



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

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

Aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (*Agave*), “azul” y “blanco”, para su aplicación como agente antimicrobiano.

Autores: Mora Rosero, Nathaly Michelle & Rosero Ganchozo, Diana Leticia

Tutor: Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, PhD.





Contenido

01

Introducción

02

Objetivos- Hipótesis

03

Materiales y Métodos

04

Resultados y Discusión

05

**Conclusión y
Recomendación**



1

Introducción

Introducción



Origen del penco

Planta inducida en México desde la época colonial. En Ecuador se expande por Imbabura, Manabí, Loja, Cacha.



Subproductos

Se obtiene la pulpa, sabia o mucílago = Chaguarmishqui aumenta su valor nutricional con el tiempo.



Características fisicoquímicas y microbiológicas

Villacrés (2018) indica su alto contenido de azúcares, aminoácidos, vitaminas, minerales, levaduras y bacterias.



Microorganismos presentes

Presencia de probióticos, beneficiosos para el ser humano.



Generalidades

Easy to change colors, photos and Text.

Clasificación

Homofermentativas, heterofermentativas, termófilas y mesófilas

Propiedades antimicrobianas

Las bacteriocinas son los metabolitos que más se destacan.

Aplicación

Agentes de control biológico
Defensa antimicrobiana
Antifúngicos



2

Objetivos e Hipótesis



Objetivos



General

Aislar y caracterizar microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (Agave americana), “azul” y “blanco”, para su aplicación como agente antimicrobiano

Específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímica y microbiológica de la bebida tradicional Chaguarmishqui
- Aislar y caracterizar los microorganismos probióticos presentes en la bebida tradicional Chaguarmishqui, considerando dos especies de penco (Agave americana), “azul” y “blanco”
- Evaluar de forma In Vitro la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos frente a microorganismos patógenos

Hipótesis Diseño AxB



Factor A

H0: Las especies de penco azul y blanco no influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos del chaguarmishqui.

Ha: Las especies de penco azul y blanco influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos del chaguarmishqui.

Factor B

H0: Los estados del chaguarmishqui no influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de su composición.

Ha: Los estados del chaguarmishqui influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de su composición.

Factor AxB

H0: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y estado de fermentación no influye en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos.

Ha: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y estado de fermentación influye en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos.

Hipótesis

Diseño

AxBxC



Factor A

H0: Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco no producen variación en la actividad antimicrobiana.

Ha: Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco producen variación en la actividad antimicrobiana.

Factor B

H0: La inhibición de los microorganismos patógenos no se ve influenciada por la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas.

Ha: La inhibición de los microorganismos patógenos se ve influenciada por la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas.

Factor C

H0: Los tipos de solución no influyen en la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos.

Ha: Los tipos de solución influyen en la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos.



3

Materiales y Métodos



Diseño Experimental AxB



Factores y niveles del experimento

Factores	Simbología	Niveles
Especie de penco (A)	a_0	Azul
	a_1	Blanco
Estado (B)	b_0	Fresco
	b_1	Fermentado

Diseño Experimental

Tratamiento a comparar

Factores	Simbología	Niveles
T1	$a_0 b_0$	Azul+ Fresco
T2	$a_0 b_1$	Azul+ Fermentado
T3	$a_1 b_0$	Amarillo + Fresco
T4	$a_1 b_1$	Amarillo + Fermentado

Tipo de diseño
ANOVA DBCA con arreglo factorial $A \times B$ (2x2).

Repeticiones
5 repeticiones por tratamiento con un total de 20 unidades experimentales.

Análisis funcional
Prueba de significancia Tukey.

