetro del canal de pezón generalmente también puede condicionar el funcionamiento de los componentes físicos de protección ya que su funcionamiento se relaciona en gran medida con la del esfínter, más internamente en el punto de unión del canal de pezón y la cisterna de la ubre se encuentra la roseta de Füssenberg, la cual participa como la segunda puerta de entrada y salida a la ubre, generalmente propicia la formación del tapón de queratina lactosada en el canal, la misma que tiene actividad bactericida y oblitera el canal impidiendo el paso de patógeno al ambiente intramamario (Palacios *et al.*, 2018; Nobrega *et al.*, 2020; Gomez *et al.*, 2020).

2.6.2. Mecanismos inmunitarios de la glándula mamaria

Dentro de estos componentes de protección los principales involucrados son los leucocitos, los cuales componen alrededor del 99% de células inmunológicas presentes (CCS) en los casos de mastitis (López & Mendoza, 2022).

Universalmente en el diagnóstico cuando se evidencia elevado conteo de células somáticas se asumen que están correlacionados con una respuesta activa ante una posible colonización bacteriana o casos subclínica de mastitis, considerando que cuando el número de estas células excede las 200000/mL se considera como el inicio de cuadro infeccioso intramamario la evidencia principal del tipo de células encontradas se relaciona con las funciones de los poliformonucleares en primeras instancias (Cantón, 2020).

De los agregados celulares que corresponde a los polimorfonucleares los neutrófilos son los que se encuentran de manera más abundante, estos son los principales responsables de la fagocitosis y lisis de los patógenos invasores de la glándula mamaria además de propiciar respuestas quimiotácticas para desencadenar una respuesta más exacerbada acompañadas por otro tipo de células (Castillo, 2020).

Adicionalmente otro tipo de leucocito que contribuye en la respuesta celular inmunitaria son los eosinófilos, su respuesta se encuentra ligada a los mecanismos regulatorios del pH y a la liberación de histamina (Souza *et al.*, 2020).

Este tipo de sustancias liberada por la primera línea defensiva celular contribuyen en la respuesta más estructurada por parte de los agranulocitos como los monocitos y linfocitos, los cuales se encargan de presentar molecularmente a los antígenos bacterianos a las células diferenciadas T y B, las cuales generan una respuesta humoral (Connelly *et al.*, 2021).

Las células linfoides de tipo B y T, son los principales involucrados en la secreción de componentes inmunitarios de origen proteico como las inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA y IgE, las cuales cumplen funciones opsonizadoras que limitan e impiden la adherencia tisular por parte de las bacterias patógenas (Hertl *et al.*, 2018).

2.7. Mastitis

La interacción citotóxica que ocurre entre los mecanismos de defensa y la invasión de microorganismos patógenos desencadena un proceso inflamatorio del tejido secretor de la glándula mamaria, el cual es conocido como mastitis, la cual se clasifica en subclínica y clínica de manera subjetiva en función a la cantidad de alteraciones que puedan ser observada a nivel de la morfológico y en las características físicas y organolépticas de la leche (Ballesteros & Valdivierso, 2018).

2.7.1. Mastitis Subclínica

Se define como la ausencia de signos patológicos perceptible a simple vista a nivel de la ubre, la leche y de manera sistémica en la vaca, este tipo de presentación al ser silente su única repercusión observable son alteraciones en la cantidad y calidad de leche producida, su diagnóstico no poder ser netamente clínico, este generalmente suele ser molecular o mediante el conteo de células somáticas (Raspanti *et al.*, 2016).

2.7.2. Mastitis Clínica

Este tipo de mastitis es aquella donde se observan alteraciones perceptibles, como una drástica disminución en la producción y alteraciones composicionales y físicas

de la leche debidas principalmente a reacciones compensatorias y tóxicas, así como también variaciones en la anatomía de la glándula mamaria en principio por alteraciones de carácter inflamatorio, aunque de mismo modo se ha logrado determinar que cierto tipos de microorganismos altamente patógenos puede propiciar endotoxemías generalizadas que puede incluso provocar la muerte de la vaca, en función a estos antecedentes en el manejo clínico-terapéutico de esta patología se ha preferido reforzar los mecanismos de resistencia y limitar el nivel de exposición a las etiologías que luchar contra un cuadro establecido (Guio *et al.*, 2016).

2.8. Diagnóstico de la mastitis

El diagnóstico de esta patología suele ser clínico en función a la percepción de los signos de alteración composicional a nivel de la leche, y signos inflamatorios a nivel de las mamas, y de modo molecular mediante el coteo de células somáticas y la evidencia de disminución de la cantidad producida.

2.8.1. Exploración físico-clínica de la ubre

Semiológicamente se deben aplicar todos los métodos de exploración a nivel del sistema mamario de la vaca, considerando inicialmente el pezón cuya integridad debe ser correlacionada con los hallazgos encontrados en las pruebas diagnósticas complementarias, inicialmente se debe evaluar mediante observación y palpación las variaciones existentes en las estructuras anatómicas de la ubre iniciando desde el pezón hasta el cuerpo de la ubre, lo fundamental es tratar de encontrar evidencias de dolor, rubor, calor, tumefacción o edema y la pérdida de su funcionalidad. (Ayvazoglu & Eski, 2019).

Una vez establecidos los hallazgos en la exploración anatómica de la ubre y el pezón, es requerido una exploración metódica de las posibles alteraciones que se pueden encontrar en la leche, los principales hallazgos son; formación de grumos, coágulos, dilución de la leche y coloración no deseada (Gómez *et al.*, 2020).

La asociación de factores como el tipo patógeno etiológico con su nivel de patogenicidad y la susceptibilidad de la vaca puede generar muchos niveles de sinología, incluye signos de enfermedad y septicemia como fiebre, apatía, anorexia, ruminitis, CID, etc. (Gomez *et al.*, 2020).

2.8.2. Recuento de células somáticas (RCS)

Este método diagnóstico se considera como el segundo más sensible y específico en el diagnóstico de los tipos de mastitis y su cronicidad, ya que su resultado puede poner en manifiesto si se trata de un cuadro subclínico o clínico, en cualquier sistema de producción lechera se debe considerar que un recuento mayor a 100 000/mL es considerado evidencia de un proceso inflamatorio, sin embargo, este puede tener muchas índoles que no necesariamente tenga una referencia infecciosa, ya que inflamación no es sinónimo de infección, de tal modo los hallazgos diagnósticos donde se observe CCS elevados o mayores a 150 000/mL en la leche con tendencias alcistas, si se considera como una infección en curso, ya que esta se encuentra mediada por el reclutamiento de polimorfo nucleares como los neutrófilos principalmente (Omore *et al.*, 1996).

2.8.3. Prueba de mastitis de California (CMT)

Es una prueba complementaria de carácter subjetivo, básicamente mide el nivel de viscosidad que propicia los componentes celulares en función a la cantidad de células somáticas que se lisaron por efecto del aditivo y que se puedan encontrar en una muestra en cuestión, su fundamento se origina en la lisis, este análisis confiere una puntuación subjetiva de 0 cuando no existen altos recuentos de células somáticas y hasta 5 cuando los recuentos de células somáticas pueden inclusive alcanzar el 1'000 000 de células/ml, sin embargo los reportes deben estar correlacionados con lo encontrado en la exploración física de la ubre (Balemi *et al.*, 2021).

2.8.4. Conductividad eléctrica

Cuando se desencadena una infección intramamaria generalmente suelen ocurrir alteraciones en los componentes de la leche principalmente por concentración o por dilución, las variaciones ocurren en los componentes minerales y electrolíticos, asumiendo que cuando existe un aumento de sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) y una considerable merma de potasio (K^+), se alteran los gradientes de conductividad eléctrica de las muestras de leche con mastitis, en donde se asume que valores por $5,5 \text{ ms/cm}^2$ a temperatura ambiente se asume altos CCS indicando valores iguales o superiores a 250 000/mL (Masis & Jirón, 2019).

2.8.5. Cultivo

Se define como el primer tipo de monitoreamiento y método diagnóstico más sensible y específico en toda explotación lechera, ya que permite identificar el patógeno involucrado en el desarrollo y establecimiento de una infección intramamaria, además permite saber si es de carácter contagioso o las condiciones ambientales son las que propicia su crecimiento y disseminación, esta prueba diagnóstica otorga la capacidad de evaluar de manera individual o a nivel de rebaño las condiciones fisiológicas de salud del sistema mamario, y a partir de una perspectiva mas focalizada que permite aplicar terapia selectiva de secado, ya que en función a los resultados las pruebas de susceptibilidad antibiótica que pueden aplicarse bajo la metodología del aislamiento e identificación patógena se puede orientar la terapéutica antimicrobiana más efectiva (Singh *et al.*, 2016).

El método de toma de muestras se realiza bajo los lineamientos establecidos por el National Mastitis Council “NMC”, el mismo que estipula las condiciones para que no exista influencia de microorganismos contaminantes, la toma de muestras para cultivo bacteriológico debe realizarse en tubos de ensayo estériles, lo recomendable es tomar de 5 a 15 mL, para su efecto los pezones deben estar limpios y libres de materia orgánica, se debe realizar en primera instancia una desinfección del pezón con una inmersión en solución yodada combinada con peróxido de hidrógeno, luego se realiza un secado y una desinfección con alcohol isopropílico, con la utilización de guantes estériles se descarta el primer chorro y sin que el pezón toque la boca del toma se toman las muestras requeridas, finalmente se sella el pezón con una solución bactericida, a nivel de laboratorio se realiza la identificación bacteriana mediante la aplicación de medios de cultivo bacteriano específicos y diferenciales (Padilla *et al.*, 2016).

En función al metabolismo bacteriano se puede realizar su cultivo en medios que permitan diferenciar el crecimiento entre géneros y entre especies, generalmente los medios con componentes colorimétricos permiten tener en principio un criterio inicial de identificación, en primeras instancias es recomendable utilizar Agar Sangre con el 5% de adición de sangre de cordero y agar MacConkey, estos principalmente permiten el crecimiento mesófilos G+ y G- (Neder *et al.*, 2021).

El reconocimiento del microorganismo aislado de muestras de leche positiva a mastitis bovina principalmente inicia con la identificación de las características intrínsecas a la bacteria en cuestión, así como su patrón de crecimiento y la observación de características microscópicas como su motilidad y algunas propiciadas por la tinción de Gram en donde se observa su forma, agrupación y su afinidad tintorial (Lago & Godden, 2018).

Metabólicamente el microorganismo es identificado por varios aspectos, debido a que cada género bacteriano es diferente entre si, dentro de los cuales los principales métodos de observación son los patrones fermentativos de los carbohidratos del medio en donde fue sembrado, la capacidad de oxidar ciertos compuestos químicos, producción de gas y componentes nitrogenados como productos de desecho, capacidad de tolerar la salinidad, capacidad de coagular componentes del plasma sanguíneo, etc. (Nery *et al.*, 2021).

Generalmente la identificación se realiza en función al establecimiento de un perfil, implementando medidas protocolarias de segregación individual que se adjudiquen al diagnóstico de manera correcta y oportuna para la identificación de los principales patógenos etiológicos involucrados, estos ensayos permiten tomar decisiones acertadas en la terapéutica ya que existen microorganismos que poseen resistencia intrínseca a determinados agentes farmacológicos.

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica son consideradas ensayos de vital importancia a la hora de dirigir un plan terapéutico en aquellas vacas con mastitis, ya que este tipo de pruebas permiten obtener información sobre la sensibilidad o resistencia que un microorganismo en cuestión ha adquirido a un antibiótico o a su vez a una familia completa de antibióticos, todo en función a los parámetros de susceptibilidad establecidos en el CLSI, con esta información se puede seleccionar los antibióticos que serán destinados para la administración a la vaca con mastitis (Jones, *et al.*, 2019).

2.9. Mastitis contagiosa

Este tipo de infecciones intramamarias es determinada por bacterias con características patológicas de rápida propagación, los cuales poseen factores de virulencia que exacerban esta condición, este tipo de bacterias aprovecha una

mínima ventana de susceptibilidad por parte de la vaca para poder ejercer su patogenicidad, la propagación de este tipo de microorganismos generalmente se encuentra bajo control de vectores involuntarios como los ordeñadores, los equipos de ordeño, aperos contaminados (Gussmann *et al.*, 2019).

En dependencia del microorganismo contagioso en desarrollo se puede evidenciar un cuadro subclínico o clínico, estos agentes bacterianos influyen negativamente en los índices de sanidad de la glándula mamaria de un lote en cuestión ya que pueden ser el inicio de nuevas infecciones, o inclusive de infecciones recurrentes que en cierto modo no son erradicables o incurables (Mendoza *et al.*, 2018).

Los focos de infección generalmente están vinculados a malas practicas de ordeno, superlotación del rebaño, mal manejo de la línea de ordeño, higiene deficiente, introducción de nuevos animales sin cuarentena, terapia de vaca seca inespecífica, microorganismos resistentes permanentes sumamente contagiosos (*Mycoplasmas* spp.), etc., entre estos muchos más factores intervienen negativamente en el establecimiento de una mastitis contagiosa (Gelgie *et al.*, 2022).

Los *Mycoplasma bovis* causan cuadros incurables de mastitis bovina, cuyas probabilidades de seroconversión son casi nulas, debido a las características epidemiológicas de este microorganismo es de vital importancia reforzar los protocolos sanitarios tanto en los animales como en los equipos de ordeño (Sosa *et al.*, 2018).

2.10. Mastitis ambiental.

Este tipo de mastitis es de mucha recurrencia en aquellos animales que se encuentra en el pico más alto de susceptibilidad, generalmente se observa en animales de postparto inmediato, este tipo de mastitis es producida por microorganismos que se encuentra normalmente en el ambiente adyacente a la vaca, como camas, establos con deficiente manejo sanitario o con exceso de materia orgánica o nichos de alojamiento del ganado (Sarma & Hussain, 2021).

Los métodos de control de este tipo de mastitis están referidos a buenas practicas de ordeño, establecimiento de una adecuada línea de ordeño, saneamiento y recambio de camas y establos, control y manejo sanitario de la sala de ordeño, cura y disminución de lesiones en la punta del pezón (Zigo *et al.*, 2021).

Las bacterias patógenas de carácter ambiente inciden el ambiente intramamario generalmente en los establecimientos lecheros cuando en la rutina de ordeño no se realizan protocolos de limpieza de pezones bien definidos, o inclusive en el inicio de los procedimientos de secado en donde se introducen cánulas a través del canal de pezón, las bacterias de mayor recurrencia en este tipo de mastitis suelen coliformes o enterobacterias y estreptococos del tipo B. (Kabelitz *et al.*, 2021).

2.11. Etiología

La etiología relacionada a la mastitis puede ser multifactorial, en donde pueden influenciar tanto las bacterias Grampositivas y Gramnegativas, cuyos factores de virulencia desencadenan diferentes niveles de cronicidad de la patología, en segundo plano la influencia de agentes virales y fúngicos también puede desencadenar una respuesta inflamatoria en la patología, aunque también algas y factores ambientales se consideran dentro del pool de etiologías (Neder *et al.*, 2021).

Tabla 1.

Microorganismos bacterianos causantes de mastitis bovina

Microorganismo	Tipo	Patogenicidad
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos gram positivo	Contagioso
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cocos gram positivo	Contagioso
<i>Streptococcus uberis</i>	Cocos gram positivo	Contagioso–Ambiental
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Cocos gram positivo	Contagioso –Ambiental
<i>Mycoplasma bovis</i>	Celula sin membrana	Contagioso
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo gram negativo	Ambiental
<i>Klebsiella spp</i>	Bacilo gram negativo	Ambiental
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Bacilo gram positivo	Ambiental
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Bacilo gram positivo	Ambiental
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo gram negativo	Ambiental
<i>Enterobacter spp</i>	Bacilo gram negativo	Ambiental

Nota. Tomado de Shoaib *et al.* (2022)

2.11.1. *Escherichia coli*

Este microorganismo bacteriano es considerado una enterobacteria móvil de tipo bacilo Gram negativo, anaerobia facultativa con alto potencial de adaptabilidad que no posee la capacidad de formar esporas.

Tabla 2.

Taxonomía de E coli

Taxonomía	
Reino:	Bacteria
Clase:	Gamma proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>coli</i>

Nota. Tomado de Zaatout, (2021).

2.11.2. Mastitis ocasionada por *Escherichia coli*

Este tipo de patógeno generalmente afecta a las vacas en postparto inmediato, llegando a observarse casos en periodo de transición existen factores relacionados que desencadenan brotes de este tipo de mastitis en las vacas susceptibles, como locales con deficiente manejo higiénico con abundante materia orgánica, lodo y humedad, además que las temperaturas altas contribuyen a su crecimiento y multiplicación en los ambientes lecheros, se suele observar en los primeros 30 días de haber iniciado la lactancia, generalmente no ocasiona un aumento en el recuento de células somáticas, aunque se suele observar alteraciones inflamatorias en las ubres y la leche (Zaatout, 2021).

2.11.2.1. Patogénesis

El primer signo característico es el edema de la ubre que algunos casos suele ser completo o incompleto, este tipo de microorganismo generalmente invade la glándula mamaria en momentos cruciales, cuando se rocían los pezones con agua,

la fuga de leche cuando la ubre se encuentra muy llena, la transgresión y lesiones del pezón, permitiendo que *E. coli* ingrese hacia el ambiente intramamario y desencadene sus factores de virulencia (des Roches *et al.*, 2018).

El principal factor que influyente que desencadena un sinnúmero de disfunciones inmunológicas es el postparto ya que este propicia un nivel de inmunodepresión marcado, otros disturbios metabólicos y patologías del periodo de transición intervienen para deprimir la función de los neutrófilos , entre las principales patologías la esteatosis hepática, problemas de retención placentaria, balance energético negativo, cetosis e hipocalcemias influyen aumentando la susceptibilidad de la vaca (Lavon *et al.*, 2019).

El inicio del periodo de secado es también un factor que influye de manera negativa disminuyendo las defensas locales de la glándula mamaria, tanto las defensas solubles y químicas como defensas mediadas por células (Fahim *et al.*, 2019).

La *E. coli* posee factores de virulencia como los LPS los cuales pueden generar sinología local en la ubre y sistémica o una endotoxemia debido a la gran liberación de mediadores proinflamatorios que desencadenan un sinnúmero de reacciones orgánicas que conducen a la inestabilidad de la vida del animal que generalmente inicia con shock y cuadros más graves como la coagulación intravascular diseminada (CID), etc. estas sustancias generalmente son histamina, serotonina, eicosanoides, ciclooxigenasa, lipoxigenasas que conllevan al fallo orgánico multifuncional en la vaca y por consiguiente la muerte (Blum *et al.*, 2020).

2.11.2.2. Signos clínicos de mastitis por *Escherichia coli*

El principal signo a nivel local son el edema mamario post-parto, además de que suele haber dolor, respuesta a la palpación, disminución de su funcionalidad, y más sistémicamente inapetencia, decaimiento, fiebre, estasis ruminal, taquicardia, debilidad e irritabilidad, taquicardia, cifosis, etc., todos estos hallazgos deben ser considerados para poder establecer los principales procedimientos a realizarse a nivel de laboratorio y poder definir el diagnostico de manera correcta y oportuna (des Roches *et al.*, 2018).

2.11.2.3. Diagnóstico de *E. coli*

La aplicación de los métodos y técnicas de exploración física en donde se puede definir como los primeros hallazgos, desde el pezón hasta el cuerpo de la ubre, es importante mencionar que se debe evaluar su integridad anatómica y su funcionalidad, adicionalmente es importante considerar alteraciones en la leche propiciadas por dilución de esta.

Debido a la patogenicidad del la *E. coli* también debe considerar la posible existencia de endotoxemia, y enfermedad generalizada como taquipnea, taquicardia, fiebre, debilidad, escalofríos, inapetencia y shock.

La aplicación de pruebas complementarias como la biometría hemática suele ser de ayuda a la hora de definir las posibles consecuencias que origina las mastitis por coliformes, ya que por lo antes mencionado, comunmente se suele encontrar es una neutrofilia con desviación a la izquierda y neutrófilos en banda que refieren a un proceso degenerativo, adicionalmente puede haber evidencia de leucopenia y trombocitofilia que propicia el CID, este conjunto de alteraciones hemáticas propicia a que el cuadro mastítico se exacerbe (Cheng *et al.*, 2022).

Además de la exploración física y ensayos clínico-patológicos, la vaca debe ser sometida al conteo de células somáticas individual, y cultivo microbiano que permitan identificar al patógeno además de discernir de entre oro tipo de bacterias que pueden ser consideradas como floja contaminante o flora simbiótica (Nalband *et al.*, 2020).

2.11.3. *Klebsiella spp.*

Es otro tipo de bacteria considera como contaminante y se encuentra en ambientes con gran cantidad de materia orgánica altamente degradable, es una bacteria Gram negativa que no forma esporas, es inmóvil y su forma característica es bacilar, este pertenece al grupo de las enterobacterias, suele vincularse con muchas patologías en los hatos lecheros, desde neumonías en los terneros, onfaloflebitis, diarreas y mastitis en las vacas susceptibles. (Massé *et al.*, 2020).

Tabla 3.*Clasificación taxonómica de Klebsiella spp.*

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>Pneumoniae – oxitoca</i>
Nombre científico	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxitoca</i>

Fuente. Virkler, (2021)

De estos microorganismos las especies más recurrentes en los aislamientos de cuadros mastíticos son, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* los cuales patológicamente son muy similares a *E. coli*, ya que generalmente afecta a vacas sumamente susceptibles que se encuentran en el post-parto inmediato, se consideran flora natural del tracto respiratorio e intestinal de animales jóvenes, a diferencia de *E. coli* las tasas de curación de este tipo de mastitis varía y generalmente no suele haber curación espontanea como en los casos originados por *E. coli*, su letalidad varía de un 10% a un 80% (Klaas & Zadoks, 2018).

Esta mastitis ocasionada por *Klebsiella* spp. generalmente se clasifica como una mastitis de tipo ambiental, este tipo de presentaciones suelen ser muy recurrentes en lugares de clima cálido y húmedo, especialmente este microorganismo posee factores de virulencia que la hacen sumamente patógena, además de que le confiere una capacidad extraordinaria de resistir a la fagocitosis y opsonización debido a determinados componentes de membrana, capsula, adhesinas, enterotoxinas y sideróforos, LPS, entre otros factores (García *et al.*, 2022).

2.11.3.1. Diagnóstico

El diagnóstico se establece correlacionando dos sentidos, el primero es mediante los hallazgos y evidencias de la exploración física, el segundo es mediante el uso de pruebas diagnósticas complementarias, una de ellas es los resultados del recuento de células somáticas, CBT, CCT, el reconocimiento del agente involucrado mediante técnicas de aislamiento e identificación bacteriana, inclusive mediante el desarrollo de pruebas moleculares, rtPCR, dicha correlación permite establecer un criterio diagnóstico fundamentado (Mahmoudi & Momtaz, 2019)

En los resultados de la biometría hemática se estandariza los hallazgos con los encontrados ante la examinación en todos los casos de mastitis bovina, en primeras instancias se evidencia leucocitosis mediada por una neutrofilia con desviación a la izquierda, en aquellos casos crónicos los hallazgos típicos son neutropenia, y neutrofilia en banda, aunque se asume que es consecuencia de inicios del desarrollo endotóxico (Cheng *et al.*, 2021).

Tabla 4.

Características patológicas de la Klebsiella spp.

Propiedades	
Fermentación de la lactosa	+
Hidrolisis de la urea	+/V
Utilización del Citrato	+/V
Producción de ácido sulfhídrico	-
Voges Proscauer	+
Producción de Indol	-

Fuente: Massé *et al.* (2020).

2.11.4. *Staphylococcus aureus*

Esta es una bacterias en forma de coco que generalmente se agrupa de manera particular en una forma que asemeja a un racimo de uvas cuando es observado microscópicamente, es Gram positivo, no tiene la capacidad de formar esporas, ciertos subespecies por lo general posee diferencias fenotípicas de crecimiento

como la producción de un beta-caroteno entre los conglomerados de bacterias y se sospecha que entre mayor sea la cantidad de este pigmento, mayor es su patogenicidad, es una bacteria anaerobia facultativo que generalmente no suele ser muy exigente en los requerimientos para su crecimiento aislado, posee la capacidad de resistir determinados niveles de salinidad y también en algunos casos resistencia intrínseca a determinados grupos de antibióticos como el caso del SAMR (Maity *et al.*, 2020).

Los estafilococos posee un gran capacidad patológica e invasiva de tejidos, se ha demostrado que varias especies de este tipo de bacterias causan mastitis, sin embargo, hasta la actualidad el *Staphylococcus aureus*, ha sido el más patogénico aislado de mastitis, este generalmente produce un tipo de mastitis contagiosa la cual puede aparecer en cualquier fase o etapa de lactancia y es el único capaz de coagular componentes plasmáticos, este factor ha sido tomado en cuenta como una característica aplicada para el reconocimiento e identificación, también este microorganismo es muy estudiado por su capacidad de producir biofilm como factor de virulencia e invadir intracelularmente ciertos tipo de células epiteliales (Wang *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus es uno de los agentes etiológicos mas temidos en los cuadros mastiticos ya que este puede ocasionar grandes pérdidas económicas relacionadas principalmente al descarte de animales con cuadros incurables, inclusive puede causar mastitis necrotizante con perdida total de la funcionalidad de un cuarto mamario o de la ubre completa (Fursova *et al.*, 2020).

En los casos de mastitis se ha logrado exhibir, aislar e identificar un aproximado de 40 especies y subespecies de estafilococos mediante técnicas moleculares, la divergencia genética es amplia y cada uno de estas especies evidenciadas son diferenciadas entre si y determinadas por patrones particulares de patogenicidad o resistencia a los antibióticos, mediante la secuenciación multilocus y la observación de genes que codifican la proteína A especifica de *Staphylococcus aureus* son de momento los métodos de mayor impacto y suma sensibilidad y especificidad (Maity *et al.*, 2020).

Tabla 5.*Taxonomía del S. aureus*

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i>
Nombre científico	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Fursova *et al.*, (2020).

2.11.4.1. Signología en mastitis causada por *Staphylococcus aureus*.

Primeramente, debemos entender que este microorganismo puede ocasionar mastitis en todas las fases de lactancia, es particularmente subclínico en sus primeros periodos patogénicos, ocasiona leves depleciones de la producción de leche y generalmente suele no especifica la sinología hasta cuando el cuadro se ha cronificado (Putz *et al.*, 2020).

Los signos en las vacas cuyas ubres han sido infectadas por esta bacteria suelen observarse con fiebre leve, cuarto mamario edematizado, hiperémico, y caliente al tacto, además de presentar reacción al manipular los pezones debido al dolor generado, o inclusive signos evidentes de cojera debido al dolor en la región de la ubre, adicionalmente la leche se observa mas espesa cremosa o purulenta, sin embargo se considera que este tipo de presentación no es especifico ya que se ha podido evidenciar cuadros mastitis producidos por *Staphylococcus aureus* con resultados y alteraciones de la leche debido a dilución de la misma con presentación de grumos, de tal modo, se insiste que los métodos de identificación bacteriana tradicionales o moleculares son la medida diagnostica mas precisa que favorece a su reporte (Hambali *et al.*, 2018).

Las reacciones hiperagudas que produce la infección intramamaria de *Staphylococcus aureus* pueden inclusive generar cuadros de necrosis en el cuarto mamario infectado, la erradicación y manejo de esta patología es complicado debido a los mecanismos de protección que esta bacteria posee, ya que se ha llegado a documentar que invade intracelularmente las células epiteliales y se protege de la apoptosis y lisis celular mediada por fagocitosis, esto indiscutiblemente es el punto de partida para que el cuadro se cronifique llegando inclusive a la gangrena de los lóbulos galactóforos (Vega *et al.*, 2019).

Ciertos factores de virulencia actúan a nivel de los paquetes vasculares ocasionando vasoconstricción que en pocas palabras se traduce en necrosis del tejido avascularizado, dentro de estas sustancias se encuentra la toxina alfa dermonecrótica, leucocidina, etc., (Dieser *et al.*, 2017).

2.11.4.2. Diagnóstico

Una vez se aísla el microorganismo este debe ser sometido a pruebas de identificación tanto fenotípicas con bioquímicas y en menor medida pruebas moleculares, sin embargo, se ha podido inferir que *S. aureus* es el único capaz de coagular componentes plasmáticos, por ello una técnica de cajón utilizada en su identificación es la prueba de coagulasa la cual proporciona alrededor de un 94% a 98% de sensibilidad a la hora de diagnosticar a esta bacteria (Sol *et al.*, 1997).

Actualmente existen medios de cultivo colorimétricos los cuales también poseen buena afinidad y buena expresión colorimétrica mediada por las características nutricionales y metabólicas que posee el *S. aureus*, sin embargo, el agar sangre sigue siendo utilizado de manera rutinaria ya que confiere la capacidad de observar su patrón de hemólisis (Rodríguez *et al.*, 2021).

En la mayoría de aislados de *S. aureus* que han sido aislados de casos positivos a mastitis bovina se ha podido comprobar la producción de toxina beta la cual es una exoproteína que hidroliza la esfingomielinina la cual afecta a la permeabilidad de la membrana plasmática de algunos tipos celulares, divergentemente de los aislados de *S. aureus* que no produce esta exoproteína, esta diferencia radica principalmente en la presencia de un prófago lisogénico que se encuentra vinculado a la expresión del gen *h1b* (Angarita & Merchán, 2018).

2.11.4.3. Resistencia antimicrobiana

Principalmente los grupos antimicrobianos que se utilizan en mayor medida para tratar las infecciones intramamarias son las penicilinas y los β -lactámicos los cuales actúan directamente sobre los procesos de adjudicación de la pared bacteriana, impidiendo que se logre una transpeptidación y disminuyendo el conglomerado con peptiglicano (Nader Filho *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus es sensible a muchos agentes farmacológicos y químicos y solamente bajo circunstancias generadas por el antibiograma se puede asumir si en realidad este es sensible o presenta algún tipo de resistencia, la aplicación de esta técnica permite orientar la terapéutica adecuada en función a la susceptibilidad del microorganismo (Franco Meza, 2020).

El CLSI manifiesta que la bacteria *S. aureus* posee resistencia intrínseca a determinados fármacos, y que este tipo de resistencia van en evolución como ocurrió con el SAMR, el cual posee el gen *mecA* que codifica plásmidos y mecanismos des resistencia como bombas de e-flujo e hidrolización del anillo betalactámico por producción de betalactamasas y proteínas de unión a la penicilina llamada también PBP2A y PBP2, los cuales le confieren la capacidad de resistir el mecanismo de acción de las penicilinas y betalactámicos. (Wang *et al.*, 2020).

La expresión del gen *mecA* posiciona al *S. aureus* la capacidad de exhibir mecanismos de resistencia antimicrobiana, conociendo que este suceso microbiológico puede disminuir la probabilidad de éxito en la aplicación de una terapia farmacológica definida para el tratamiento de las mastitis bovinas, principalmente de aquellos fármacos que inhiben el metabolismo y formación de la pared celular bacteriana (Bonsaglia *et al.*, 2018).

2.11.5. *Bacillus subtilis*.

2.11.5.1. Características.

El *bacillus* spp, es una bacteria Grampositiva, que forma esporas como fuente de reproducción y multiplicación en largos periodos de tiempo, su particular forma alargada le confiere su nomenclatura (Karpov *et al.*, 2020).

Bacillus spp. son microorganismos con una gran cantidad de estudios, se ha evidenciado que por sus mecanismos de captación y replicación de ADN a través de los complejos esporulados ha permitido que sea el centro de estudio de investigaciones significativas que en la actualidad han permitido clasificarlo y utilizarlo como una terapia alternativa de características probióticas ya que posee capacidad de inhibir otros microorganismos (Inaoka *et al.*, 2017).

Al no ser un microorganismo exigente su cultivo a gran escala puede resultar fácil de instaurar, reconociendo que su uso principalmente se enfoca mas allá del estudio de su patogenicidad ya que esta bacteria puede producir sustancia como enzimas y proteínas (>20gr/L) cuya utilidad puede ser beneficiosa en muchos procesos de industrialización, desde la producción de alimentos derivados de proteínas animales hasta como agentes terapéuticos en la industria farmacéutica (Assaf *et al.*, 2020).

En la producción animal se le ha dado muchos usos, observándose que puede actuar como probiótico mejorando los índices zootécnicos de producción debido a su alta producción de enzimas y proteínas bioactivas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos patógenos, así como también mejora el desempeño en la absorción y metabolismo de los nutrientes de la dieta a nivel intestinal (Uttlová *et al.*, 2016).

Tabla 6.

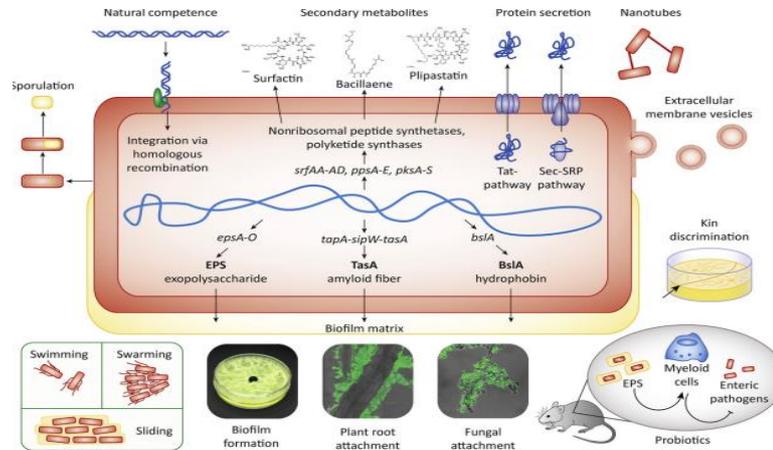
Taxonomía del Bacillus subtilis.

Taxonomía	
Reino	Bacterias
Filo	Firmicutes
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: Kovács, (2019).

Figura 1.

Bacillus subtilis y sus bondades.



Nota. Tomado de Kovács, (2019).

2.11.5.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6051

El ATCC quien desarrolla y comercializa de manera masiva determinadas patentes microbianas certificadas, produce de manera industrial al *Bacillus subtilis* ATCC 6051 como microorganismo certificado para pruebas microbiológicas en donde se requiera comparar la producción de enzimas y productos derivados del metabolismo microbiano o inclusive en pruebas de susceptibilidad y otras aplicaciones biotecnológicas que generalmente son tomadas por la industria farmacéutica para la generación de nuevos productos con usos y enfoques ilimitados ya que esta bacteria con el paso del tiempo se ha descubierto que ha mutado. (Haeyoung *et al.*2015).

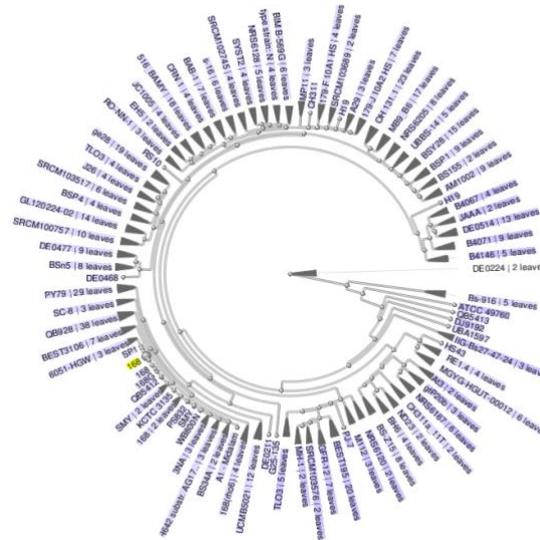
2.11.5.3. Uso del *Bacillus subtilis*.

En base a pruebas moleculares ha sido uno de los microorganismos más estudiados en cuanto a su divergencia genética y la capacidad de producir sustancias con niveles terapéuticos adecuados para se usados como agentes antagonistas de patógenos dañinos, la secuenciación genética a tenido principalmente el enfoque de observar si este tiene la capacidad de formar endoesporas, producir acido láctico, capacidad de producir bacteriocinas, de tal modo el National Center For Biotechnology Information (NCBI), ha reportado que de esta especie bacteriana se

han aplicado un aproximado de 580 genes y en función a esta base de datos se ha catalogado como un microorganismo probiótico (NCBI, 2022).

Figura 2.

Dendrograma basado en BLAST genómico del Bacillus subtilis.



Nota. Tomado de NCBI, (2022).

2.11.5.4. Uso en la medicina.

Las características microbiológicas del *Bacillus* spp., lo han referido para ser utilizado en diversas áreas y campos de investigación, una de ellas es la medicina investigativa ya que este microorganismo produce moléculas antimicrobianas y antibióticos, de las cuales se ha podido identificar que son biológicamente activas contra patógenos dañinos incluyendo bacterias y hongos (Sun *et al.*, 2020).

Esta especie es un antagonista de muchos hongos que suprimen su crecimiento tanto in vitro como in vivo, es eficaz contra *Alternaria solani*, *Monilia fructicola*, *Botrytis cinérea*, *Cladophialophora carrionii*, *Fusarium* spp., *etc.* por estas razones dicha bacteria es un agente ideal para el control (Jiang *et al.*, 2017).

Es importante destacar que existen microorganismos que son considerado probióticos, ya que pueden ser usados de manera medicinal o industrial, estos atributos se deben en gran parte por sus efectos beneficiosos, los que están asociados a la ausencia de posibles las interacción citológica en el organismos del hospedador, este tipo de microorganismos son prebióticos por que resisten a las

enzimas gastrointestinales lo que les faculta habitar en el tubo digestivo de un amplio numero de animales, además los microorganismos probióticos son estables produciendo ácidos de cadena corta y cadena larga, este tipo de bacterias poseen capacidad de adherirse a determinados tipos epitelios en donde generalmente producen sustancias antimicrobianas las cuales pueden ser producto de su metabolismo o producto de un mecanismo de defensa antagónico que inhibe el crecimiento de otros agentes bacterias en competencia por nutrientes y factores de crecimiento. (Fuentes *et al.*, 2022).

Se ha evidenciado mediante ensayos microbiológicos que determinados tipos de Bacilos gram positivos productores de ácidos y sustancias antimicrobianas, poseen actividad de carácter antagónico que inhibe el crecimiento y desarrollo de otro agente bacteriano que generalmente suele ser patógeno, estos estudios han demostrado que su capacidad antibacteriana se les atribuye a determinadas características como las aptitudes de resistir a la acción de sustancias y enzimas producidas en el tracto gastrointestinal del huesped, su viabilidad en la producción de sustancias lisantes y antagónicas (González *et al.*, 2016).

Con la premisa de los principales efectos benéficos de este tipo de microorganismos es imprescindible añadir que su uso medicinal puede ser una alternativa acertada y económica en comparación a la manufacturación de fármacos antimicrobianos, ya que su utilidad reduce al mínimo las posibilidades de generar resistencia a los antimicrobianos por parte de agentes patógenos lo que repercutiría de manera positiva en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Al-Shawi *et al.*, 202).

Las enfermedades infecciosas pueden estar ocasionadas por un sinnúmero de microorganismos bacterianos, los cuales pueden causar diversas patologías, las mismas que pueden ser de tipo primario o secundario, se estima que aproximadamente se ha definido unos 130 géneros bacterianos causantes de enfermedades infecciosas en animales, de los cuales se desconoce su nivel de resistencia a los antibióticos, ya que este nivel esta determinado por la cantidad de exposición a los fármacos antimicrobianos que ha experimentado el microorganismo en cuestión, en base a lo reportado es fundamental la adjudicación de terapias alternativas con mayor espectro antibacteriano (Arsén *et al.*, 2021).

Las sustancias producidas por los microorganismos prebióticos como mecanismos de defensa que estos posee son inicialmente una opción prometedora, dentro de estas se ha logrado identificar que ciertos grupos de bacilos grampositivos producen bacteriosinas, las cuales actúan de manera bactericida ya que afectan en gran medida a la permeabilidad de las membranas celulares, estas sustancias originan la formación de poros en dicha pared celular, provocando un proceso incontrolable de pérdidas de sustancias fundamentales como moléculas de ATP que incide sobre funciones vitales de la bacteria ocasionando su muerte y deteniendo su replicación (Zeigler *et al.*, 2017).

Un punto desacertado en las explotaciones pecuarias con un alto nivel de productividad es la complejidad de mantener protocolos sanitarios óptimos, ya que se sabe que entre mayor sea el nivel productivo las probabilidades de aparición de un brote infeccioso se vuelve indefinidas, por lo tanto este punto se convierte en una desventaja incontrolable que de cierto modo orienta al mal uso y mal gerenciamiento de antimicrobianos con un enfoque profiláctico, esto repercute esencialmente en las tasas de curación y en el descarte de un gran número de animales (Arteaga *et al.*, 2017).

2.11.5.5. En la industria alimenticia.

De manera general se sabe que la presencia de trazas de medicamentos en determinados alimentos influyen de manera negativa en su industrialización y manufacturación, especialmente en aquellos donde se requiere de manera estricta la aplicación de biotecnología para que sea menos perecibles, un claro ejemplo son los productos lácteos que pasan por un proceso de fermentación para aumentar su resistencia su consumibilidad en función al tiempo, además se sabe que las trazas de medicamentos en ciertos alimentos pueden repercutir en la salud de los consumidores ya que se asume que aproximadamente el 10% de la población mundial presente reacciones de hipersensibilidad a determinados alimentos originados en primer plano por la presencia esencialmente de algún tipo de antibiótico (Durán *et al.*, 2020).

Una manera de contrarrestar los posibles impactos negativos que originan los medicamentos en la industria alimentaria ha sido mediante la regularización por

parte de los entes gubernamentales para establecer estatutos de comercialización de materias primas de origen animal libres de trazas de medicamentos especialmente de antibióticos y que a nivel de la unidad productiva se respeten los periodos de retiro y metabolismo de estos agentes medicamentosos (Garrido & Barat, 2021).