Variables a medir
pH, Acidez, Sólidos solubles, Recuento de mohos y bacterias



Diseño Experimental Ax BxC



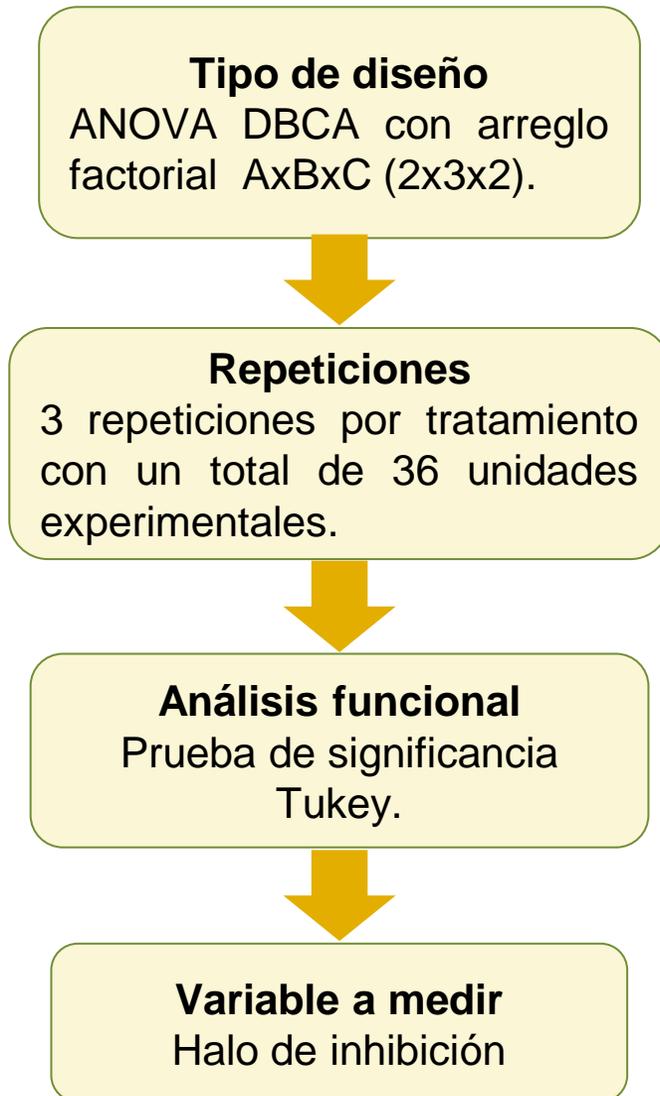
Factores y niveles del experimento

Factores	Simbología	Niveles
Especie de penco (A)	a_0 a_1	Azul Blanco
Microorganismo patógeno (B)	b_0 b_1 b_2	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebselia pneumoniae</i>
Tipo de solución bacteriana (C)	c_0 c_1	Solución + bacteria (SolBac) Solución (Sol)



Diseño Experimental AXBXC

Tratamiento a comparar



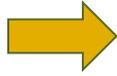
Factores	Simbología	Niveles
T1	$a_0 b_0 c_0$	Azul+ <i>E. coli</i> + SolBac
T2	$a_0 b_0 c_1$	Azul+ <i>E. coli</i> + Sol
T3	$a_0 b_1 c_0$	Azul+ <i>C. freundii</i> + SolBac
T4	$a_0 b_1 c_1$	Azul+ <i>C. freundii</i> + Sol
T5	$a_0 b_2 c_0$	Azul+ <i>K. pneumoniae</i> + SolBac
T6	$a_0 b_2 c_1$	Azul+ <i>K. pneumoniae</i> + Sol
T7	$a_1 b_0 c_0$	Blanco+ <i>E. coli</i> + SolBac
T8	$a_1 b_0 c_1$	Blanco + <i>E. coli</i> + Sol
T9	$a_1 b_1 c_0$	Blanco + <i>C. freundii</i> + SolBac
T10	$a_1 b_1 c_1$	Blanco + <i>C. freundii</i> + Sol
T11	$a_1 b_2 c_0$	Blanco + <i>K. pneumoniae</i> + SolBac
T12	$a_1 b_2 c_1$	Blanco + <i>K. pneumoniae</i> + Sol

Fase 1

Extracción
del mucílago



Obtención



Fermentación



Fermentación
discontinua

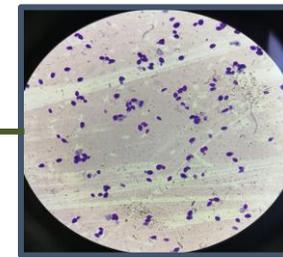
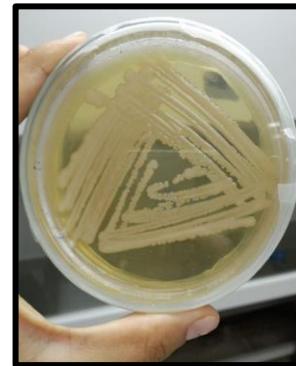
Aislamiento de BAL