2.11.5.6. Propiedades acidogénicas.

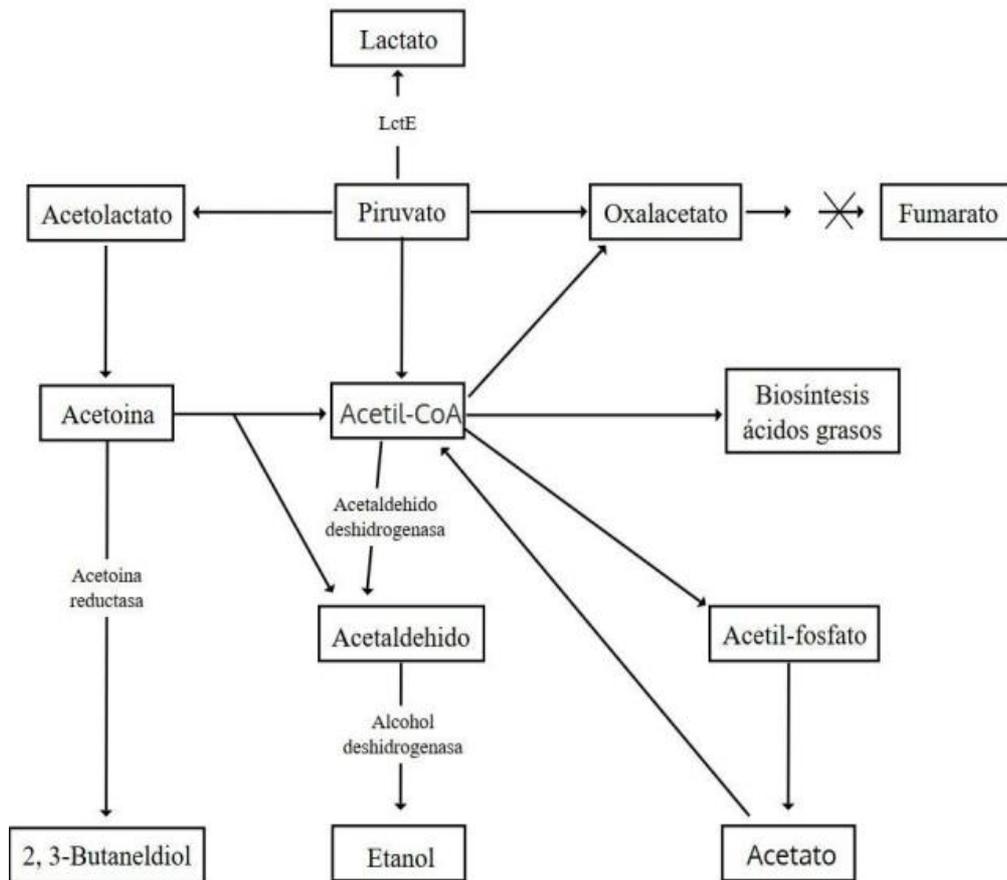
Dentro de las bacterias acidogénicas se puede destacar a los *Lactobacillus* spp, al *Bacillus subtilis*, etc., los cuales son microorganismos gram positivos aerobios obligatorio en forma de bastón, es generalmente reconocido como una fuente terapéutica alternativa segura por parte de la FDA, ya que ha sido desarrollados numerosos ensayos investigativos que ha conllevado a categorizar a este tipo de bacterias como una de las mas estudiadas a nivel mundial, este tipo de bacterias poseen características únicas en su metabolismo como la facultad de poseer el operón RABCD cell el cual permite a la célula bacteriana amonificar el nitrato a partir de la codificación de una enzima llamada EII permeasa y una proteína de nombre fosfo-beta-glucósida que le permite utilizar fuentes alternativas de carbono para generar ATP como único producto glicogénico, es destacable mencionar que los ácidos producidos en mayor medida por parte del *Bacillus subtilis* son el L-lactato y el 2;3 butanodiol los cuales son metabolitos producidos por la nutrición de esta bacteria (Cedena, 2020).

Molecularmente debemos saber que la característica de producir ácido láctico por parte de este tipo de microorganismos catalogados como probióticos se encuentra dependiendo de la expresión del gen *lctE* ubicado en el locus *lctEP* el mismo que permite a las enzimas lactato deshidrogenasa y lactato permeasa ser codificadas, las cuales actúan en función a sus características proteicas como vehículos de transporte de iones para la catálisis y formación de lactato en base al piruvato, con su respectiva transferencia del anión hidrogenico. (Castillo, 2020).

Esta formación y producción de ácidos se asume que es el principal mecanismos que posee las bacterias acidolácticas de acondicionar el medio de crecimiento, además, también se les atribuye a esta característica la capacidad de antagonizar el crecimiento de otro tipo de microorganismos que generalmente suelen ser patógenos y que no toleran los medios ácidos (Vikromvarasiri *et al.*, 2022).

Figura 3.

Ruta metabólica acidogénica del Bacillus subtilis.



Nota. Tomado de Román, (2018).

Las variaciones en la expresión de los genes antes mencionados y sus mutaciones pueden inferir de manera negativa en la producción de ácidos por parte de las bacterias acidolácticas, incidiendo también en su capacidad antimicrobiana, antagónica, y en su utilización benéfica en ciertos procesos de industrialización (Crowe-McAuliffe *et al.*, 2018).

2.11.5.7. Susceptibilidad antimicrobiana del *Bacillus subtilis*.

Todorova *et al.* (2020) reporta que los diámetros de las zonas de inhibición se determinan en mm, mediante el método de difusión en pocillo, y cuando los microorganismos de prueba tienen zonas de un tamaño son considerados como;

Tabla 7.

Categoría interpretativa de la zona de inhibición del Bacillus subtilis.

<i>Bacillus subtilis</i>	
	Halo de inhibición (mm).
Sensibles	≥ 18
Medianamente sensibles	12 – 17
Resistentes	≤ 12

Tomado de Dimitrov & Gigova (1978).

2.12. Probiótico

Es determinado como un complemento alimenticio conformado por microorganismos vivos o atenuados o a su vez porciones bioactivas de microorganismos (esporas, bacteriosinas, ácidos, etc.) el cual está determinado para su administración con fines terapéuticos, en la producción animal se ha considerado para mejorar el rendimiento productivo, debido a sus capacidades de modular la población de agentes patógenos propiciando una mejor absorción y aprovechamiento de nutrientes a nivel metabólico, estas sustancias también poseen la capacidad de modular las acciones inmunológicas de ciertos agregados de células inmunitarias (Vásquez *et al.*, 2018).

Actualmente se ha focalizado el interés en terapéuticas antimicrobianas alternativas a las tradicionales, considerando entre ellas la fitofarmacología y la utilización de agentes probióticos debido principalmente a la cantidad casi nula de los posibles efectos colaterales y el impacto en terceros que estas alternativas podrían desencadenar, como lo han venido haciendo los antibióticos, actualmente existen diversos agentes bacterianos que se pueden utilizar como probióticos, esto dependerá del propósito y los niveles de producción animal donde serán dirigidos, entre los más comunes encontramos a géneros como *Lactobacillus*, *Streptococcus sp.* *Bifidobacterium sp.* y levaduras tipo *Saccharomyces sp.* Los cuales pueden mejorar los índices de salud de un animal desde un enfoque inclusivo y profiláctico (Castillo *et al.*, 2018)

2.13. Tratamiento de la mastitis

Los antibióticos pueden evitarse sin influir de forma adversa en el resultado de muchos episodios de mastitis clínica. Pero es probable que los protocolos terapéuticos que excluyen el uso de antibióticos tengan un efecto perjudicial en la vaca y en la explotación (Nobrega *et al.*, 2020).

La eficacia del tratamiento antibiótico y la elección del antibiótico dependen del microorganismo patógeno que cause la mastitis clínica, las vacas con mastitis clínica leve y sin crecimiento de bacterias en la leche es poco probable que las beneficie un tratamiento antibiótico, como las vacas con una concentración baja de *E. coli* en la leche (Smulki *et al.*, 2020).

Las vacas con mastitis por *Mycoplasma* o mastitis causada por microorganismos patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Prototheca zopfii* o levaduras es poco probable que respondan al tratamiento antibiótico. Por otra parte, los antibióticos pueden aumentar la resolución de muchos episodios de mastitis estreptocócica o estafilocócica (Dong *et al.*, 2022).

La selección del caso es muy importante para evitar un uso innecesario de los antibióticos, que resulta costoso para el productor y preocupa al consumidor. Cuando los productores no desean o no son capaces de usar los resultados de los cultivos como base para determinar el tratamiento, es probablemente preferible tratar a todas las vacas (que cumplan los criterios de selección) con antibióticos que evitar los antibióticos completamente (Duque *et al.*, 2021).

2.14. Metodologías para evaluar la actividad antibacteriana.

Los métodos laboratoriales utilizados de manera estandarizada para la determinación de la susceptibilidad de un microorganismo en cuestión son dos fundamentalmente, difusión de discos en agar sólido mediante lo establecido por Kirby-bauer el cual tiene variantes en dependencia del estado físico del agente antimicrobiano, y el método de microdilución en placa (Trisia *et al.*, 2018).

Los resultados dependerán del microorganismo probado, la concentración del fármaco probado y las categorías interpretativas señaladas por parte del CLSI quienes proponen los lineamientos en las pruebas de susceptibilidad de diversos

microorganismos y su capacidad de resistir a una concentración mínima de un fármaco en cuestión (Montero *et al.*, 2018).

Tradicionalmente la técnica del antibiograma considera también como difusión de disco, bajo los lineamientos del procedimiento de Kirby Bauer ha sido el que se ha utilizado en mayor medida en todos los laboratorios a nivel mundial ya que esta metodología es sencilla, practica y rápida, cuya interpretación se encuentra en función a los valores de las áreas de inhibición del crecimiento bacteriano y las medidas que categorizan la susceptibilidad un agente patógeno según lo establecido por el CLSI, aunque cuando se ha probado concentraciones mínimas de agentes antimicrobianos en estado liquido se ha utilizado la variante de este método en donde se ha propuesto la formación de pocillos en el agar solido (Carrillo *et al.*, 2020).

Es recomendable que se utilice una concentración de una población bacteriana definida para evitar interacciones erróneas entre la concentración del fármaco y la cantidad de bacterias por mL, evitando obtener valores irreales de las zonas de inhibición, generalmente se realiza una calibración del factor de turbidez de MacFarland (1×10^8 UFC/mL) (Galatiuk *et al.*, 2020).

2.14.1. Método de difusión.

Es un método cuantitativo que permite obtener medidas precisas del nivel de inhibición que presenta agente químico o farmacológico cuando inhibe el crecimiento de un microorganismo, estas medidas deben ser correlacionadas con las categorías interpretativas de susceptibilidad puntualizadas por el CLSI el cual permite establecer si un agente bacteriano es sensible, resistente o medianamente resistente.

El fundamento de la técnica aplicada se origina con la utilización de discos de papel filtro de Whatman impregnados con una concentración determinada de antibiótico los cuales son sembrados en la superficie del agar Müeller Hinton posteriormente que se halla sembrado una dilución de bacterias que pretenden ser estudiadas (Mohamed *et al.*, 2019).

Los puntos de corte para la lectura de un antibiograma se detallan a continuación (Cantón, 2020):

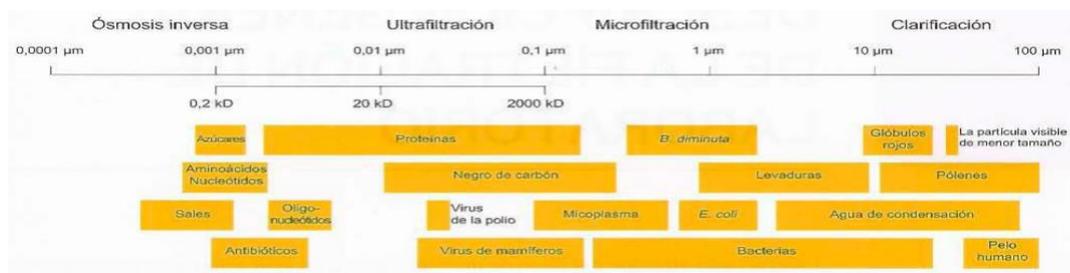
- **Sensible:** una cepa bacteriana se define como sensible cuando en los ensayos de susceptibilidad es inhibido por la concentración mínima estipulada por el CLSI de un fármaco en cuestión fundamentada en la medida del halo encontrado, este hallazgo garantiza el éxito terapéutico.
- **Intermedio:** Se cataloga como intermediamente resistente a la cepa bacteriana que puede ser inhibida en las pruebas in vitro con una medida relativamente ajustada al punto de corte, sin embargo, en las pruebas in vivo debe considerarse que no se obtendrá el nivel terapéutico deseado o resulta ser incierto.
- **Resistente:** El punto de corte y la medida del halo de inhibición del crecimiento bacteriano obtenida permite establecer este criterio, considerando que una cepa es resistente cuando la concentración del fármaco estudiado no es la suficiente para inhibir completamente a la bacteria, generalmente las probabilidades de éxito terapéutico son nulas (Meroni *et al.*, 2020).

2.14.2. Métodos de filtración por membrana.

Es una técnica que se utiliza para filtrar partículas microscópicas de muestras de cultivos en caldo o agua contaminada, esta técnica tiene la ventaja de separar componentes en función al tamaño del poro y el requerimiento, la técnica se fundamenta en el uso de una membrana que cumple la función de un microtamiz, esta membrana posee un poro de un tamaño determinado, esta membrana se encuentra en medio de una circuito de vacío o succión y el fluido a filtrar, la cantidad de filtrado y la fuerza de vacío serán establecido por el técnico microbiólogo y el procedimiento a realizarse (Soto *et al.*, 2020).

Figura 4.

Porosidad de la membrana y su relación en la retención de partículas



Nota. Tomado de T.C.I. (2009).

Otro uso que determina esta técnica es la esterilización mediante la retención de microorganismos y sólidos contaminantes, en donde el mínimo requerido de tamaño de poro para este aplicativo es un poro de $0.22\mu\text{m}$. (Jaimes, 2018).

2.14.3. Microfiltración.

2.14.3.1. Porosidad de la membrana.

La técnica de microfiltrado por vacío requiere la utilización de una membrana cuyas características debe cumplir con ciertos requerimientos en función a las actividades propuestas, considerando que su principal función se asemeja a la de un tamiz en donde permite el filtrado de ciertas partículas, esta retención esta determinada principalmente por el tamaño en la porosidad de la membrana que se encuentre definido, en el mercado se pueden hallar membranas de filtrado con numerosas medidas de poros conociendo que pueden determinarse medidas entre $0,025\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$ pudiendo llegar hasta $8\mu\text{m}$, se sabe que las medidas mas reducidas de poros generalmente suelen utilizarse para procedimientos de biología molecular como la microdialisis de complejos proteicos del ADN, también para filtración de ácidos nucleicos y determinantes proteicas, así como también se puede utilizar como un filtro esterilizante mediante la retención de partículas contaminantes de diferentes índoles (Gomez *et al.*, 2019).

2.14.3.2. Compatibilidad química

La filtración mediante la utilización de micromembranas de filtrado en el campo investigativo también puede utilizarse con propósitos de separación de soluciones y estandarización de complejos, un claro ejemplo es la separación de sustancias que químicamente no suelen ser tan compatibles, que sin embargo se encuentran fusionadas en una solución, dentro de esta las soluciones liquido-gaseosas, fluidos con diferencia en su densidad, etc, convenientemente se puede hallar de manera comercial membranas de microfiltrado con afinidad química por ciertas sustancias, un ejemplo son las membranas hidrofóbicas o Flooropore las cuales permite retener o filtrar sustancias a partir de muestras de solventes orgánicos, otro ejemplo son las membranas que filtran en menor medida las proteínas de gran tamaño como las Durapore, en términos generales existen muchas membranas con distintos niveles de utilidad y aplicación (Herrera & Méndez, 2021).

2.15. Espectrofotometría.

Es un ensayo laboratorial el cual se fundamenta en determinar la cantidad de absorbancia que contiene una muestra a analizar, el principio de esta técnica se fundamenta en la retención de luz que se fija entre un rayo de luz y un sensor, considerando que es fundamental considerar la densidad de la muestra determinada por disolución, esto nos permite saber la cantidad de solutos suspendidos en una solución. (Valladares, 2020).

La espectrofotometría mide principalmente la cantidad de luz con espectro UV visible que atraviesa un fluido compuesto, existen determinantes para su determinación como la longitud de onda, y la calibración de la absorbancia, además de las características físicas de la muestra como pH, constante dieléctrica, fuerza iónica, densidad proteica, coloración etc., es una metodología determinante y fundamental para observar la cinética molecular de un fluido (Martínez, 2019).

2.15.1. Transmisión de la espectrofotometría.

Es un factor o un parámetro que indica la cantidad de luz emanada y la cantidad de luz recibida por el sensor cromóforo, el mismo que detecta la cantidad de luz recibida y la cantidad de luz retenida por la muestra, este parámetro es considerado de manera proporcional, sin embargo es importante destacar que el porcentaje de transmisión no es paralelo a la concentración de un soluto presente en la muestra, por que se debe considerar su cálculo logarítmico inverso (Restrepo, 2021).

2.15.2. Absorbancia de la espectrofotometría.

Entre las características y parámetros que se determinan en los ensayos la absorbancia es un factor vinculado a la muestra, este se determina en dependencia de cuanta luz logro absorber la misma, logarítmicamente se determina como el factor calculable de la transmisión (Rojas *et al.*, 2022).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

3.1.1. Localización de la investigación

Tabla 8.

Localización de la investigación.

País	Ecuador
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	Km 1 ½ vía San Simón

3.1.1.1. Situación geográfica y climática.

Tabla 9.

Situación geográfica del lugar de la investigación.

Parámetros Geográficos del laboratorio	
Altitud	2608.00 metros
Latitud	1°36'20"S
Longitud	79°00'02"O
Temperatura máxima	20 ° C
Temperatura mínima	10 ° C
Temperatura media anual	14° C
Precipitación media anual	1620 mm ³
Humedad relativa (%)	70 %

Nota. Tomado de INAMHI (2019)

3.1.1.2. Zona de vida

Los datos de sistematización de zonas de vida publicados el geólogo dr. Leslie Holdridge, la zona cantonal de Guaranda se clasifica como una formación Bosque Húmedo Montano Bajo (Holdridge, 1967).

3.2. Metodología

3.2.1. Material experimental

- *Bacillus* spp
- *Bacillus subtilis* ATCC 6051
- *E coli*
- *Klebsiella* spp
- *Staphylococcus aureus*

3.2.2. Factores en estudio

Mediante difusión directa en placa y difusión del filtrado se utilizó al *Bacillus spp* tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ como agente antagónico de *Staphylococcus aureus*, *E coli*, y *Klebsiella* spp. aisladas de infecciones intramamarias (mastitis).

- **Factor A**

A1= Método de difusión directa

A2 = Método de difusión del filtrado

- **Factor B**

B1= Cepas de *Bacillus subtilis* 100 µL

B2= Cepas de *Bacillus spp* tipo silvestre 100 µL

- **Factor C**

C1= Cepas de *Escherichia coli*

C2= Cepas de *Klebsiella spp*

C3= Cepas de *Staphylococcus aureus*

3.2.3. Tratamientos

Tabla 10.

Descripción de la interacción de factores y tratamientos en estudio.

Tratamiento	Interacción	Descripción
0	-	Discos de Neomicina + aislados patógenos
1	a1b1c1	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Escherichia coli</i>
2	a1b1c2	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Klebsiella spp</i>
3	a1b1c3	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
4	a1b2c1	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus s spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Escherichia coli</i>
5	a1b2c2	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Klebsiella spp</i>
6	a1b2c3	Difusión directa + Cepas de <i>Bacillus spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
7	a2b1c1	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Escherichia coli</i>
8	a2b1c2	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Klebsiella spp</i>
9	a2b1c3	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> + Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
10	a2b2c1	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Escherichia coli</i>
11	a2b2c2	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Klebsiella spp</i>
12	a2b2c3	Difusión del filtrado + Cepas de <i>Bacillus spp</i> tipo silvestre + Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>

Nota. Experimental Quincha & Galeas (2023).

3.2.4. Tipo de diseño

- Se desarrolló un diseño con arreglo factorial de tres factores, para observar el comportamiento en los ensayos antimicrobianos, con ayuda del siguiente modelo; $Y_{IJK} = M + a_i + B_j + y_K + aB_{ij} + ay_{ik} + B\gamma_{jk} + aB\gamma_{jk} + E_{ijk}$

Donde:

M: es el valor promediado de manera general de la investigación.

ai: Referencia del resultado provocado por el i-ésimo nivel del factor A.

Bj: Referencia del resultado provocado por el j-ésimo nivel del factor B.

yk: Referencia del resultado provocado por el k-ésimo nivel del factor C.

α_{Bij} : simboliza el resultado de interacción de la combinación ij.

$\alpha\gamma_{ik}$: Referencia del resultado provocado por la interacción en la composición ik.

$B\gamma_{jk}$: Referencia del resultado provocado por la interacción en la composición jk.

$\alpha B\gamma_{jk}$: Referencia del resultado provocado por la interacción en la composición ijk

E_{ijk} : error circunstancial, con $\mu=0$ y $\sigma^2=Constante$, que son independientes sí.

- Prueba de Tukey al 5%, con la ayuda del siguiente modelo matemático;

$$W = q \times \sqrt{\frac{CME}{R}}$$

Donde:

q: amplitud total estudentizada, valor que se obtiene de la tabla Tukey.

CME: cuadrados medios con el error experimental

R: Valor de las repeticiones de los promedios de los tratamientos a ser comparados.

3.2.4.1. Características analíticas del diseño.

Tabla 11.

Características numéricas del diseño.

Tratamientos experimentales	12
Número de bloques (aislados)	5
Tamaño de la U.E.	100 μ L
Aislados totales (3 géneros)	15
Número total de análisis	60

Nota. Experimental Quincha & Galeas (2023).

3.2.4.2. Desarrollo del ANOVA

Tabla 12.

Paramétricas del Análisis de varianza (ANOVA).

Fuente de Variación	Formula GL	G.L
Fac. A	$a - 1$	1
Fac. B	$b - 1$	1
Fac. C	$c - 1$	2
AxB	$(a - 1) (b-1)$	1
AxC	$(a-1) (c-1)$	2
BxC	$(b-1) (c-1)$	2
AxBxC	$(a-1) (b-1) (c-1)$	2
Error	$A*b*c (n-1)$	48
Total	$Abcn-1$	59

Nota. Experimental Quincha & Galeas (2023).