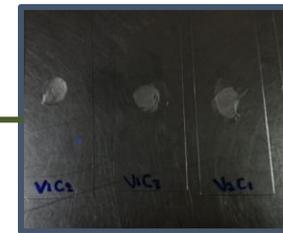
38°C



Aislado
puro



Caracterización
de BAL



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Fase 1

Caracterización fisicoquímica y microbiológica

pH



INEN 389



Acidez



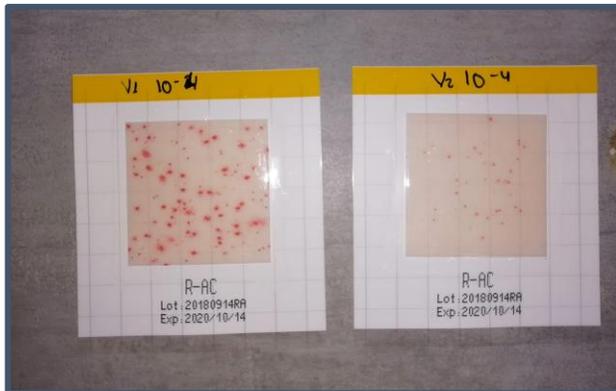
INEN 381

Sólidos solubles



Refractómetro de 45°

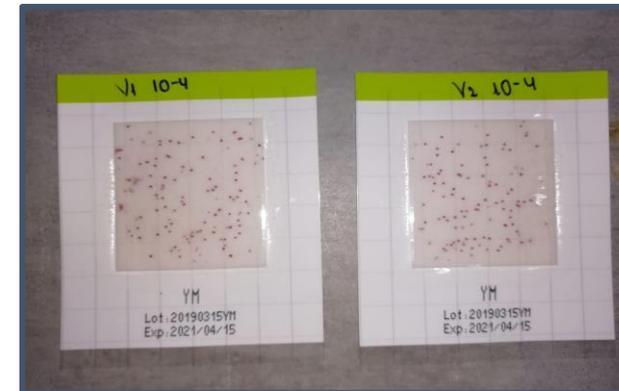
Recuento de aerobios



Siembra en petrifilm
(UFC/ml)