3.2.5. Manejo del experimento

- **Reanimación de las bacterias en estudio:**

Las cepas en estudios, se obtuvieron del cepario existente en el laboratorios general de la facultad de Ciencias Agropecuarias de trabajos investigativos anteriormente realizados, donde se tomó el criovial que contiene a la bacteria a estudiar conservada a 2°C en una solución Broth nutriente + glicerina, la correcta manipulación de dicho criovial inició con la exposición a temperatura ambiente para un correcto proceso de destiempo térmico, después, se introdujeron los crioviales seleccionados a la incubadora a 37°C por el lapso de 1 hora, transcurrido este periodo de tiempo se suspendió 100 µL en el caldo utilizado como medio de cultivo (MR-VP), luego se procedió a incubar por 24 hora a 37°C, para la obtención de cepas totalmente revitalizadas, en lo referente al *Bacillus subtilis* ATCC® 6051, fue obtenido e importado mediante la casa comercial MEDIBAC™, y se reanimó en función a las instrucciones del distribuidor de la patente.

La resiembra o cultivos secundarios se realizaron una vez transcurrido el periodo de incubación de 24 – 48 horas, en donde se inició con la preparación de medios de

cultivos; Agar MacCkey (Enterobacterias), Agar sal-manitol (*S. aureus*), Agar tripticasa soja y lactobacilli MRS Broth (*Bacillus sp.*), donde se suspendió 100 µL del cultivo anteriormente mencionado, con la ayuda de un hisopo estéril se difundió por toda la superficie del agar, posteriormente se incubó por 24 horas a 37°C.

- **Obtención del filtrado.**

Para la obtención del filtrado microbiano se tomó 1000 µl del cultivo inicial bacteriano en caldo de *Bacillus spp.* Tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (broth MRVP y MRS), separando 1 mL en viales Eppendorf, posteriormente cada vial se sometió a centrifugación a 6000 rpm/minuto durante al menos de 5 a 8 minutos, posteriormente se realizó el filtrado del paquete líquido con un circuito Millipore por medio del uso de una membrana de microfiltración de 0.22 µm (Millipore®) (Cizeikiene *et al.*, 2013).

- **Evaluar la susceptibilidad.**

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas en estudio mediante dos metodologías establecidas por Kirby Bauer; Difusión directa y la difusión del filtrado de cultivos en Broth. El método de difusión para establecer la susceptibilidad se realizó mediante difusión en agar por pocillo, en agar Müeller-Hinton se cultivó cepas con un ajuste de 0.5 McFarland, de *S. aureus*, *E. coli* y *Klebsiells spp.* aisladas de muestras de mastitis bovina, previo a su cultivo, se realizó pocillos de alrededor de 6 mm en el medio de cultivo (MH) utilizando un microtubo de vidrio de dicha medida, luego de la inoculación se depositó 100 µL de *Bacillus spp.* tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 para la definición de los métodos difusión directa y difusión del filtrado respectivamente, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura de refrigeración (2-4°C), luego se incubó por 24 h a 37°C.

- **Medir la curva de crecimiento de *Bacillus spp.* tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051™.**

Se procedió a medir mediante un espectrofotómetro nanodrop, el cual midió la cantidad de absorbancia (ABS%) en cada uno de los cultivos bacterianos que se utilizaron como agentes antagónicos (*Bacillus spp.* tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051™) del crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *Klebsiells spp.*, esto con la finalidad de evaluar cual de los dos géneros bacterianos “benéficos” expresaron una

cinética de crecimiento mas eficiente en cada una de sus fases de crecimiento, en función al tiempo de incubación (Castañeda & Sánchez, 2016). En primera instancia se realizó caldo de cultivo estéril (Broth MRS y MR-VP), el mismo que se inoculó con los *Bacillus* considerados y que tenía un periodo de incubación previo para determinar el máximo de absorbancia (ABS%), así mismo se utilizó los cultivos sin crecimiento para calibrar el espectrofotómetro o trazar la medición de cero, las mediciones se realizaron cada 4 H hasta cumplirse las 28 H de medición.

3.2.6. Métodos de evaluación y datos a tomarse

- **Reanimación de *Bacillus* spp:** es una variable de tipo independiente, la cual se midió de manera subjetiva en función al tipo de *Bacillus* Grampositivo que se consideraron para las pruebas de susceptibilidad, ya que se realizaron utilizando al *Bacillus subtilis* ATCC 6051 y *Bacillus* spp., tipo silvestre mediante el crecimiento en el medio MRS.
- **Efecto inhibitorio:** variable de tipo dependiente, que se evaluó tomando en cuenta el efecto inhibitorio que posee los dos tipos de *Bacillus* con la finalidad de incidir en el crecimiento de un patógeno provocando su inhibición, dicha variable se desarrolló mediante el registro de las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición en el antagonicograma.
- **Susceptibilidad:** variable dependiente que se evaluó comparando las zonas de inhibición con los puntos de corte establecidos por Dimitrov & Gigova, (1978), considerándose resistentes evidencias de halos ≤ 12 mm, medianamente sensibles medidas de 13 – 17 mm y sensibles halos de ≥ 18 mm.
- **Curva de crecimiento:** Método de evaluación dependiente, la que se registró considerando la medición del crecimiento de los *Bacillus* Gram positivos antes mencionados, con espectrofotometría a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 28 horas, midiendo la absorbancia (ABS %), con una longitud de onda calibrada en 560- 600 nanometros, y el factor calibrado a 0.9. según lo citado por (Agudelo *et al.*, 2016).

3.2.7. Análisis de dato

La operacionalización de los resultados se realizó en el programa estadístico SPSS aplicando las herramientas del diseño trifactorial.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Reanimación de cepas de *Bacillus* spp. tipo silvestre

Tabla 13.

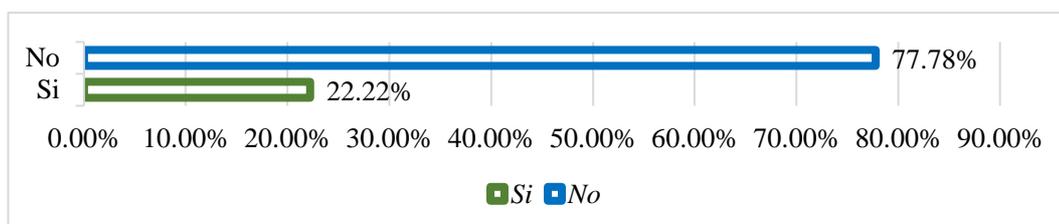
Reanimación y caracterización de Bacillus spp., aislados de mastitis bovina.

No	Código	Crecimiento en caldo MRS	
		Si	No
1	D002PD		✓
2	EA013AD		✓
3	AR005AI		✓
4	AR006AD		✓
5	AR007AD		✓
6	AR011PD	✓	
7	AR012AI		✓
8	AR023AI		✓
9	AR026PD	✓	
Total		2	7

Nota. MRS: caldo de crecimiento bacteria M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe).

Figura 5.

Porcentaje de reanimación de Bacillus spp., en caldo MRS.



Nota. MRS: caldo de crecimiento bacteria M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe).

De la batería de bacterias se seleccionaron los viales de criopreservación de *Bacillus* spp., tipo silvestre aislados de mastitis bovina en la investigación de Mazón & Mazón (2022), considerando que para la presente investigación del total de aislados se utilizaron 2 cepas (22.22%) que fueron caracterizadas como productores de ácido láctico, mediante la utilización del caldo de cultivo MRS apropiado para el crecimiento de bacterias ácidos lácticas, mientras que 7 aislados (77.78%) restante no se lograron reanimar en dicho medio de cultivo, por lo cual no se consideraron para estudio.

4.2. Estudio de varianza del efecto inhibitorio de los tratamientos en estudio de *Bacillus* frente patógenos comunes causantes de mastitis bovina.

Tabla 14.

Estudio de la interacción de los tratamientos en estudio mediante diseño factorial con arreglo de tres factores.

FV	GL	SC	CM	F-Valor	Sig.
Modelo corregido	11	4911.383 ^a	446.489	377.315	0.000**
Intersección	1	11288.817	11288.817	9539.845	0.000**
A (Dd:Df)	1	487.350	487.350	411.845	0.000**
B (Bs:B)	1	3985.350	3985.350	3367.901	0.000**
C (Ec:K:Sa)	2	103.233	51.617	43.620	0.000**
A * B	1	0.817	0.817	0.690	0.410NS
A * C	2	176.700	88.350	74.662	0.000**
B * C	2	85.900	42.950	36.296	0.000**
A * B * C	2	72.033	36.017	30.437	0.000**
Error	48	56.800	1.183		
Total	60	16257.000			
Total corregido	59	4968.183			
			R ² = 0.989 (R ² ajustada = 0.986)		

Nota. **: Diferencias estadísticas altamente significativas, Factor A: (Dd: difusión directa, Df: difusión del filtrado), Factor B: (Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, B: *Bacillus* spp tipo silvestre), Factor C (Ec: *Escherichia coli*, K: *Klebsiella* spp., Sa: *Staphylococcus aureus*).

Mediante el procedimiento del cálculo del ADEVA del diseño factorial con arreglo de tres factores podemos determinar que existió un efecto estadístico altamente significativas ($P < 0.01$) observado hacia el modelo corregido y la intersección de los siguientes factores (A*C, B*C y A*B*C), interpretando de tal modo que la interacción de los factores determinaron parámetros de inhibición diferentes en el antibiograma realizado frente a los patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp y *E coli*,) consideradas para el estudio, así mismo, observamos que los métodos (difusión directa y difusión del filtrado) utilizados, expresaron un efecto estadístico altamente significativo, demostrando que el método de difusión directa versus la difusión del filtrado expresaron distinto efecto inhibitorio.

Al analizar la asociación existente entre el factor A * factor B (método de difusión * tipo de *Bacillus*), observamos que no se exhibió un efecto estadístico significativo ($p > 0.05$), demostrando que al aplicar cada uno de los métodos en donde se utilizó

al *Bacillus* spp., tipo silvestre se obtuvo un similar efecto inhibitorio, de igual manera al observar el comportamiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6051 podemos inferir que, independientemente del método de difusión utilizado, el diámetro de las zonas de inhibición propiciadas por los agentes antagónicos mencionados fueron similares sobre las unidades experimentales consideradas para el estudio.

Con un R² del 98% otorgando confiabilidad y admisión a los resultados obtenidos durante la experimentación.

En la investigación de Fuentes *et al.* (2022) de la actividad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra *S entérica*, quien aplicó un DCA con arreglo de 3 factores, en donde obtuvo divergencias estadísticas en los efectos inhibitorios (**) de los microorganismos en estudio por el método (difusión directa y difusión del filtrado) aplicado. Comparativamente se observó el mismo efecto inhibitorio durante la fase experimental del presente trabajo investigativo probado mediante un arreglo factorial.

Tabla 15.

Comparativa de los promedios según Tukey al 5% de los valores registrados de las zonas de inhibición en cada interacción factorial.

Tratamientos	Subconjunto							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6 = (Dd+B+Sa)	0.60							
5 = (Dd+B+K)	0.80							
10 = (Df+B+E)		5.00						
4 = (Dd+B+E)		6.40						
11 = (Df+B+K)			9.00					
12 = (Df+B+Sa)				11.60				
1 = (Dd+Bs+E)					16.60			
2 = (Dd+Bs+K)						20.40		
3 = (Dd+Bs+Sa)						20.40		
7 = (Df+Bs+E)						20.80		
8 = (Df+Bs+K)							24	
9 = (Df+Bs+Sa)								29

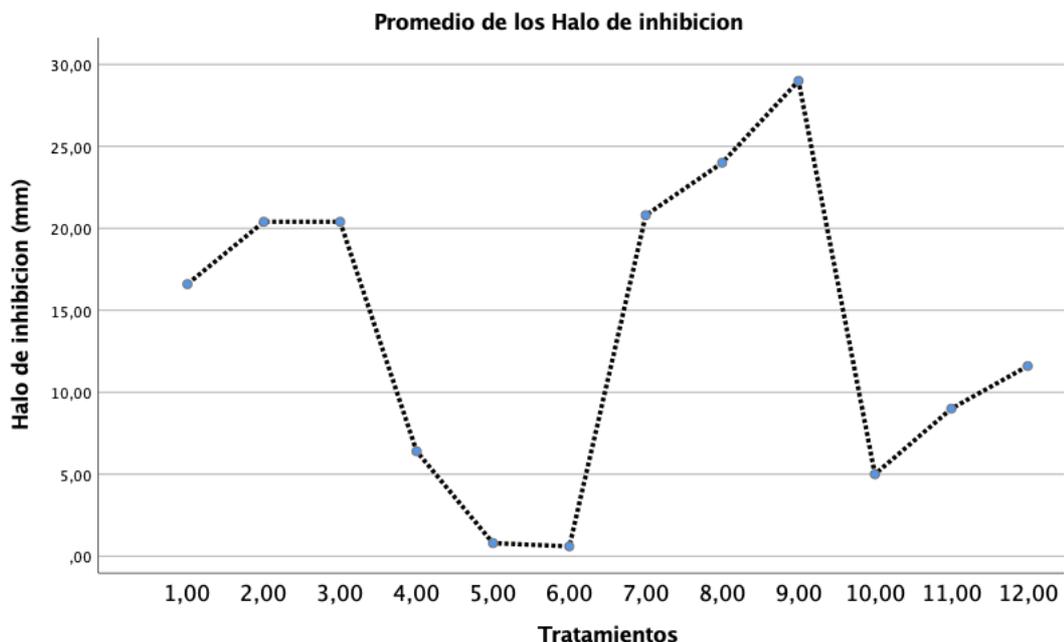
Nota. Los promedios agrupados en el mismo subconjunto no son estadísticamente diferentes. Dd: difusión directa, Df: difusión del filtrado, Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, B: *Bacillus* spp tipo silvestre, Ec: *Escherichia coli*, K: *Klebsiella* spp., Sa: *Sataphylococcus aureus*.

Al comparar los promedios obtenidos se evidenció que T9 exhibió la mayor medida del área de inhibición con una media de 29 mm, el cual expresó diferencias significativas en relación con los otros promedios, siguiéndole el T8 con un promedio de 24 mm, adicionalmente los T7, T3 y T2 son estadísticamente iguales con un promedio comparativo igual a 20.80 mm, 20.40 mm y 20.40 mm individualmente en la medida del diámetro del área de inhibición. Adicionalmente el T1 T12 y T11 se consideran estadísticamente diferentes a los promedios de los otros tratamientos, los cuales exhibieron un promedio de 16.60 mm, 11.60 mm y 9.00 mm en el diámetro del área de inhibición respectivamente, así mismo el T4 y T10, son considerados estadísticamente iguales, ya que comparten el mismo subconjunto, estos obtuvieron promedios de 6.40 mm y 5.00 mm en la medición del área de inhibición respectivamente.

Finalmente, el subconjunto 1 determinado por el T5 y T6 obtuvieron los menores promedios en las medidas del área de inhibición, encontrándose que son estadísticamente iguales con promedios de 0.80 mm y 0.60 mm respectivamente.

Figura 6.

Medias marginales estimadas de las medidas de las áreas de inhibición (mm) de los tratamientos experimentados.



Nota. Las medias marginales expresan las medidas de tendencia central considerando la medida del área de inhibición de cada tratamiento estudiado.

En la investigación de Fuentes *et al.* (2022) de la actividad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* frente a *S entérica*, mediante la técnica de Kitby-Bauer bajo los métodos de difusión directa y difusión del filtrado manifestó una media de 18 milímetros, comprendidos como el área de inhibición. Comparativamente son valores inferiores en relación con los obtenidos en la actual experimentación debido a que el resultado inhibitorio propiciada por *Bacillus subtilis* ATCC 6051 por el método de difusión directa y difusión del filtrado frente a las enterobacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp estuvo entre los rangos desde 16.60 hasta 24 mm de zona de inhibición.

Pedraza *et al.* (2020) en su estudio del mecanismo de acción de *Bacillus* spp., contra microorganismos patógenos, menciona que *Bacillus* spp., produce péptidos de síntesis ribosomal (RiPPs), los cuales generan Amilociclina y Mersacidina, que son considerados como los principales responsables de la actividad antagónica contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp., otra de las características benéficas es que los compuestos antimicrobianos pueden estar presente en el filtrado o sobrenadante de un caldo cultivo. Concordando con lo antes mencionado ya que ponemos en evidencia científica que no es necesario el uso de la cepa viva para obtener un efecto inhibitorio.

4.2.1. Estudio de la susceptibilidad de *Escherichia coli* frente a *Bacillus* spp., tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Tabla 16.

Susceptibilidad de Escherichia coli causante de mastitis bovina frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.

Rep	Tra		T1		T4		T7		T10	
	Med.	Sus.								
1 (D003PI)	19	S	6	R	19	S	4	R		
2 (EA006PI)	17	M.S.	8	R	22	S	5	R		
3 (AR001AD)	16	M.S.	5	R	20	S	5	R		
4 (AR013PI)	15	M.S.	6	R	21	S	4	R		
5 (D002PI)	16	M.S.	7	R	22	S	7	R		

Nota. Tra: tratamientos, Rep: repeticiones, Med.: medidas de los halos de inhibición, Sus.: susceptibilidad, S: sensible, MS: medianamente sensible R: resistente.

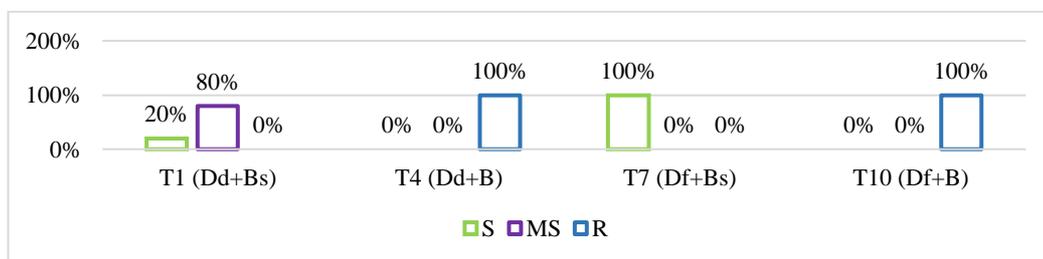
Cuando existe evidencia de medidas de halos ≤ 12 mm el aislado bacteriano se considera como resistente, medianamente sensibles cuando las medidas se encuentran entre 13 mm – 17 mm y sensibles cuando existen medidas de ≥ 18 mm (Dimitrov & Gigova, 1978).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los 5 aislados de *Escherichia coli* se fueron sensibles en la interacción con *Bacillus subtilis* ATCC 6051 mediante el método de difusión del filtrado (T7), mientras que dicha bacteria en la interacción del método de difusión directa (T4) tan solo un aislado de *Escherichia coli* fue sensible, y los 4 aislados restantes se manifestaron como medianamente sensibles.

Los 5 aislados de *Escherichia coli* frente *Bacillus* spp., tipo silvestre tanto en el método de difusión directa (T4) como difusión del filtrado (T10) se exhibieron como resistentes, ya que obtuvieron valores menores a 12 mm del área de inhibición.

Figura 7.

Proporción de la susceptibilidad de E coli causante de mastitis bovina, frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.



Nota. S: sensible, MS: medianamente sensible, R: resistente. Dd: difusión directa, Df: difusión del filtrado. Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, B: *Bacillus* spp., tipo Silvestre.

En la investigación de Manafi *et al.* (2017) sobre la eficacia de *Bacillus subtilis* y su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* intestinal, quienes utilizaron un inóculo de bacterias de 0.5 mL en caldo nutritivo, el cual contenía 10^8 UFC/mL de *Escherichia coli*, observaron que *B. subtilis* disminuyó significativamente la población de *E. coli* a nivel cecal. Concordando con los antes citado, ya que *Bacillus subtilis* ATCC 6051 presentó un mayor porcentaje inhibitorio versus a *Bacillus* spp., tipo silvestre enfrentado a *E coli* que originan cuadros mastíticos.

4.2.1.1. Ensayo comparativo de la actividad antibacteriana entre *Bacillus* y Neomicina contra *E coli* que originan cuadros mastíticos.

Tabla 17.

Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg contra E coli que originan cuadros mastíticos.

Test de normalidad	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadísticogl	Sig.	
Halos inhibición	0.153	25	0.134	0.911	25	0.032*

Nota. *: Divergencias estadísticas.

El ensayo estadístico de Shapiro-Wilk manifestó la existencia de divergencias estadísticas significativas entre los efectos inhibitorios propiciados los tipos de Bacilos y el efecto de la Neomicina a 30µg.

Tabla 18.

Resultados del promedio del área de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) contra E coli que originan cuadros mastíticos.

Repeticiones	Halo de inhibición (mm)
1 (D003PI)	13
2 (EA006PI)	12
3 (AR001AD)	10
4 (AR013PI)	11
5 (D002PI)	12
\bar{X}	11.60

Nota. \bar{X} : promedio o media aritmética.

Los resultados del antibiograma (Kirby-Bauer) donde se utilizó Neomicina a 30µg contra *E coli* expresaron una media general de 11.60 milímetros en las medidas de las áreas de inhibición, comparados con las medidas de las categorías interpretativas del CLSI (2020), quien expresa que cuando hay evidencia de áreas de ≤ 12 mm en el área inhibitoria, *E coli* es resistente, deduciendo de tal modo que el 100% de los patógenos estudiados son resistentes a dicha concentración.

Comparativamente los efectos inhibitorios detallados de la tabla 15 y tabla 16 versus lo obtenido como áreas de inhibición de la tabla 17 observamos que la inhibición bacteriana propiciada por el *Bacillus* spp., tipo silvestre versus Neomicina de 30µg fue inferior debido a su limitado espectro antimicrobiano, sin embargo, la inhibición bacteriana propiciada por *Bacillus subtilis* ACTT 6051 versus Neomicina 30 µg fue superior, tanto en la difusión directa como la difusión del filtrado.

Mohamed & Dawod, (2016) en su investigación sobre la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos que provocan mastitis en vacas lecheras en Egipto, aislaron 112 diferentes géneros bacterianos, donde *Escherichia coli* se aisló en un 32.14%, al realizar el antibiograma observó un 50% de sensibilidad en dichos aislados, mientras que el otro 50% restantes se exhibieron como resistente a la Neomicina de 30 µg. Difiriendo de lo antes mencionado ya que por parte de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 en el antibiograma inhibió en mayor medida a *E coli* en relación a Neomicina de 30 µg, poniendo en manifiesto nuevos hallazgos inhibitorios propiciados por terapias alternativas, que pueden contribuir para la mitigación de la resistencia antimicrobiana de la mastitis.

4.2.2. Estudio de la susceptibilidad de *Klebsiella* spp., frente a *Bacillus* spp., tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Tabla 19.

Susceptibilidad de Klebsiella spp., causante de mastitis bovina frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.

Rep	Tra	T2		T5		T8		T11	
	Halo	S	Halo	S	Halo	S	Halo	S	
1 (EA013AI)	20	Ss	0	R	23	Ss	9	R	
2 (EA007PI)	19	Ss	1	R	25	Ss	8	R	
3 (EA008PI)	21	Ss	0	R	23	Ss	10	R	
4 (EA014AD)	22	Ss	2	R	25	Ss	9	R	
5 (AR015PI)	20	Ss	1	R	24	Ss	9	R	

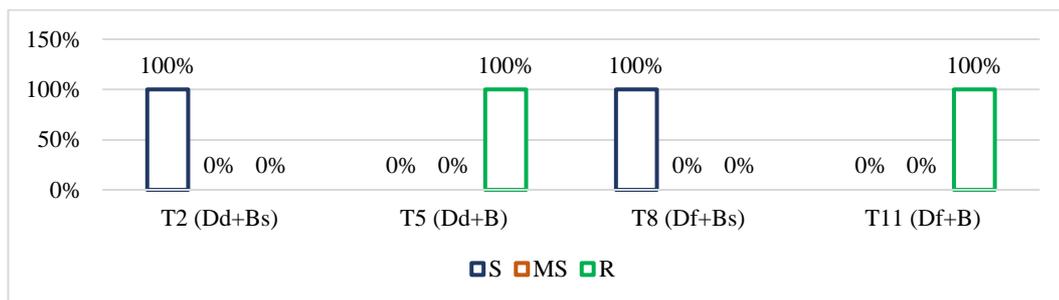
Nota. Tra: tratamientos, Rep: repeticiones, S.: susceptibilidad, Ss: sensible, MS: medianamente sensible, R: resistente.

Cuando existe evidencia de medidas de halos ≤ 12 mm el aislado bacteriano se considera como resistente, medianamente sensibles cuando las medidas se encuentran entre 13 mm – 17 mm y sensibles cuando existen medidas de ≥ 18 mm (Dimitrov & Gigova, 1978).

Al comparar los resultados de la tabla 19, podemos determinar que los 5 aislados de *Klebsiella* spp., se mostraron como sensibles a la actividad antimicrobiana exhibida por el *Bacillus subtilis* ATCC 6051, tanto en la aplicación del método de difusión directa (T2), como el método de difusión del filtrado (T8), sin embargo, los aislados en estudio de *Klebsiella* expresaron ser resistentes al mecanismo antimicrobiano de *Bacillus* spp., tipo silvestre, mediante el método de difusión directa (T5), como la difusión del filtrado (T11.)

Figura 8.

Porcentaje de susceptibilidad de Klebsiella spp., causante de mastitis bovina, frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.



Nota. S: sensibles, MS: medianamente sensibles, R: resistentes. Dd: difusión directa, Df: difusión del filtrado. Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, B: *Bacillus* spp., tipo silvestre.

En una revisión científica no se encontraron estudios similares, pero si la utilización de otros géneros bacterianos considerados como agentes probióticos. En la investigación de Rondón *et al.* (2019) sobre la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp., productores de ácido láctico contra patógenos causantes de cuadros mastíticos en vacas lecheras, en donde observaron que *Klebsiella* spp., fue inhibida en una área de 16 milímetros, siendo valore inferiores al compararse con la actual experimentación, tomando en cuenta a los T2 y T8, ya que los resultados de la actividad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 son superiores en relación a los reportados por los autores antes citados.

4.2.2.1. Ensayo comparativo de la actividad antimicrobiano de *Bacillus* versus Neomicina contra *Klebsiella* spp., que originan cuadros mastíticos.

Tabla 20.

*Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg contra *Klebsiella* spp que originan cuadros mastíticos.*

Test de normalidad	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadísticogl	Sig.	
Halos inhibición	0.283	25	0.000	0.849	25	0.002**

Nota. **: Divergencias estadísticas altamente significativas.

El ensayo estadístico de Shapiro-Wilk manifestó la existencia de divergencias estadísticas altamente significativas (**) entre los efectos inhibitorios propiciados los tipos de Bacilos y el efecto de la Neomicina a 30µg contra *Klebsiella* spp.

Tabla 21.

*Resultados del promedio de halo de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) frente a *Klebsiella* spp.*

Repeticiones	Halo de inhibición (mm)
1 (EA013AI)	19
2 (EA007PI)	19
3 (EA008PI)	20
4 (EA014AD)	22
5 (AR015PI)	19
\bar{X}	19.8

Nota. \bar{X} : promedio o media aritmética.

Los resultados del antibiograma (tabla 21) mediante la técnica de kirby-Bauer de la susceptibilidad de *Klebsiella* frente a Neomicina a una concentración de 30µg expresaron una media general de 19.8 milímetros en las medidas de las áreas de inhibición, comparados con las medidas de las categorías interpretativas del CLSI (2020), quienes expresan que cuando hay evidencia de áreas de ≥ 12 milímetros en el área inhibitoria, *Klebsiella* spp., es sensible, deduciendo de tal modo que el 100% de los aislados estudiados son sensibles a dicha concentración.

Comparativamente los efectos inhibitorios detallados en la tabla 19 y tabla 15 versus los obtenidos como áreas de inhibición de la tabla 21 (T0) observamos que la actividad antimicrobiana propiciada por *Bacillus* spp., tipo silvestre fue inferior a la obtenida por Neomicina de 30µg, tanto en el método de difusión directa como en la difusión del filtrado, sin embargo, el efecto antimicrobiano propiciado por *Bacillus subtilis* ACTT 6051 fue superior al efecto inhibitorio generado por la Neomicina 30 µg, tanto en la difusión directa como la difusión del filtrado, esto determinado por la obtención de valores superiores en la zona de inhibición.

En la investigación de Vásquez *et al.* (2018) sobre el análisis de susceptibilidad antimicrobiana de Neomicina frente a 5 aislados de *Klebsiella* spp., causantes de mastitis bovina, obtuvo que 2 aislados (40%) fueron resistentes a dicha concentración, mientras que los 3 aislados (60%) restantes fueron sensibles. Discrepando de los antes citado, ya que en la presente investigación los 5 aislados fueron sensibles a dicha concentración, debido a que dichos valores de las áreas de inhibición obtenidas en los diferentes asilados resultaron superiores a las medidas de las categorías interpretativas del CLSI, (2020), sin embargo, al comparar los valores de los tratamientos en la zona de inhibición, observamos que los valores de las zonas de inhibición de la actividad antimicrobiana del *Bacillus subtilis* ATCC 6051 son superiores a los encontrados en el antibiograma de la Neomicina de 30µg.

4.2.3. Estudio de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a *Bacillus* spp., tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Tabla 22.

Susceptibilidad de S aureus causante de cuadros mastíticos contra Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.

Rep	Tra	T3		T6		T9		T12	
	Halo	S	Halo	S	Halo	S	Halo	S	
1 (AR010PI)	20	Ss	1	R	30	Ss	10	R	
2 (AR018PI)	21	Ss	0	R	29	Ss	11	R	
3 (D001AI)	20	Ss	0	R	27	Ss	12	R	
4 (EA003PD)	21	Ss	2	R	29	Ss	12	R	
5 (EA010PI)	20	Ss	0	R	30	Ss	13	MS	

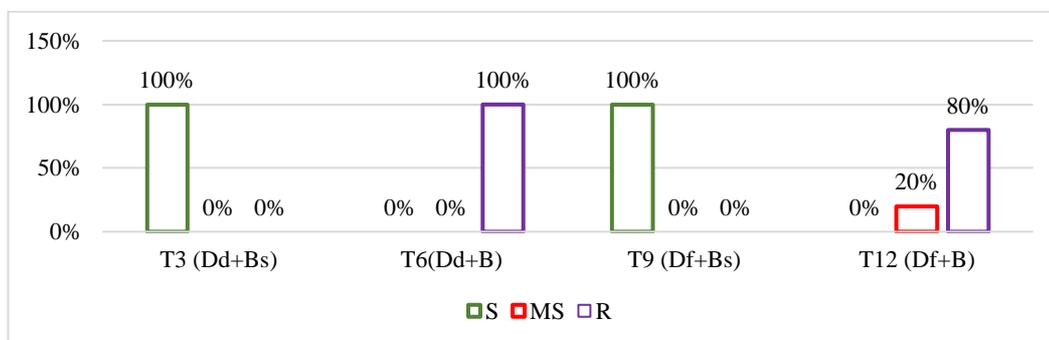
Nota. Tra: tratamientos, Rep: repeticiones, S.: susceptibilidad, Ss: sensible, MS: medianamente sensible, R: resistente.

Cuando existe evidencia de medidas de halos ≤ 12 mm el aislado bacteriano se considera como resistente, medianamente sensibles cuando las medidas se encuentran entre 13 mm – 17 mm y sensibles cuando existen medidas de ≥ 18 mm (Dimitrov & Gigova, 1978).

Al comparar los resultados de la tabla 22, podemos determinar que los 5 aislados de *Staphylococcus aureus* se mostraron como sensibles a la actividad antimicrobiana exhibida por el *Bacillus subtilis* ATCC 6051, tanto en la aplicación del método de difusión directa (T3), como el método de difusión del filtrado (T9), sin embargo, los 5 aislados en estudio se exhibieron como resistentes al mecanismo antimicrobiana de *Bacillus* spp., tipo silvestre, mediante el método de difusión directa (T6), mientras que en el método de difusión del filtrado (T12) se mostraron 4 aislados como resistentes y 1 un aislado fue medianamente sensible a dicho tratamiento.

Figura 9.

Porcentaje de susceptibilidad de Staphylococcus aureus causante de mastitis bovina, frente a Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.



Nota. S: sensible, MS: medianamente sensible, R: resistente. Dd: difusión directa, Df: difusión del filtrado. Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, B: *Bacillus* spp., tipo silvestre.

Según Kimelman & Shemesh (2019) en su investigación sobre la bifunciones probióticas de *Bacillus subtilis* sobre *Staphylococcus aureus* formadores de biofilm, demostró que *Bacillus subtilis* afecta a la formación de biopelículas a través de la interferencia de señales, mediante la producción de fengycins o surfactin originalmente por la expresión de los genes *fenA* y *srfA* en dicha bacteria, esto produce un incrementando de su susceptibilidad a las bacteriocinas que son producidas por el mismo *Bacillus subtilis*,. Comparativamente se puede corroborar

este reporte científico mediante la expresión fenotípica de las áreas de inhibición que determinaron como sensible al *Staphylococcus aureus* que fue sometido al enfrentamiento mediante los métodos de difusión directa y difusión del filtrado del *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Lim *et al.* (2021) quienes demostraron los efectos probióticos del *Bacillus subtilis*, observaron que el *Staphylococcus aureus* fue inhibido en un área aproximadamente 18 milímetros en el área de inhibición, con relación a este hallazgo inferimos que es inferior a lo exhibido en la actual experimentación.

4.1.4.1. Ensayo comparativo en la actividad antibacteriana entre *Bacillus* versus Neomicina frente *S aureus* que originan cuadros mastíticos.

Tabla 23.

Test de normalidad entre los tratamientos en estudio versus a Neomicina de 30µg frente a Staphylococcus aureus causante de mastitis bovina.

Test de normalidad	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	Estadístico	gl	Estadístico	gl
Halos inhibición	0.162	25	0.916	25
				0.041*

Nota. *: Divergencias estadísticas significativas.

El ensayo estadístico de Shapiro-Wilk exhibió la existencia de divergencias estadísticas significativas (*) entre los efectos inhibitorios propiciados los tipos de Bacilos y el efecto de la Neomicina a 30µg contra *S aureus*.

Tabla 24.

Resultados del promedio de halo de inhibición del tratamiento testigo (T0: Neomicina a 30µg) contra S aureus.

Repeticiones	Halo de inhibición (mm)
1 (AR010PI)	10
2 (AR018PI)	12
3 (D001AI)	11
4 (EA003PD)	12
5 (EA010PI)	10
\bar{X}	11

Nota. \bar{X} : promedio o media aritmética.

Los resultados del antibiograma (tabla 24) mediante la técnica de Kirby-Bauer de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a Neomicina a una concentración de 30 µg expresaron una media general de 11 milímetros en las medidas de las áreas de inhibición, comparados con las medidas de las categorías interpretativas del CLSI (2020), quienes expresan que cuando hay evidencias de áreas de ≤ 13 milímetros en el área inhibitoria, *S. aureus* es resistente, deduciendo de tal modo que el 100% de los aislados estudiados son resistentes a dicha concentración.

Comparativamente los efectos inhibitorios detallados en la tabla 22 y tabla 15 versus los obtenidos como áreas de inhibición de la tabla 24 (T0) se observó que la actividad antimicrobiana propiciada por *Bacillus* spp., tipo silvestre fue inferior a la obtenida por Neomicina de 30 µg, tanto en el método de difusión directa (T6) como en la difusión del filtrado (T12), sin embargo, el efecto antimicrobiano propiciado por *Bacillus subtilis* ATCC 6051 fue superior al efecto inhibitorio generado por la Neomicina 30 µg, tanto en la difusión directa (T3) como la difusión del filtrado (T9), esto determinado por la obtención de valores superiores en el área inhibitoria.

De acuerdo a lo que Abdul *et al.* (2014), mencionan en su experimento sobre la sensibilidad de diferentes antibióticos frente a 59 aislados de *Staphylococcus aureus*, la Neomicina de 30 µg obtuvo un 87.93% de sensibilidad y un 12.07% de resistencias con medidas en la zona de inhibición ≤ 13 mm. Comparativamente podemos diferir de lo antes mencionado, ya que los aislados en estudio fueron resistentes a dicho antibiótico, sin embargo, ponemos en manifiesto otra alternativa para el control del *Staphylococcus aureus* causante de mastitis, mediante la utilización de los efectos antimicrobianos que posee el *Bacillus subtilis* ATCC 6051, ya que se observó buenos patrones inhibitorios.

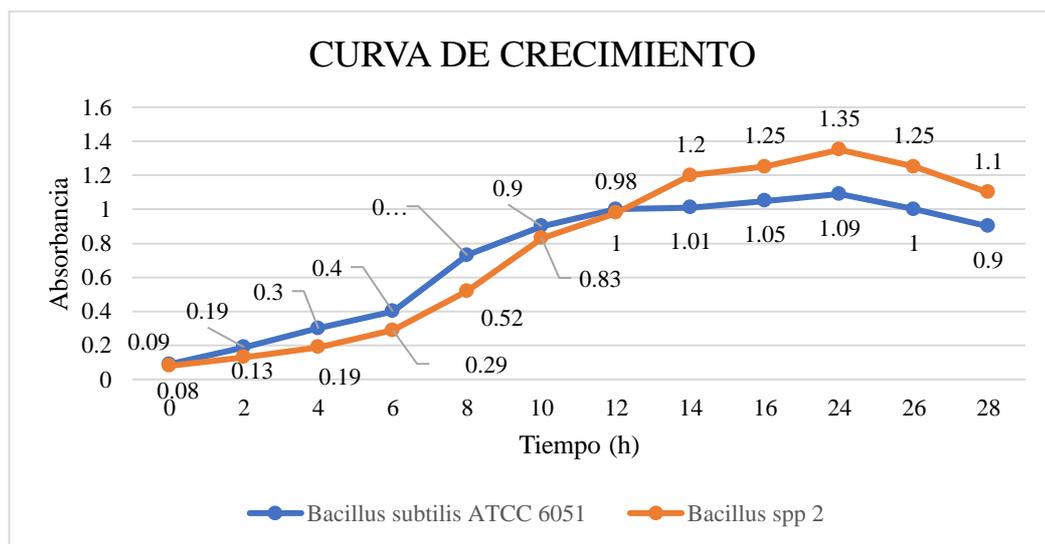
4.1.5. Estimación de la cinética de crecimiento de *Bacillus* spp., tipo silvestre y a *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

El ensayo de la cinética de crecimiento de *Bacillus* spp., tipo silvestre y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 se realizó por medios de espectrofotometría con la ayuda de un espectrofotómetro nanodrop, el cual determinó la absorbancia de cada cultivo

bacteriano en relación al tiempo de incubación, pudiendo apreciarse que el *Bacillus subtilis* ATCC 6051 exhibió mayor absorbancia en la fase exponencial, es decir que la replicación bacteriana es mejor en dicha bacteria, asumiendo existe una mayor población de bacterias en relación al *Bacillus* spp., adicionalmente los dos microorganismos completaron su fase exponencial partir de las 12 horas, iniciando la fase estacionaria, adicionalmente se observó que *Bacillus* spp., tipo silvestre demostró mayor absorbancia a partir de las 14 horas en relación al *Bacillus subtilis* ATCC 6051, es decir que dicha bacteria puede iniciar a su fase estacionaria después de las 14 horas de incubación, manifestando que tiene un crecimiento retardado, y finalmente la fase declive o muerte se expreso después de las 24 horas.

Figura 10.

Curva de crecimiento de Bacillus spp., tipo silvestre y Bacillus subtilis ATCC 6051.



Fuentes *et al.* (2022) demostró que *Bacillus subtilis* inicia el cumplimiento de su fase exponencial desde las 4 horas de incubación, y las 12 horas la fase estacionaria y a partir de las 24 horas un declive o muerte celular, determinando a las 24 horas un máximo de absorbancia de 1.34. Comparativamente son valores muy semejantes a los percibidos en la actual experimentación, sin embargo, podemos observar que *Bacillus subtilis* ATCC 6051 expresó mayor absorbancia en la fase exponencial (0.30) en relación a la investigación citada (0,22), haciendo referencia a una mayor población bacteriana por ende se asume que existe la probabilidad de encontrar una mayor cantidad de compuestos que le otorgan su actividad antimicrobiana.

4.2. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Mediante el ensayo estadístico de H-Kruskal-Wallis utilizado en agrupaciones heterogéneas (diferentes métodos, diferentes organismos probióticos y diferentes bacterias patógenas), el valor de H-Kruskal-Wallis fue de 47.645 el mismo que a nivel de significancia expresa que exhibió divergencias estadísticas altamente significativas (**) en la distribución del área inhibitoria al relacionarlas con la escala de la actividad antimicrobiana, basándose en dicho análisis refutamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alterna (Figura 8), que manifiesta lo siguiente; Existe actividad antibacteriana in-vitro de *Bacillus* spp de tipo silvestre vs *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™. frente a *E coli*, *S aureus* y *Klebsiella* spp causantes de cuadros mastíticos.

Figura 11.

Resumen de la comprobación de hipótesis planteadas en la presente investigación.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Halo es la misma entre las categorías de Actividad.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Tabla 25.

Frecuencias y Promedios de la interacción de la escala de la actividad antimicrobiana de Bacillus spp., en relación con el área inhibitoria.