Recuento de mohos/levaduras



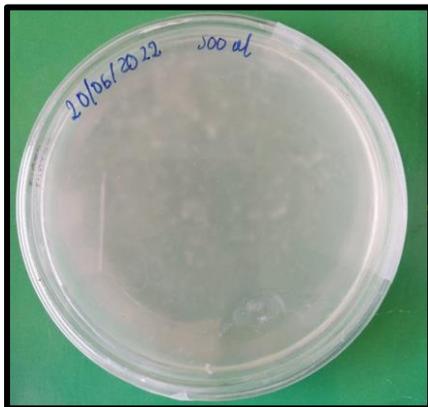


Fase 2

Incubación a 37 °C
durante 48 horas



Microorganismos patógenos



Inoculación en
suero fisiológico



Preparación de soluciones

Centrifugación 3500 rpm

Filtración

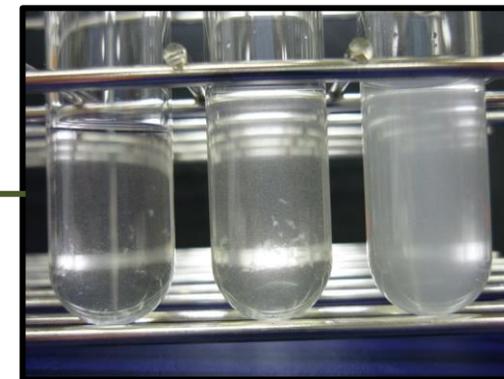


Solución +
Bacterias



Solución libre
de células

Turbidez 0,5 Mcfarland



Solución de
microorganismos
patógenos



Fase 2

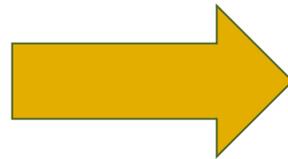
Actividad antimicrobiana



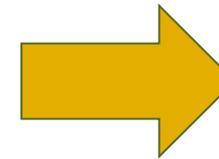
Placas con medio Mueller Hinton



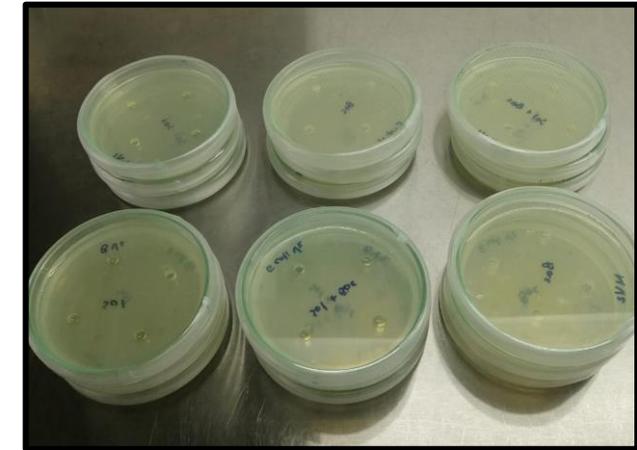
Diseminación de solución de patógenos



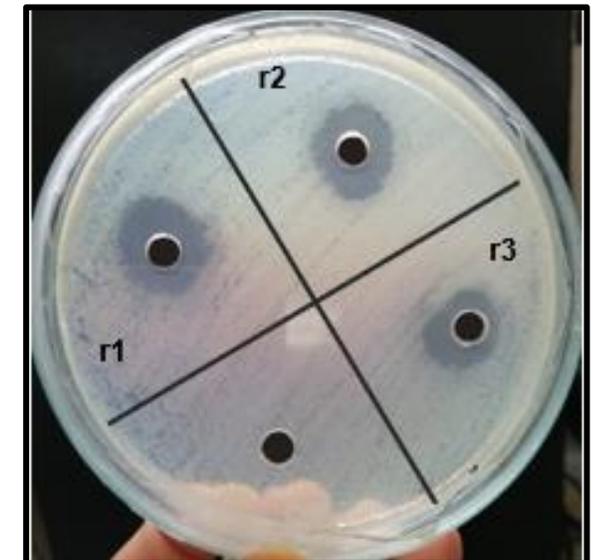