Actividad Antimicrobiana		N
Diámetro de la zona de inhibición (mm)	Resistente: ≤ 12 mm	29
	Medianamente Sensible: 13-17 mm	5
	Sensible: ≥ 18 mm	26
	Total	60

Nota. N: número de resultados o unidades experimentales.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El proceso de reanimación aplicado a las cepas identificadas como *Bacillus* spp., tipo silvestre el cual fue aislado de casos positivos de mastitis bovina, se realizó en función a las características de crecimiento, ya que como focalización de estudio se reanimó solo las cepas que tenían la capacidad de producción de ácido láctico, esto fue desarrollado con la ayuda del caldo de cultivo MRS, el mismo que permitió el crecimiento de solo de *Bacillus* Grampositivos productores de ácido láctico. Adicionalmente la reanimación del *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™ se realizó bajo las instrucciones del fabricante en caldo nutritivo con digerido pancreático de caseína.
- Conforme a los resultados obtenidos se pueden deducir que el *Bacillus subtilis* ATCC 6051 posee un efecto antimicrobiano sobre todas las bacterias estudiadas, en este sentido de *E coli*, *S aureus* y *Klebsiella* spp. en la interacción del antibiograma tanto en la difusión directa como en la difusión del filtrado.
- El *Bacillus* spp., de tipo silvestre demostró no tener inhibir a las bacterias patógenas estudiadas, las cuales fueron; *E coli*, *S aureus* y *Klebsiella* spp. en la implementación de los métodos de inhibición de difusión directa y difusión del filtrado.
- La curva de crecimiento analizada nos expresó una marcada diferencia en las fases de crecimiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6051 versus al *Bacillus* spp., tipo silvestre, destacando que la patente ATCC6051 posee mayor capacidad de crecimiento en la fase exponencial versus al *Bacillus* spp., de tipo silvestre, asumiendo que dicha diferencia esta determinada por la capacidad metabólica de cada una de los *Bacillus* consideras en estudio.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un estudio de cromatografía líquida para cuantificar los componentes bioactivos como el ácido láctico y bacteriocinas lábiles que se encuentran en el microfiltrado del medio de cultivo en caldo de *Bacillus subtilis* ATCC 6051.
- Estimar la capacidad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a otros géneros bacterianos causantes de mastitis bovina.
- Caracterizar molecularmente las cepas de *Bacillus* spp., de tipo silvestre utilizadas en la presente investigación.
- Incorporar la observación mediante microscopía electrónica ionizada en estudios posteriores, con la finalidad de observar el grado de daño estructural y patrón de lisis de las bacterias patógenas que expuestas a análisis de actividad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, Q., Bansal, K., & Gupta, D. (2014). Subclinical Mastitis In Machine Milked Dairy Farms In Punjab: Prevalence, Distribution Of Bacterian And Current Antibigram. *Veterinary World*, 5(1), pp. 291-294.
- Agudelo, E., Gutiérrez, L., Bedoya, O., & Montoya, O. (2016). Evaluación In Vitro De La Actividad Antimicrobiana De Cepas Ácido Lacticas Comerciales, Sobre Bacterias Cuasante De Mastitis Bovina. *Alimentos Hoy*, 24(38), pp. 79.
- Al-Shawi, S., Dang, D., Yousif, A., Al-Younis, Z., Najm, T., & Matarneh, S. (2020). The Potential Use Of Probiotics To Improve Animal Health, Efficiency, And Meat Quality: A Review. *Agriculture*, 10(10), pp. 452.
- Angarita, M., & Merchán, N. A. (2018). Genes Codificadores Para Enterotoxinas De Aislamientos De Estafilococos Coagulasa Negativos Y Coagulasa Positivos A Partir De Muestras De Mastitis Bovina. *Revista De Investigación En Salud. Universidad De Boyacá*, pp. 205 - 218.
- Arsén, M., Davares, A., Andreevna, S., Vladimirovich, E., Carime, B., Marouf, R., & Khelifi, I. (2021). The Use Of Probiotics In Animal Feeding For Safe Production And As Potential Alternatives To Antibiotics. *Veterinary World*, 14(2), pp. 319.
- Arteaga, F., López, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milian, G., Barrios, V., & Bocourt, R. (2017). Selección E Identificación De Aislados De *Bacillus* spp. Del Tracto Digestivo De Pollos De Traspatio, Con Potencial Probiótico. *Bolívar. Pastos Y Forrajes*, 40(1), pp. 55-64.
- Assaf, D., Steinberg, D., & Shemesh, M. (2020). Efficiency Of *Bacillus subtilis* Metabolism Of Sugar Alcohols Governs Its Probiotic Effect Against Cariogenic *Streptococcus mutan*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 48(1), pp. 1222-1230.
- Ayvazoglu, D., & Eski, P. (2019). Estimación Por Métodos Cuantitativos Del Efecto De La Mastitis Subclínica En Vacas Sobre Algunos Rasgos De

Producción De Leche Con Puntuació Cmt. *Revista Veterinaria Van*, 30(3), pp. 177 - 182.

- Balemi, A., Gumi, B., Amenú, K., Girma, S., Gebru, M., Tekle, M., Kerro, O. (2021). Prevalence Of Mastitis And Antibiotic Resistance Of Bacterial Isolates From Cmt Positive Milk Samples Obtained From Dairy Cows, Camels And Goats In Two Pastoral Districts In Southern Ethiopia. *Animals*, 11(6), pp. 1530.
- Ballesteros, J., & Valdivieso, A. (2018). Estudio De La Problemática Epidemiológica De La Mastitis Bovina En El Cantón Cayambe. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Blum, S., Heller, D., Jacoby, S., Krifuks, O., Merín, U., Silanikov, N., Leitner, G. (2020). Physiological Response Of Mammary Glands To *Escherichia coli* Infection: A Conflict Between Glucose Need For Milk Production And Immune Response. *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1 - 14.
- Bonsaglia, E., Silva, N., Rossi, B., Camargo, C., Dantas, S., Langoni, H., Rall, V. (2018). Molecular Epidemiology Of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (Mssa) Isolated From Milk Of Cows With Subclinical Mastitis. *Microbial Pathogenesis*, 124, pp. 130 - 135.
- Budiarmo, T. Y., Amarantini, C., & Pakpahan, S. (2021). Biochemical Identification And Molecular Characterization Of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Street Foods And Drinks In Yogyakarta Indonesia Using 16s Rrna Gene. *Biodiversitas*, 22(12), pp. 5452 - 5458.
- Cantón, R. (2020). Lectura Interpretada Del Antibiograma: Una Necesidad Clínica. *Formación Médica Continuada*, 28(6), pp. 375-385.
- Carrillo, T., & Díaz, R. (2020). Actividad Antimicrobiana De Extractos Hidroalcohólicos De Hojas De Dos Variedades De *Mangifera indica* L. *Revista Ciencia Unemi*, 13(32), pp. 69-77.
- Castañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación Del Crecimiento De Cuatro Especies Del Género *Bacillus* spp., Primer Paso Para Entender Su Efecto Biocontrolador Sobre *Fusarium* So. *Estrella Nueva*, 14(26), pp. 53-62.

- Castellanos, I., Valandia, J., Gonzáles, M., Varela, D., & Ramírez, E. (2018). Aplicaciones Y Generalidades De Un Espectrofotómetro De Absorción Atómica Aa-700 De Shimadzu (Vol. 1). Bogotá: Ediciones Ean.
- Castillo, P., Betancur, H., & Pardo, E. (2018). Caracterización De Microorganismos Con Potencial Probiótico Aislados De Estiércol De Terneros Brahman En Sucre, Colombia. *Rev. Investig. Vet. Perú*, 29(2), pp. 438 - 448. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14482>.
- Castillo. (2020). Análisis De Modelos Metabólicos A Escala Genómica De *Bacillus Subtilis* Para La Producción De Ácido 3-Indolacético. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cedena, C. (2020). Producción De Ácido Láctico, A Través De La Fermentación De Melaza Tipo C Por *Bacillus subtilis* Mur 1 Para Abastecer A Las Industrias Cosmetológica Y Alimentaria Nacional. Quito.
- Chamchoy, T., Okello, E., Williams, D., Tonooka, K., Glenn, K., Maehana, K., Aly, S. (2022). Bayesian Estimation Of Sensitivity And Specificity Of A Rapid Mastitis Test Kit, Bacterial Culture And PCR For Detection Of *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus* species, And Coliforms In Bovine Milk Samples. *Journal Of Dairy Science*, 105(7), pp. 6240 - 6250.
- Cheng, J., Zhou, M., Nobrega, D., Cao, Z., Yang, J., Zhu, C., Gao, J. (2021). Virulence Profile Of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From 2 Large Dairy Farms In China. *Journal Of Dairy Science*, 104(8), pp. 9027 - 9036.
- Cheng, Z., Palma-Vera, S., Buggiotti, L., Salavati, M., Becker, F., Werling, D., Consortium, G. (2022). Transcriptomic Analysis Of Circulating Leukocyte Obtained During The Recovery From Clinical Mastitis Caused By *Escherichia Coli* In Holstein Dairy Cows. *Animals*, 12(16), pp. 2146.
- Chuqulin, C. (2020). Lima, Perú: Universidad Científica Del Sur.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial Activity Of Lactic Acid Bacteria Against Pathogenic And Spoilage Microorganism Isolated From Food And Their Control In Wheat Bread. *Food Control*, 31(2), pp. 539-545.

- Clsi. (2020). Performance Standards For From Animals Antimicrobial Disk And Dilution Suscetibly Tests For Bacterial Isolated, 5th Edition. Clsi, Vet01s Ed5:2020.
- Cohick, W. (2022). The Role Of The Igf System In Mammary Physiology Of Ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 79, pp. 106709.
- Connelly, M., Weaver, S., Kuehnl, J., Fricke, H., Klister, M., & Hernandez, L. (2021). Elevated Serotonin Coordinates Mammary Metabolism In Dairy Cows. *Physiological Reports*, 9(7).
- Crowe-Mcauliffe, C., Graf, M., Huter, P., Takada, H., Abdeishahid, M., Nováček, J., Haurlyuk, V. (2018). Base Estructural De La Resistencia A Los Antibióticos Mediada By Labacillus Subtilisabcf Atpasa Vmlr. *Academia Nacional De Ciencias*, 115(36), pp. 8978-8983.
- Dalanezi, F., Joaquim, S., Guirmarães, F., Guerra, S., Lopes, B., Schmidt, E., Langoni, H. (2020). Influence Of Pathogens Causing Clinical Mastitis On Reproductive Variables Of Dairy Cows. *Journal Dairy Science*, 103(4), pp. 3648 - 3655.
- Des Roches, A., Lussert, A., Faure, M., Herry , V., Rainard, P., Durand, D., Foucras, G. (2018). Dairy Cows Under Experimentally-Induced Escherichia Coli Mastitis Show Negative Emotional States Assessed Through Qualitative Behaviour Assessment. *Applied Animal Behaviour Science*, 206, pp. 1 -11.
- Dieser, S., Fessia, A., Ferrari, M., Raspanti, C., & Odierno, L. M. (2017). Streptococcus Uberis: Producción In Vitro De Biofilm En Respuesta A Carbohidratos Y Leche Descremada. *Revista Argentina De Microbiología*, pp. 305 - 310.
- Dimitrov, D., & Gigova, D. (1978). Manual For Practical Excercises Of Industrial Medical Microbiology.
- Dong, L., Meng , L., Liu, H., Wu, H., Schroyen, M., Zheng, N., & Wang, J. (Enero De 2022). Effect Of Cephalosporin Treatment On The Microbiota And Antibiotic Resistance Genes In Feces Of Dairy Cows With Clinical Mastitis. *Antibiotics*, 11(1), pp. 117.

- Duque - Madrid, P., Velasco, J., Ceballos, A., López, C., & Carmona, J. (2021). Intramammary Treatment Using Allogeneic Pure Platelet-Rich Plasma In Cows With Subclinical Mastitis Caused By Gram-Positive Bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1 -14.
- Durán, S., Porras, L., & Schmidt, D. (2020). Evaluation Of Agro-Industrial Residues Produced In Costa Rica For A Low-Cost Culture Medium Using Bacillus Subtilis 168. *Tecnología En Marcha*, 33(4), pp. 15-25.
- Fahim, K., Elshaimaa, I., Khalefa, H., Farag, H., & Hamza, D. (2019). Isolation And Characterization Of E. Coli Strains Causing Intramammary Infections From Dairy Animals And Wild Birds. *International Journal Of Veterinary Science And Medicine*, 7(1), pp. 61 - 70.
- Figueroa, D. (2020). Espectrofotometría. *Usmp*, pp. 1-10.
- Filor, V., Seeger, B., De Buhr, N., Von Köckritz-Blickwede, M., Kietzmann, M., Oltmanns , H., & Meibner, J. (2022). Investigation Of The Pathophysiology Of Bacterial Mastitis Using Precision - Cut Bovine Udder Slices. *Journal Dairy Science*, 105(9), pp. 7705 - 7718.
- Franco Meza, F. C. (2020). Prevalencia Y Perfil De Resistencia Antimicrobiana De Bacterias Causantes De Mastitis Aisladas De Leche Cruda Bovina En Un Establecimiento De La Localidad Shoenweide Del Departamento De Presidente Hayes - Paraguay. Especialización En Diagnóstico Veterinario De Laboratorio. Asunción, Paraguay.
- Fuentes, L., Arteaga, F., Hurtado, E., Rondón, A., & Rodríguez, M. (2022). Actividad In Vitro De Bacillus Subtilis Y Lactobacillus Brevis Para Reducir La Colonización De Salmonella Entérica. *Revista Espamciencia*, 13(1), pp. 26-31.
- Fursova, K., Sorokin, A., Sokolov, S., Dzhelyadin, T., Shulcheva, I., Shchannikova, M., Brovko, F. (2020). Virulence Factors And Phylogeny Of Staphylococcus Aureus Associated With Bovine Mastitis In Russia Based On Genome Sequences. *Frontiers In Veterinary Science*, 7, pp. 135.

- Galatiuk, Y., Lakhman, A., Romanishina, T., & Zastulka, O. (2020). Sposib Vyznachennya Chutlyvosti Enterobakteriy Bdzhil Do Probiotyktiv Ta Dezinfiktantiv Metodom Kirbi-Bauera [Un Método Para Determinar La Sensibilidad De Las Enterobacterias De Las Abejas A Los Probióticos Y Desinfectantes Mediante El Método De Kirby-Baue. Patente Ua(143401).
- García, M., Cordeiro, A., Alves, A. C., Daza, C. A., Lechinsky, C., Ramos, F. V. (2022). Klebsiella - Induced Infections In Domestic Species: A Case-Serie Study In 697 Animals (1997 - 2019). *Brazilian Journal Of Microbiology*, 53(1), pp. 455 - 464.
- García, R. (2018). Instrumentos Que Revolucionaron La Química: La Historia Del Espectrofotómetro. *Avances En Química*, 13(3), pp. 79-82.
- Garrido, V., & Barat, B. (2021). Inactivación De Microorganismos Esporulados En Productos Lácteos Mediante Antimicrobianos Naturales Inmovilizados En Sistemas Filtrantes. Universidad Politécnica De Valencia.
- Gelgie, A., Korsa, M., & Dego , O. (2022). Mycoplasma Bovis Mastitis. *Current Research In Microbial Sciences*, 3, pp. 100 - 123.
- Gomez, E., & Ramírez, A. (2019). “Evaluación Técnica De Membranas Compuestas Por Nanofibras De Acetato De Celulosa Para Filtración De Agua Mediante Caracterización Funcional.”. Memorias Del Xxv Congreso Internacional Anual De La Somim.
- Gomez, L., Rodriguez, J., & Olivera, M. (2020). Respuesta Inmune Innata De La Glándula Mamaria. En La Lactancia Vista Desde Múltiples Enfoques. Colombia: *Fondo Editorial Biogénesis*. pp. 89-104.
- Griffioen, K., Velthuis, A., Koop, G., & Lam, T. (2021). Effects Of A Mastitis Treatment Strategy With Or Without On-Farm Testing. *Journal Dairy Science*, 104(4), pp. 4665 - 4681.
- Guio, J., Cruz, Á., & Pérez, J. (2016). Mastitis Granulomatosa: Presentación Clínica. Imagenológica E Histológica. Serie De Casos. *Repertorio De Medicina Y Cirugía*, 25(4), pp. 235 - 240.

- Gussmann, M., Steeneveld, W., Kirkeby, C., Hogeveen, H., Nielen, M., Farre, M., & Halasa, T. (Febrero De 2019). Economic And Epidemiological Impact Of Different Intervention Strategies For Clinical Contagious Mastitis. *Journal Of Dairy Science*, 102(2), pp. 1483 - 1493.
- Haeyoung, J., Young, M., Seung-Hwan, P., & And Soo-Keun, C. (2015). Complete Genome Sequence Of Bacillus Subtilis Strain Atcc 6051a, A Potential Host For High-Level Secretion Of Industrial Enzymes. *American Society For Microbiology*.
- Hambali, I., Bhutto, K., Jesse, F., Lawan, A., Odhah, M., Wahid, A., . . . Jefri, M. (2018). Clinical Responses In Cows Vaccinated With A Developed Prototype Killed Staphylococcus Aureus Mastitis Vaccine. *Microbial Pathogenesis*, 124, pp. 101 - 105.
- Han, G., Zhang, B., Luo, Z., Lu, B., Luo, Z., Zhang, J., Yao, X. (2022). Molecular Typing And Prevalence Of Antibiotic Resistance And Virulence Genes In Streptococcus Agalactiae Isolated From Chinese Dairy Cows With Clinical Mastitis. *Journal Plos One*, 17(5).
- Hernández, C., Aguilera, M., & Castro, G. (2017). Situación De Las Enfermedades Gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 31(4), pp. 137 - 151.
- Herrera, L., & Méndez, T. (2021). Propuesta Para El Aprovechamiento Del Lactosuero Proveniente De La Elaboración De Queso Ricotta Por Medio De Separación Por Membranas. *Fundacion Universidad De América*.
- Hertl, J., Schukken, Y., Tauer, L., Welcome, F., & Gröhn, Y. (2018). Does Clinical Mastitis In The First 100 Days Of Lactation 1 Predict Increased Mastitis Occurrence And Shorter Herd Life In Dairy Cows. *Journal Dairy Science*, 101(3), pp. 2309 - 2323.
- Hoch, J. A. (2017). Life In Bacillus Subtilis Signal Transduction. *Annu Rev Microbiol*, 8(71), pp. 1-19.

- Inaoka, T., Kimura, K., Morimatsu, K., & Yamamoto, K. (2017). Characterization Of High Hydrostatic Pressure-Injured *Bacillus subtilis* Cells. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 81(6), pp. 1235-1240.
- Jaimes, A. (2018). Validación Interna Del Método Filtración Por Membrana Para La Detección Y Recuento De Coliformes Totales Y Escherichia Coli En Muestras De Aguas Residuales, Superficiales Y Subterráneas En Medio Colinstant. Universidad De Pamplona: [Http://Repositoriodspace.Unipamplona.Edu.Co/Jspui/Bitstream/20.500.12744/2419/1/Jaimes_Moreno_2018_Tg%20.Pdf](http://Repositoriodspace.Unipamplona.Edu.Co/Jspui/Bitstream/20.500.12744/2419/1/Jaimes_Moreno_2018_Tg%20.Pdf) .
- Jaramillo, C. (2020). In-Vitro Antifungal And Antibacterial Activity Of The Ethanolic Extract Of Usnea Laevis Against Candida Albicans, Staphylococcus Aureus And Pseudomonas Aeruginosa. *Rev Med Hered*, 31(3), pp. 160-174.
- Jiang, H., Chen, T., Sun, H., Tang, Z., Yu, J., Lin, Z., Yu, X. (2017). Immune Response Induced By Oral Delivery Of Bacillus Subtilis Spores Expressing Enolase Of Clonorchis Sinensis In Grass Carps (Ctenopharyngodon Idellus). *Fish Shellfish Immunol*, 60(1), pp. 318-325.
- Jones, G., Bork, O., Ferguson, S., & Bates, A. (2019). Comparion Of An On-Farm Point-Of-Care Diagnostic With Conventional Culture In Analysing Bovine Mastitis Samples. *Journal Of Dairy Research*, 86, pp. 222 - 225.
- Kabelitz, T., Aubry, E., Van Vorst, K., Amon, T., & Fulde , M. (2021). Ther Role Of Streptococcus Spp. In Bovine Mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1497.
- Karpov, D., Domashin, A., Kotlov, M., Osipova, P., Kiseleva, S., Seregina, T., Poddubko, S. (Jan - Feb. De 2020). Biotechnological Potential Of The *Bacillus subtilis* 20 Strain. *Mol Biol*, 54(1), pp. 137-145.
- Kaur, T. P., Verma, R., & Choudhary, R. (2021). Introduction To Mammary Gland And Its Cell Types. *Stem Cells In Veterinary Science*, pp. 25-37.
- Kimelman, H., & Shemesh, M. (2019). Probiotic Bifunctionality Of Bacillus Subtilis—Rescuing Lactic Acid Bacteria From Desiccation And Antagonizing Pathogenic Staphylococcus Aureus. *Microorganisms*, 7(10), pp. 407.

- Klaas, I., & Zadoks, R. (2018). An Update On Environmental Mastitis: Challenging Perceptions. *Transboundary And Emerging Diseases*, 65, pp. 166 - 185.
- Kovács, Á. (2019). Bacillus Subtilis. *Trends In Microbiology Month*, 30(30), pp. 1-2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>.
- Kumar , P., Dar , Y., & Kumar, A. (2022). Funtional Anatomy Of Cow Mammary Glands With Special Reference To Its Defence Machanism. *International Journal Of Cows Science*, 6(1), pp. 30 - 31.
- Lago, A., & Godden, S. (2018). Use Of Rapid Culture Systems To Guide Clinical Mastitis Treatment Decisions. *Veterinary Clinics Fodd Animal Practice*, 34 (3), pp. 389 - 402.
- Lavon, Y., Leitner, G., Kressel, Y., Ezra, E., & Wolfenson, D. (2019). Comparing Effects Of Bovine *Streptococcus* And *Escherichia coli* Mastitis On Impaired Reproductive Perfomance. *Journal Dairy Science*, 102(11), pp. 10587 - 10598.
- Lavon, Y., Leitner, G., Kressel, Y., Ezra, E., & Wolfenson, D. (2019). Comparing Effects Of Bovine *Streptococcus* And *Escherichia coli* Mastitis On Impaired Reproductive Performance. *Journal Dairy Science*, 102(11), 10587 - 10598.
- Lim, H., Oh, S., Yu, S., & Kim, M. (2021). Isolation And Characterization Of Probiotic Bacillus Subtilis Mkhj 1-1 Possessing L-Asparaginase Activity. *Applied Sciences*, 11(10), pp. 4466.
- López, A., & Mendoza, E. L. (Julio De 2022). Grado De La Mastitis Bovina Y Su Correlación Con El Conteo De Células Somáticas Diferenciadas De Unidades Productivas De La Sierra Norte De La Provincia De Pichincha. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Mahmoudi, F., & Momtaz, H. (2019). Detection Of Capsular Types In Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated From Bovine Mastitis. *Navid*, 22(71), pp. 11 - 18.

- Maity, S., Das, D., & Ambatipudi, K. (2020). Quantitative Alterations In Bovine Milk Proteome From Healthy, Subclinical And Clinical Mastitis During *S. Aureus* Infection. *Journal Of Proteomics*, 223, pp. 103815.
- Manafi, M., Khalaji, S., & Pirany, N. (2017). Efficacy Of Bacillus Subtilis And Bacitracin Methylene Disalicylate On Growth Performance, Digestibility, Blood Metabolites, Immunity, And Intestinal Microbiota After Intramuscular Inoculation With *Escherichia coli* In Broilers. *Poultry Science*, 96(5), pp. 1174-1183.
- Martínez, G. (2019). Análisis Instrumental: Espectrometría De Absorción Atómica (Eaa). Obtenido De: <https://M.Riunet.Upv.Es/Bitstream/Handle/10251/138418/Mart%C3%Adnez%20%20an%C3%A1lisis%20instrumental.%20espectrometr%C3%Ada%20de%20absorci%C3%B3n%20at%C3%B3mica%20%28eaa%29.Pdf?Sequence=1&Isallowed=Y>
- Masis, R., & Jirón, W. (2019). Determinación De La Prevalencia De Mastitis Bovinas A Través Del Método De Conductividad Eléctrica (Draminski Mastitis Detector) En 4 Fincas De La Comarca Panamèrica, Camoapa, Departamento De Boaco, Noviembre 2018. Nicaragua.
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization Of Klebsiella Isolates Obtained From Clinical Mastitis Cases In Dairy Cattle. *Journal Of Dairy Science*, 103(4), pp. 3392 - 3400.
- Mazón, J., & Mazón, D. (2020). Análisis De Resistencia Y Susceptibilidad Antimicrobiana En Bacterias Aisladas De Mastitis Bovina En La Cooperativa Agropecuaria "La Colina", Provincia De Pichincha (Ecuador).
- Mejía, M., Cristóbal, A., Pacheco, J., & Reyes, A. (2022). Bacillus Spp. En El Crecimiento Y Rendimiento De Capsicum Chinense Jacq. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 13(1), pp. 115- 126.
- Mendonça, J., Brito, M., Lange, C., Silva, M., Ribeiro, J., Mendonça, L., & Souza, G. (2018). Prevalence Reduction Of Contagious Mastitis Pathogens In A

Holstein Dairy Herd Under Tropical Conditions. *Journal Of Veterinary Science & Technology*, 9(1), pp. 1-3.

- Meroni, G., Soares, F., & Martino, P. (2020). Actividad Antibacteriana In Vitro De Nanopartículas De Plata De Origen Biológico: Datos Preliminares. *Ciencias Veterinarias*, 7(1), pp. 12.
- Mohamed, N., & Dawod, R. (2016). A Study On Bacterial And Fungal Causes Of Subclinical Mastitis In Dairy Cows. Egypt. *J. Chem Environ Health*, 2(2), pp. 34.
- Mohamed, N., Hazzah, W., & Bakr, W. (2019). Evaluación De Los Resultados De Las Pruebas De Susceptibilidad A Los Antibióticos: ¿Qué Tan Culpable Puede Ser Un Laboratorio. *Revista De La Asociacion De Salud Pública De Egipto*, 94(4), pp. 1-5.
- Montero, M., Vayas, L., Avilés, D. P., & Erazo, V. (2018). Evaluation Of Two Methods For Measuring The Sensitivity Of Growth Inhibition Of The Certified Staphylococcus Aureus Subsp. Aureus Strain. *Rev. Investig. Vet. Perú.*, 29(4), pp. 1543- 1547.
- Nader Filho, A., Ferreira, L., Amaral, L., Rossi Junior, O., & Oliveira, R. (Enero - Marzo De 2007). Sensibilidade Antimicrobiana Dos Staphylococcus Aureus Isolados No Leite De Vacas Com Mastite. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 74(1).
- Nagahata , H., Kine, M., Watanabe, H., Tanaka, A., Takahashi, A., Gondaira, S., & Higuchi, H. (14 De Octubre De 2021). Somatic Cell And Innate Immune Responses In Mammary Glands Of Lactating Cows To Intramammary Infusion Of Bifidobacterium Breve At Pre-Drying Off Period. *The Journal Of Veterinary Medical Science*, 83(12), pp. 1845 - 1851.
- Nalband, S., Kolhe, R., Deshpande, P., Jadhav, S., Gandhale, D., Muglikar, D., Dhandore, C. (2020). Characterization Of Escherichia Coli Isolated From Bovine Subclinical Mastitis For Virulence Genes, Phylogenetic Groups And Esbl Production. *Indian Journal Of Animal Research*, 54(10), pp. 1265 - 1271.

- Narayana, S., Miglior, F., Ali Naqvi, S., Malchiodi, F., Martin, P., & Barkema, H. (2018). Genetic Analysis Of Subclinical Mastitis In Early Lactation Of Heifers Using Both Linear And Threshold Models. *Journal Dairy Science*, 101(12), pp. 11120 - 11131.
- Ncbi. (2022). National Library Of Medicine. Obtenido De National Center For *Biotechnology Information*:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus%20subtilis>
- Neder, V., Calvinho, L., Vitulich, C., & Smulovitz, A. (2021). Identificación De Agentes Patógenos Causantes De Mastitis Bovina Proveniente De Diferentes Provincias De Argentina. *Congreso De Microbiología Veterinaria*, 1(1), pp. 343 - 345.
- Nery, B. L., Fidelis, C. E., Freu, G., De Mattos, B., & Veiga Dos Santos, M. (2021). Evaluation Of Chromogenic Culture Media For Rapid Identification Of Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. *Frontiers In Veterinary Science*, 8, pp. 662201.
- Nobrega, D., Naqvi, A., Dufour, S., Deardon, R., Kastelic, J., De Bruck, J., & Barkema, H. (2020). Critically Important Antimicrobials Are Generally Not Needed To Treat Monosevere Clinical Mastitis In Lactating Dairy Cows: Results From A Network Meta-Analysis. *Journal Dairy Science*, 103(11), pp. 10585 - 10603.
- Notcovich, S. (2021). The Physiology Of The Keratin Plug Formation In The Teat Canal Of Dairy Cattle And Its Interaction With Current And Novel Methods For Prevention Of Intramammary Infections. Turitea, Palmerston North, New Zealand.
- Omore, A., Mcdermott, J., Arimi, S., Kyule, M., & Ouma, D. (1996). A Longitudinal Study Of Milk Somatic Cell Counts And Bacterial Culture From Cows On Smallholder Dairy Farms In Kiambu District, Kenya. *Preventive Veterinary Medicine*, 29(1), pp. 77 - 89.
- Padilla, B., Delgado, S., García, F., Rodríguez, J., & Romero, B. (2016). Diagnóstico Microbiológico De La Infección Bacteriana Asociada Al Parto Y

Puerperio. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(5), pp. 309 - 314.

- Palacios, L., Castañeda, J., Duque, L., & Mazo, R. (2018). Efecto De Los Minerales Traza Sobre El Recuento De Células Somáticas En Vacas Holstein Pos-Parto. *Sinergia*, 1(2), pp. 64 - 77.
- Pedraza, L., López, C., & Uribe, D. (2020). Mecanismos De Acción De *Bacillus Spp.* (Bacillaceae) Contra Microorganismos Fitopatógenos Durante Su Interacción Con Plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), pp. 112-125.
- Pérez, M., Milian, G., Rondón, A., Bocourt, R., & Torres, V. (2015). Efecto De Endosporas De *Bacillus Subtilis* E-44 Con Actividad Probiótica Sobre Indicadores Fermentativos En Órganos Digestivos E Inmunológicos De Pollos De Engorde. *Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología*, 35(1), pp. 89-94.
- Putz, E., Palmer, M., Ma, H., Casas, E., Reinhardt, T., & Lippolis, J. (2020). Case Report: Characterization Of A Persistent, Treatment - Resistant, Novel *Staphylococcus Aureus* Infection Causing Chronic Mastitis In A Holstein Dairy Cow. *Bmc Veterinary Research*, 16(1), pp. 1 -8.
- Raspanti, C., Bonetto, C., Vissio, C., Pellegrino, M., Reinoso, E., Dieser, S., Odierno, L. (2016). Prevalence And Antibiotic Susceptibility Of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species From Bovine Subclinical Mastitis In Dairy Herds In The Central Region Of Argentina. *Revista Argentina De Microbiología*, 48(1), pp. 50 - 56.
- Restrepo, N. (2021). Trabajos Prácticos De Laboratorio En La Determinación De Nitrógeno En Aguas Por Método Espectrofotométrico. *Revista Bio-Grafía*, 1(1), pp. 1-7.
- Rocafuerte, J., Romero, D., & Méndez, J. (2022). Fermentative Action Of *Bacillus Subtilis* In The Bioconversion Of Organic Substrates. *Revista Upiicsa Investigación Interdisciplinaria*, 8(1), pp. 2448-4784.
- Rodríguez, J. D., Cadavid, J. D., & Quijano, L. F. (2021). Detección De Mastitis Subclínica En Producción Lechera Mediante Métodos Cuantitativos

Y Cualitativos, En Hatos Del Departamento Del Cauca. Trabajo Para Optar Al Título De Medicina Veterinaria. Popayán, Colombia.

- Rojas, Y., Rocha, H., & Rostrán, K. (2022). Estudio Comparativo Entre Un Fotómetro Clínico Y Un Espectrofotómetro Utilizando Tres Diferentes Soluciones A Distintas Longitudes De Onda”. Universidad Nacional Autonoma De Nicaragua Unan-Leon.
- Roman, A. (2018). Evaluación Del Potencial De Producción De Ácido Láctico Mediante Cepas De Bacillus Subtilis. Universidad San Francisco De Quito Usfq.
- Rondón, A., Ávila, A., Casal, S., Silva, M., Florido, M., Arteaga, F., Rodríguez, M. (2019). Evaluación De La Actividad Antimicrobiana De *Lactobacillus* Spp. Frente A Bacterias Patógenas Causantes De Mastitis En Vacas Lecheras. *Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología*, 39, pp. 21-28.
- Sandrine, I., Beauvais, C., & Le Provost, F. (2021). Epigenetics: New Insights Into Mammary Gland Biology. *Genes*, 12(2), pp. 231.
- Sarma, O., & Hussain, J. (2021). Bovine Mastitis: An Overview. *Vigyan Varta International*, 2(2), pp. 54 - 59.
- Sarti, G., & Miyazaki, S. (2013). Bacillus Subtilis Crude Extracts With Antifungal Activity Against Soybean (Glycine Max) Phytopathogens And Bradyrhizobium Japonicum Coinoculation *Effect. Agrociencia*, 47(4), pp. 373 - 383.
- Sharmin, M. (Septiembre De 2021). Study On The Intracellular Mechanism Related To Milk Yield Of Mammary Epithelial Cells. Nagano, Japón.
- Shoaib, M., Aqib, A., Naseer, M., Bhutta, Z., Pu, W., Tanveer, Q., Hammad, M. (2022). Etiology Of Bovine Mastitis. En D. Oudessa, Mastitis In Dairy Cattle, Sheep And Goats. *Ethiopia: Intechopen*. pp. 67 - 84.
- Singh, N., Singh, P., & Patel, R. (2016). Isolation And Identification Of Bacterial Organisms From Mastitic Milk. *Journal Of Livestock Science*, 7, pp. 46 - 48.

- Smulki, S., Gehrke, M., Libera, K., Cieslak, A., Huang, H., Kumar, A., & Szumacher-Strabel, M. (2020). Effects Of Various Mastitis Treatments On The Reproductive Performance Of Cows. *Bmc Veterinary Research*, pp. 1 -10.
- Sol, J., Sampimon, O., Snoep, J., & Schukken, Y. (1997). Factors Associated With Bacteriological Cure During Lactation After Therapy For Subclinical Mastitis Caused By Staphylococcus Aureus. *Journar Of Dairy Science*, pp. 2803 - 2808.
- Sosa, C., Tirante, L., Chaves, J., Pol, M., Arnaldo, Giraudo, J., & Tamiozzo, P. (2018). Identificacion De Especies De Mycoplasma Y De Ureaplasma Diversum En Rodeos Lecheros De Argentina. *Revista Argentina De Microbiología*, 50(1), pp. 31 - 35.
- Soto, M., Quiñones, B., Rodriguez, I., & Amézquita, L. (2020). Use Of Membrane Filtration For The Recovery Of Campylobacter From Raw Chicken Carcasses Purchased At Retail Markets In Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 7(1), pp. 14.
- Souza, F., Blagitz, M., Batista, F., Takano, P., Gargano, R., Diniz, S., . . . Della Libera, A. (1 De Junio De 2020). Immune Response In Nonspecific Mastitis: What Can It Tell Us? *Journal Dairy Science*, 103(6), pp. 5376 - 5386.
- Sun, H., Shang, M., Tang, Z., Jiang, H., Dong, H., Zhou, X., Z. (2020). Oral Delivery Of Bacillus Subtilis Spores Expressing Clonorchis Sinensis Paramyosin Protects Grass Carp From Cercaria Infection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 10(4), pp. 1633-1646.
- T., I. C., & Técnica), (2009). Filtracion De Laboratorio . Advancing Llife Science Togethert" Research. *Development. Production.*, pp. 4-6.
- Tchamba, N., Rao, A., Boyen, F., Haesebrouck, F., Duprez, J., Théron, L., Mainil, J. (2019). Comparison Of Quantitative Pcr And Maldi-Tof Mass Spectrometry Assays For Identification Of Bacteria In Milk Samples From Cows With Subclinical Mastitis. *Journal Of Applied Microbiology*, 127, pp. 683 - 692.

- Todorava, S., & Kozhuharova, L. (2020). Characteristics And Antimicrobial Activity Of *Bacillus Subtilis* Strains Isolated From Soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 26(1), pp. 1207-1216.
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma Ulmifolia* Lam.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). *Anterior Journal*, 17(2), pp. 136 - 143.
- Uttlová, P., Pinkas, D., Bechyňková, O., Fišer, R., Svobodová, J., & Seydlová, G. (2016). *Bacillus Subtilis* Alters The Proportion Of Major Membrane Phospholipids In Response To Surfactin Exposure. *Biochim Biophys Acta*, 1858(12), 2965-2971.
- Valladares, S. (2020). Fao.Org. Obtenido De Espectrofotometria De Absorcion Molecular Ultravioletavisible: <https://www.fao.org/3/Ab482s/Ab482s03.htm>.
- Van Der Voort, M., Jense, D., Kamphuis, C., Athanasiadis, I., De Vries, A., & Hogeveen, H. (1 De Octubre De 2021). Invited Review: Toward A Common Language In Data-Driven Mastitis Detecction Research. *Journal Dairy Science*, 104(10), p. 10449 - 10461.
- Vásquez, N., Fernández, J., & Palacios, L. (2018). Tasa De Incidencia De Mastitis Clínica Y Susceptibilidad Antibiótica De Patógenos Productores De Mastitis En Ganado Lechero Del Norte De Antioquia, Colombia. *Rev. Med. Vet.*, 36, pp. 75-87.
- Vega, L., Márquez, A., De La Cruz , B., Torres, A., & Alba, R. (2019). Determinación Del Efecto Antagónico De Bacteriófagos Sobre Géneros De Bacterias Potenciales Causantes De Mastitis Bovina (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, Y *Escherichia coli*) En Pamplona, Norte De Santander. *Ciencia Y Teconología Agropecuaria*, 4(2), pp. 82 - 85.
- Vikromvarasiri, N., Noda, S., Shirai, T., & Kondo, A. (2022). Investigation Of Two Metabolic Engineering Approaches For (R,R)-2,3-Butanediol Production

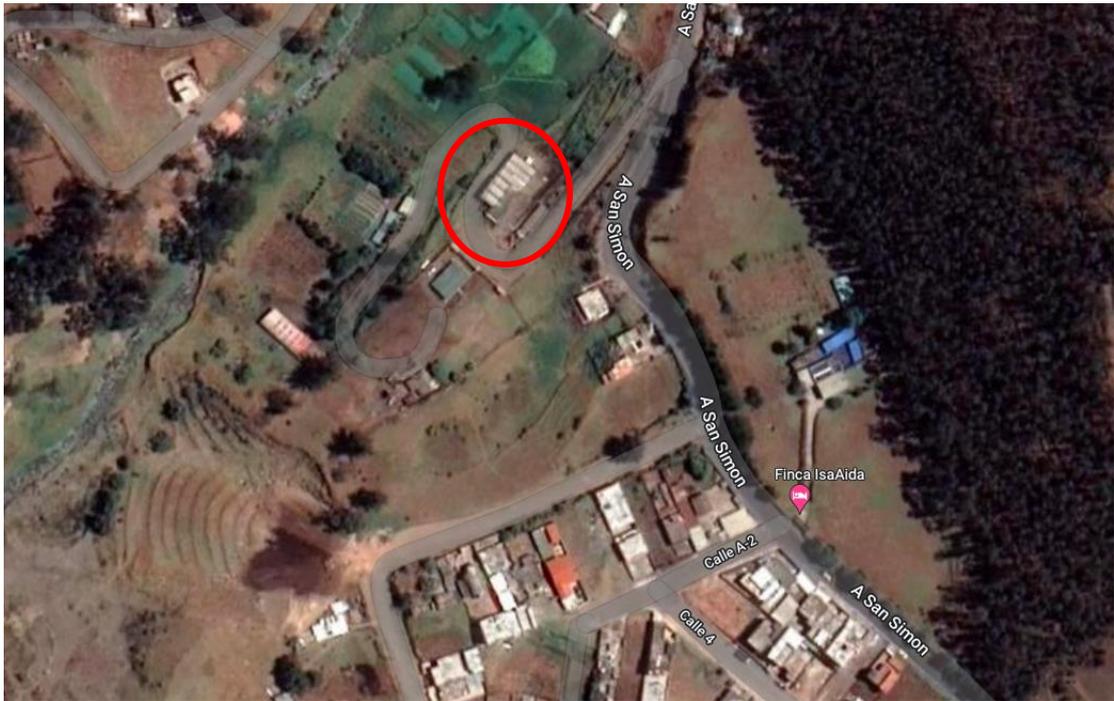
From Glycerol In Bacillus Subtilis. *Research Square*:
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1861033/v1>, 1-19.

- Virkler, P. (2021). *Klebsiella* Mastitis - More Than Just Another Gram-Negative. *Progressive Dairy*.
- Wang, M., Liang, Y., Ibeagha, E., Li, M., Zhang, H., Chen, Z., Mao, Y. (2020). Genome - Wide Dna Methylation Analysis Of Mammary Gland Tissues From Chinese Holstein Cows With *Staphylococcus aureus* Induced Mastitis. *Frontiers In Genetics*, 11, pp. 550515.
- Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Baluchi, Z. (2018). Prevalence And Characterization Of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis In Beijing, China. *Frontiers In Microbiology*, 9, pp. 1123.
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2021). Invited Review: The Role Of The Blood - Milk Barrier And Its Manipulation For The Efficacy Of The Mammary Immune Response And Milk Production. *Journal Dairy Science*, 104(6), pp. 6376 - 6388.
- Xu, P., Fotina, H., & Wang, S. (2021). In Vitro Culture And Evaluation Of Bovine Mammary Epithelial Cells From Ukraine Dairy Cows. *Iranian Journal Of Veterinay Research, Shiraz University*, 22(1), pp. 65 - 71.
- Zaatout, N. (Marzo De 2021). An Overview On Mastitis - Associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, Host Immunity And The Use Alternative Therapies. *Microbiological Research*, 256, pp. 126960.
- Zaenal, A., Puspitasari, I., Fátima, F., Triratna, L., & Kartina, G. (2018). Genetic Diversity Of Mastitis Cows Milk Bacteria Based On Rapd-Pcr. *Biodiversitas Journal Of Biological Diversity*, 19(5), pp. 1714 - 1721.
- Zamojska, D., Nowak, A., Nowak, I., & Piotrowska, E. (2021). Probiotics And Postbiotics As Substitutes Of Antibiotics In Farm Animals: A Review. *Animals*, 11(12), pp. 3431.

- Zeigler, D., & Nicholson, W. (2017). Evolución Experimental De Bacillus Subtilis. *Microbiología Ambiental*, 19(9), 3415-3422.
- Zigo, F., Vasil, M., Ondrašovičova, S., Vyrostková, J., Bujok, J., & Pecka - Kielb, E. (2021). Maintaining Optimal Mammary Gland Health And Prevention Of Mastitis. *Frontiers In Veterinary Science*, 8, pp. 607311.

ANEXOS

Anexo 1. *Mapa de ubicación del lugar de investigación.*



Fuente: Google maps, (2022).

Anexo 2. Base de datos de los resultados obtenidos en la investigación.

Tratamientos	Repeticiones					Promedio	
	1	2	3	4	5		
T1	19	17	16	15	16	16.60	E.c
T2	20	19	21	22	20	20.40	K.
T3	20	21	20	21	20	20.40	S.a
T4	6	8	5	6	7	6.4	E.c
T5	0	1	0	2	1	0.8	K.
T6	1	0	0	2	0	0.6	S.a
T7	19	22	20	21	22	20.8	E.c
T8	23	25	23	25	24	24	K.
T9	30	29	27	29	30	29	S.a
T10	4	5	5	4	7	5	E.c
T11	9	8	10	9	9	9	K.
T12	10	11	12	12	13	11.6	S.a

Nota. E.c: *Escherichia coli*, K. *Klebsiella*, S.a: *Staphylococcus aureus*.

No	Neomicina de 30µg	
	Codigo	Zona de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i>		
1	D003PI	13
2	EA006PI	12
3	AR001AD	10
4	AR013PI	11
5	D002PI	12
<i>Klebsiella spp.</i>		
1	EA013AI	19
2	EA007PI	19
3	EA008PI	20
4	EA014AD	22
5	AR015PI	19
<i>Staphylococcus aureus</i>		
1	AR010PI	10
2	AR018PI	12
3	D001AI	11
4	EA003PD	12
5	EA010PI	10

Anexo 3. Fotografías de investigación.