Pozos de 6 mm



Adición de 75 μ L de soluciones BAL



Incubación a 37 °C durante 48 h



Variable a medir: Halo de inhibición

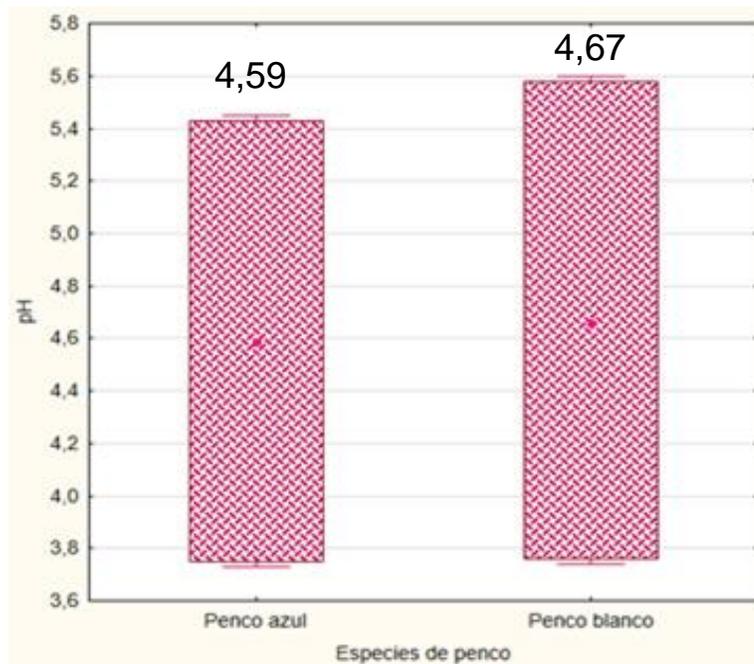


4

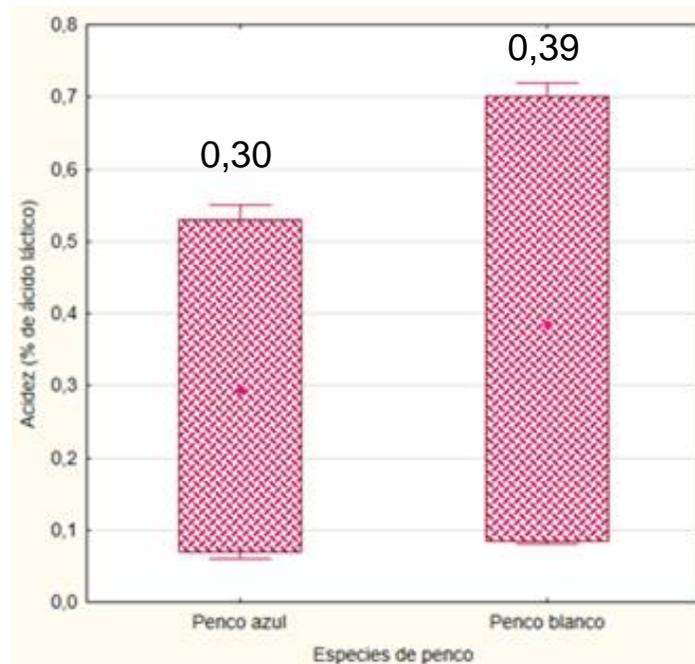
Resultados y Discusión

Caracterización Factor A

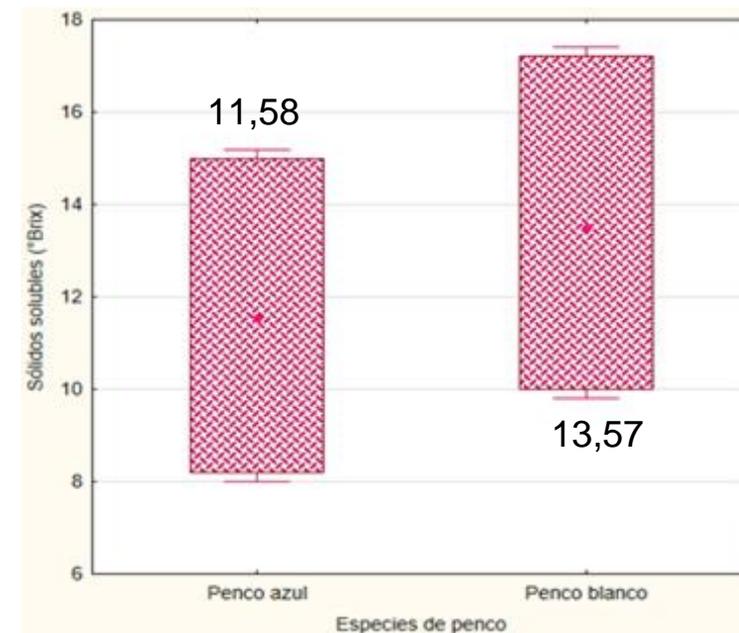
pH



Acidez



Sólidos solubles



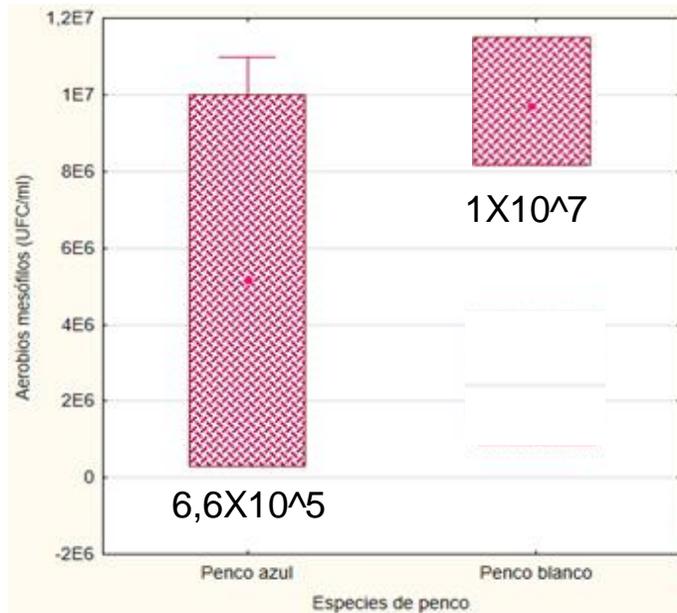
Según Villacís et al. (2021), la mayor acidez del penco blanco ocurre por el tiempo de maduración.

El chaguarmishqui por lo general no es ácido, por lo que exhibe bajos valores. Las diferencias en cuanto a acidez, puede ocurrir por el tiempo de recolección luego del raspado (Changoluisa, 2020).