Foto 1. Selección de *Bacillus* spp tipo silvestre del cepario



Foto 2. Preparación de medios de cultivo



Foto 3. preparación del medio MRS



Foto 4. Inoculación de los medios de cultivo con *Bacillus* spp. Tipo silvestre



Foto 5. Características microscópicas, mediante la aplicación de la tinción de Gram.

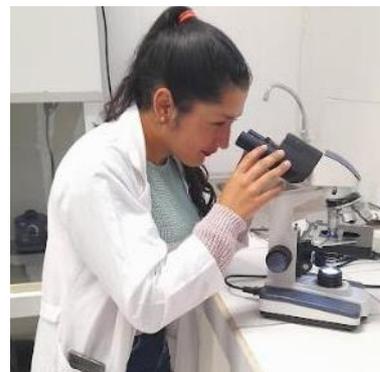


Foto 6. Observación microscópica del *Bacillus* spp. tipo silvestre



Foto 7. Trasplante del *Bacillus* spp tipo silvestre reanimado a medio liquido



Foto 8. Reanimación del *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™, realizado por el Dr. Favián Bayas M. Ph.D

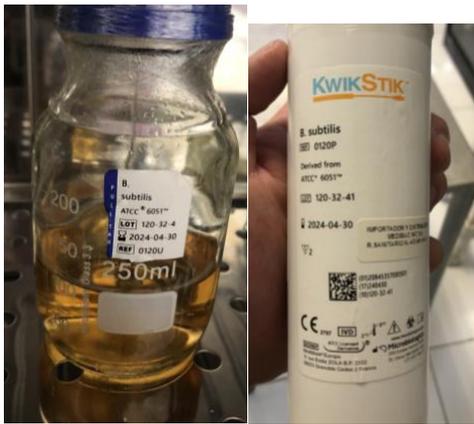


Foto 9. *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™



Foto 10. Evidencia del crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC® 6051™

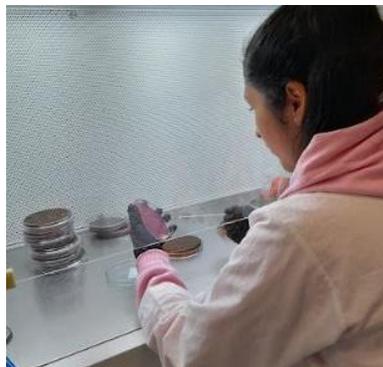


Foto 11. reanimación y trasplante de Enterobacterias



Foto 12. reanimación y trasplante de *Staphylococcus aureus*

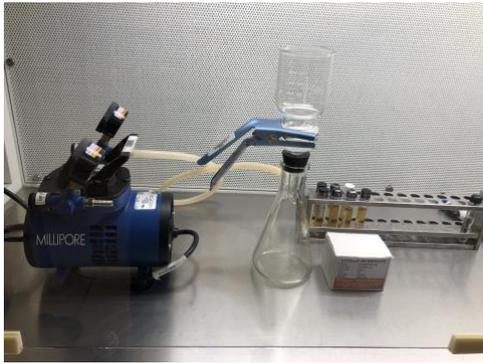


Foto 12. circuito de microfiltrado

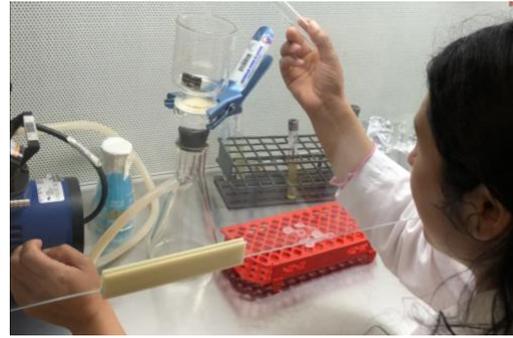


Foto 14. Proceso de microfiltrado



Foto 15. Membrana de microfiltrado

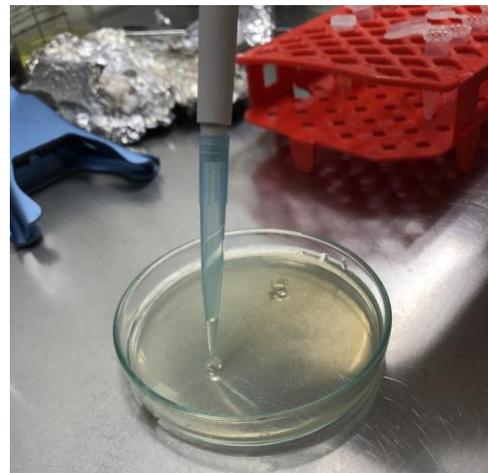


Foto 16. Colocación del microfiltrado en los pocillos del Mueller Hinton



Foto 17. Incubación



Foto 19. Resultados del T1: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a *Escherichia coli* más difusión directa

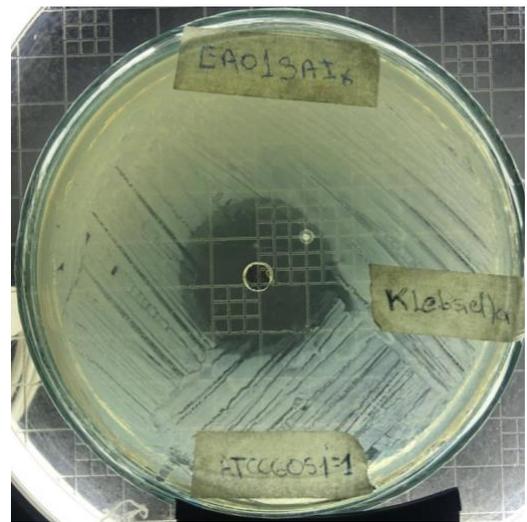


Foto 20. Resultados del T2: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a *Klebsiella* más difusión directa

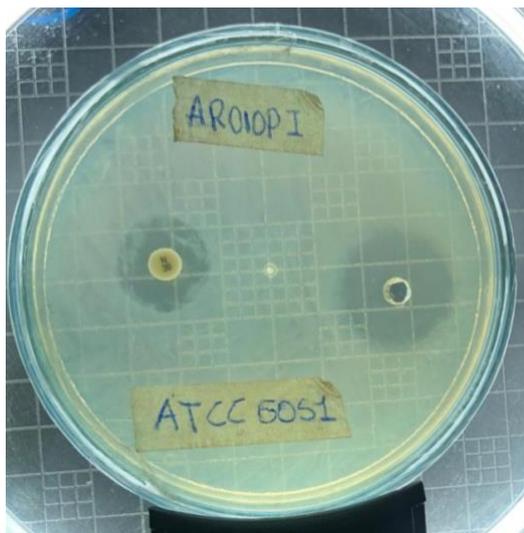


Foto 21. Resultados del T3: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a *Staphylococcus aureus* más difusión directa.

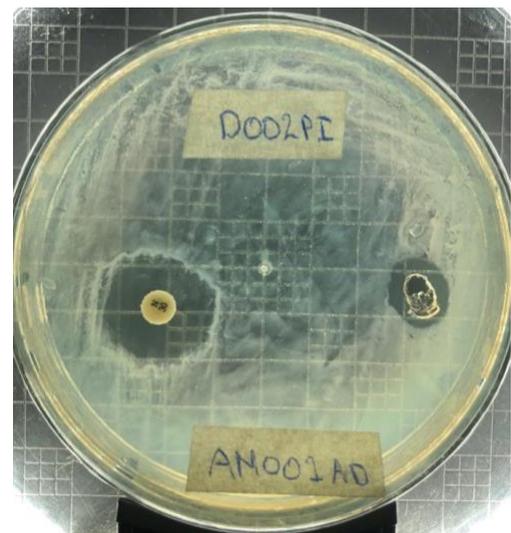


Foto 22. Resultados del T4: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Escherichia coli* más difusión directa.

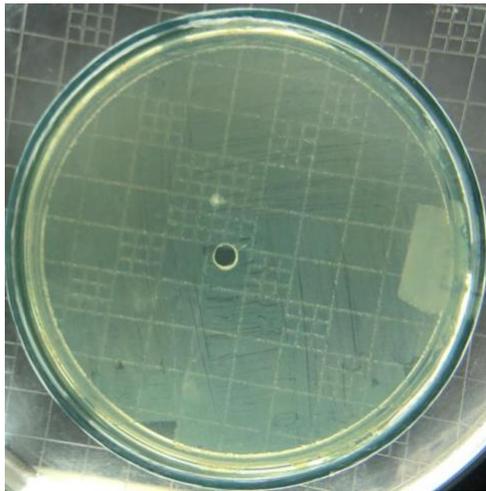


Foto 23. Resultados del T5: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Klebsiella* spp., más difusión directa.



Foto 24. Resultados del T6: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Staphylococcus aureus* más difusión directa.

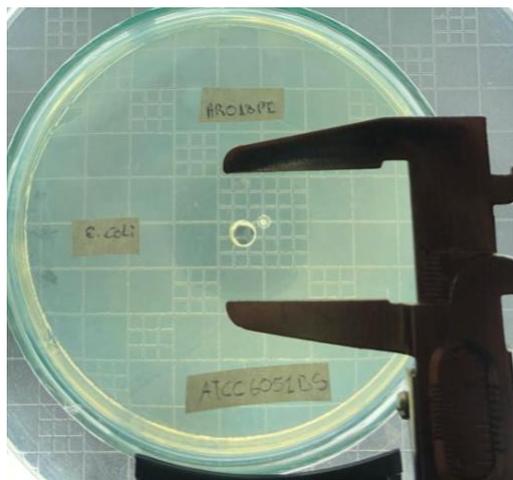


Foto 25. Resultados del T7: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a *Escherichia coli* más difusión del filtrado.

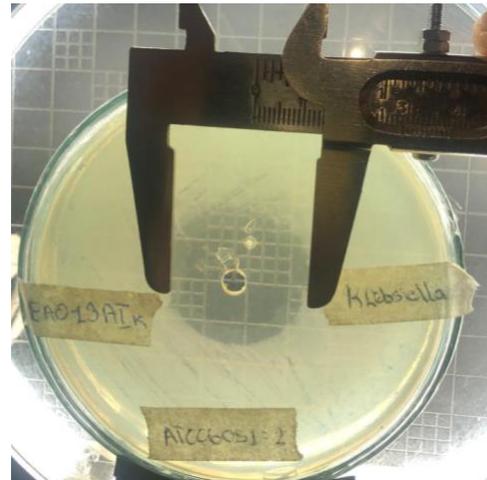


Foto 26. Resultados del T8: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente *Klebsiella* spp., más difusión del filtrado.

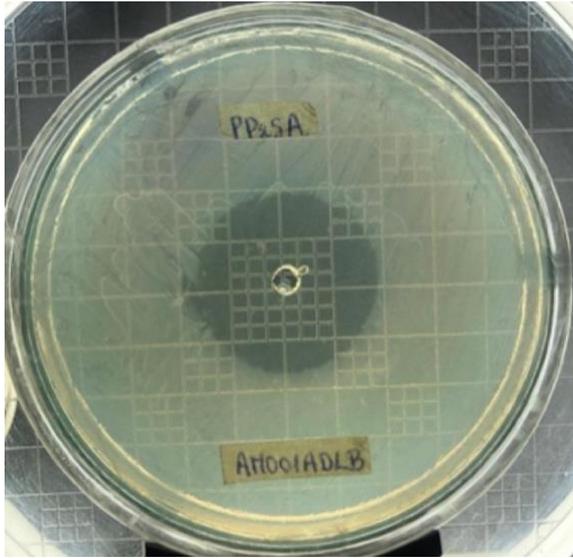


Foto 27. Resultados del T9: *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a *Staphylococcus aureus* más difusión del filtrado.

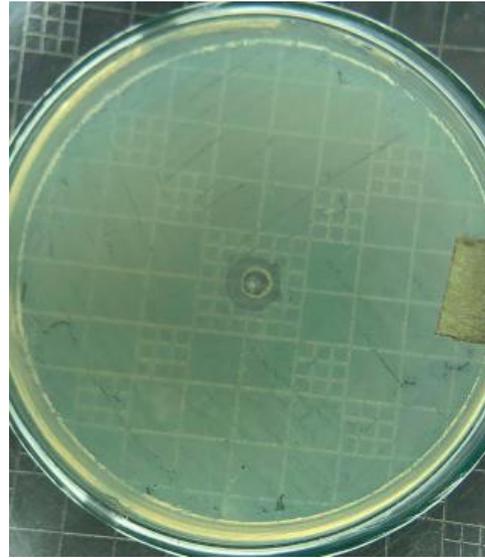


Foto 28. Resultados del T10: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Escherichia coli* más difusión del filtrado.



Foto 29. Resultados del T11: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Klebsiella* spp. más difusión del filtrado

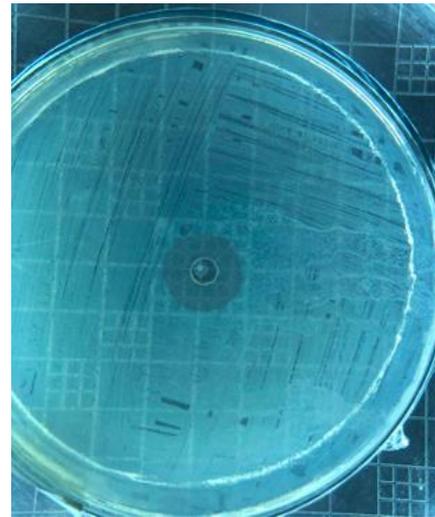


Foto 30. Resultados del T12: *Bacillus* spp., tipo silvestre frente a *Staphylococcus aureus* más difusión del filtrado.

Anexo 4. *Glosario de términos.*

- **Abióticos:** Sin vida. Habitualmente en referencia a los componentes químicos y físicos del ambiente de un organismo (luz, temperatura, agua, productos químicos y atmósfera).
- **Agar:** Medio de cultivo gelatinoso, a base de algas marinas, que se usa para hacer crecer bacterias en el laboratorio.
- **Análisis de sensibilidad a antibióticos:** Término genérico para la determinación en el laboratorio, mediante distintos métodos, de los niveles de sensibilidad o resistencia mostrados por una cepa bacteriana aislada frente a los antibióticos. Puede incluir, por ejemplo, la prueba de difusión en disco o la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- **Antibiograma:** Resultado del análisis de laboratorio para determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana aislada a diferentes antibióticos. Los antibiogramas se pueden recopilar para obtener antibiogramas acumulativos, que pueden ayudar a elaborar recomendaciones de prescripción en el ámbito nacional, regional o de un hospital
- **Bacteriemia:** Infección en la que se produce (y se identifica) la presencia de bacterias en la sangre.
- **Betalactamasa:** Familia de enzimas producidas por las bacterias, que hidrolizan (destruyen) antibióticos betalactámicos. Los antibióticos betalactámicos hidrolizados varían en función del tipo de betalactamasa
- **Biocenosis:** Es el conjunto de organismos de todas las especies que coexisten en un espacio definido llamado biotopo, que ofrece las condiciones ambientales necesarias para su supervivencia.
- **Biodegradación:** Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismo

- **Biopelícula:** Es un ecosistema microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.
- **Biotransformación:** La biotransformación es el proceso mediante el cual una sustancia se convierte (transforma) en otro producto químico por una reacción química en el organismo.
- **Cepa:** Una cepa es una variante genética o subtipo de microorganismo (p. ej., virus, bacteria u hongo). Algunas cepas pueden ser más peligrosas o difíciles de tratar que otras.
- **CMB (Concentración Mínima Bactericida):** La concentración más baja de un antibiótico que mata a una cepa bacteriana.
- **CMI (concentración mínima inhibitoria):** Medición cuantitativa (expresada en mg/lo $\mu\text{g/ml}$) de la actividad de un antibiótico específico frente a una cepa aislada en particular. Se determina en el laboratorio y se utiliza junto con el valor crítico para decidir si una cepa aislada es sensible o resistente a ese antibiótico.
- **Código genético:** Conjunto de reglas por las que la información de un fragmento de ADN se traduce a una proteína.
- **Colonización:** Proceso en el que un microorganismo (por ejemplo, una bacteria) crece/habita en el interior de una persona sin causar una enfermedad.
- **Cultivo bacteriano:** es un método para la multiplicación de microorganismos, tales.
- **Difusión en disco:** Método de laboratorio ampliamente utilizado para medir la actividad de un antibiótico específico frente a una cepa aislada en particular. Se utiliza junto con el valor crítico para determinar si una cepa aislada es sensible o resistente a ese antibiótico
- **Endóspora:** son células especializadas, no reproductivas, producidas por algunas bacterias de la división Firmicute. Su función primaria es asegurar la supervivencia en tiempos de tensión ambiental. Son extraordinariamente resistentes

a la radiación (ultravioleta, X y gamma), a la desecación, a la lisozima, al calor, a los desinfectantes químicos y a trituración mecánica.

- **Enterobacterias:** Gran familia de bacterias Gram negativas que son por sí mismas la causa más común de infecciones en humanos.
- **Exotoxinas:** Una exotoxina es una proteína secretada extracelularmente por un microorganismo como bacterias, protozoos y algunos hongos y algas.
- **Farmacocinética (FC):** “Las interacciones características entre un fármaco y el organismo, en lo que respecta a su absorción, distribución, metabolismo y excreción” (Merriam-Webster).
- **Farmacodinámica (FD):** Estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos sobre el organismo o sobre los microorganismos o parásitos que se encuentran en él, y los mecanismos de acción del fármaco.
- **Gram negativo:** Las bacterias que en su pared celular contienen únicamente una capa fina de peptidoglicano, lo que no les permite retener la tinción con cristal violeta utilizada en el laboratorio.
- **Gram positivo:** Bacterias que en su pared celular contienen una capa gruesa de peptidoglicano, que puede retener la tinción con cristal violeta utilizada en el laboratorio.
- **Hemocultivo:** Cultivo microbiológico de sangre, que suele ser un ambiente estéril. Se emplea para detectar infecciones que se están diseminando por el torrente sanguíneo, principalmente en pacientes con sepsis.
- **Infección:** Es la invasión de un anfitrión por un microorganismo patógeno, su multiplicación en los tejidos y la reacción del anfitrión a su presencia y a la de sus posibles toxinas.
- **Infestación:** La invasión de un organismo vivo por agentes parásitos externos o internos. La diferencia fundamental con el término infección es que este último, se aplica exclusivamente a microorganismos que tienen como objetivo su reproducción en el organismo infectado.

- **Morbilidad:** Cualquier complicación relacionada con una enfermedad o su tratamiento
- **Mutagénico:** Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural. Patogenicidad: Los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedad. Patógeno: Es todo agente que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea animal o vegetal.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction). Es una técnica utilizada en biología molecular para amplificar una copia única o varias copias de un fragmento de ADN hasta varias órdenes de magnitud, lo que genera miles de millones de copias de una secuencia concreta de ADN. En microbiología se usa para identificar la presencia de ADN o ARN bacteriano, fúngico o vírico en muestras clínicas
- **Plásmido:** Fragmento circular de ADN, altamente variable en tamaño y propiedades, que puede transportar las instrucciones genéticas para hacer que las bacterias sean resistentes a los antibióticos. Los plásmidos pueden ser transferidos de una bacteria a otra, contribuyendo así a la diseminación de las resistencias.
- **Resistencia:** Propiedad de algunas bacterias, que hace que ciertos antibióticos se vuelvan ineficaces frente a ellas, en el laboratorio o cuando se usan para tratar infecciones. La resistencia puede ser una característica intrínseca o se puede adquirir y seleccionar por exposición a antibióticos. La última categoría suele tener una mayor importancia en lo que respecta a la salud pública.
- **SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina, y por tanto también son resistentes a la mayor parte de los otros antibióticos betalactámicos
- **Simbiosis:** Asociación de dos o más organismos de diferentes especies que viven en unión estrecha para su beneficio mutuo. Vida en común de dos o más organismos.

- **Telenomia:** Se refiere a la calidad de aparente propósito y de orientación a objetivos de las estructuras y funciones de los organismos vivos, la cual deriva de su historia y de su adaptación evolutiva para el éxito reproductivo.
- **Tinción de gram:** También conocido como método de Gram, es un método que permite diferenciar especies bacterianas en dos grandes grupos (Gram positivas y Gram negativas). El nombre proviene del bacteriólogo danés Hans Christian Gram, que desarrolló la técnica. La tinción de Gram diferencia bacterias por las propiedades químicas y físicas de sus paredes celulares, ya que detecta el peptidoglicano que presenta en una capa gruesa las bacterias Gram positivas. En una prueba de tinción de Gram, las bacterias Gram positivas retienen el tinte cristal violeta, mientras que la contratinción (normalmente con safranina o fucsina) que se añade tras el cristal violeta dio una coloración rojiza o rosa a todas las bacterias Gram negativas
- **Toxinas y toxoides:** Una toxina es una sustancia que es toxica producida por células vivas de animales, plantas, bacterias u otros organismos biológicos y un toxoide es una toxina bacteriana cuya toxicidad ha sido atenuada o suprimida por un producto químico o por efectos del calor, mientras que se mantienen otras propiedades, como su inmunogenicidad.
- **Vacunas:** Material elaborado con organismos patógenos muertos o atenuados, o con determinantes antigénicos derivados de esos organismos, para inducir la formación de anticuerpos en un hospedador, y por tanto, conferirle inmunidad frente al patógeno.
- **Valores críticos:** Criterios de corte consensuados utilizados para interpretar la CMI o el tamaño de las zonas de difusión en disco con el fin de definir si una cepa aislada es sensible o resistente a un antibiótico particular y ayudar en la toma de decisiones clínicas conforme a los posibles resultados del tratamiento.