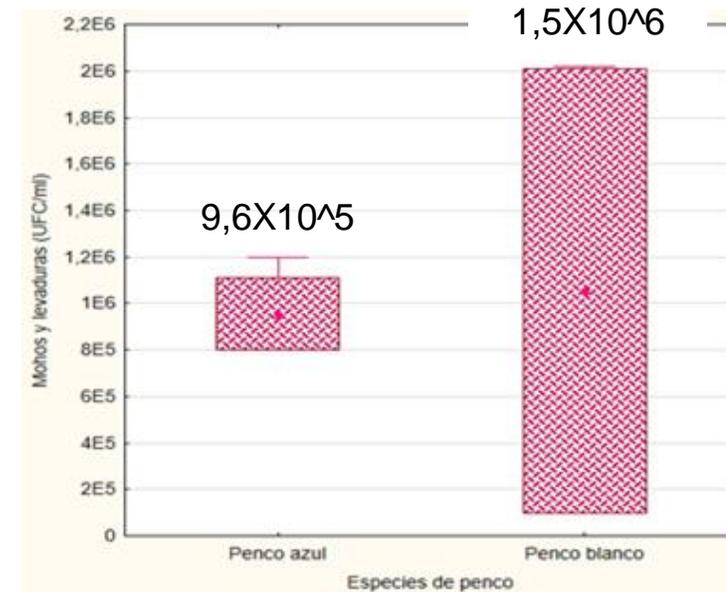
La diferencia en este caso también se atribuye a la maduración y también a la zona donde se establece la siembra (Villacís, 2021).

Caracterización Factor A

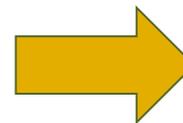
Recuento de aerobios



Recuento de mohos y levaduras



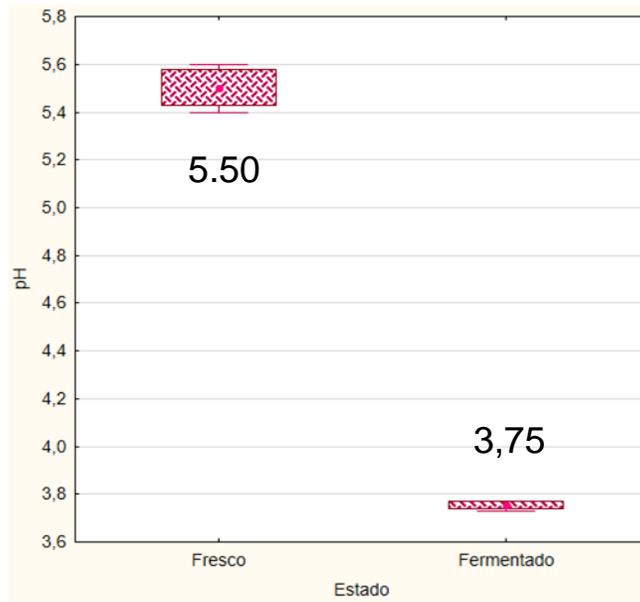
La población de microorganismos de los extractos de ambas especies de penca fue elevada, debido a la recolección al aire libre (Jurado & Sarzosa, 2009).



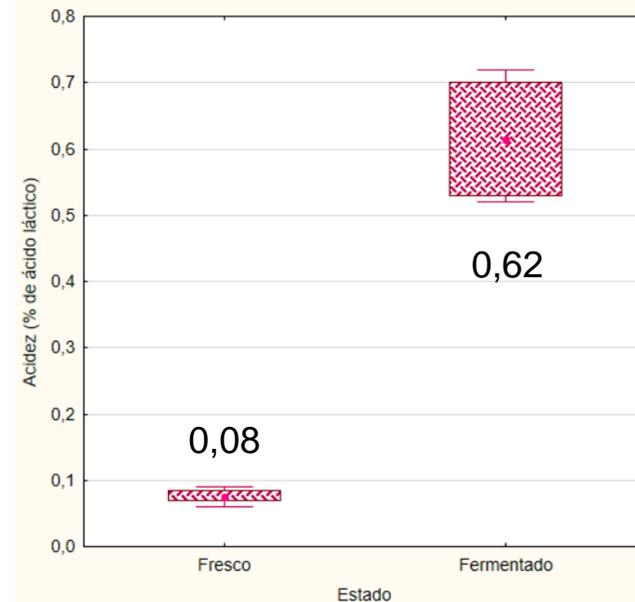
Se notó una mayor población en el caso del penca blanco, probablemente debido a la mayor concentración de azúcares que proporciona (Changoluisa, 2020).

Caracterización Factor B

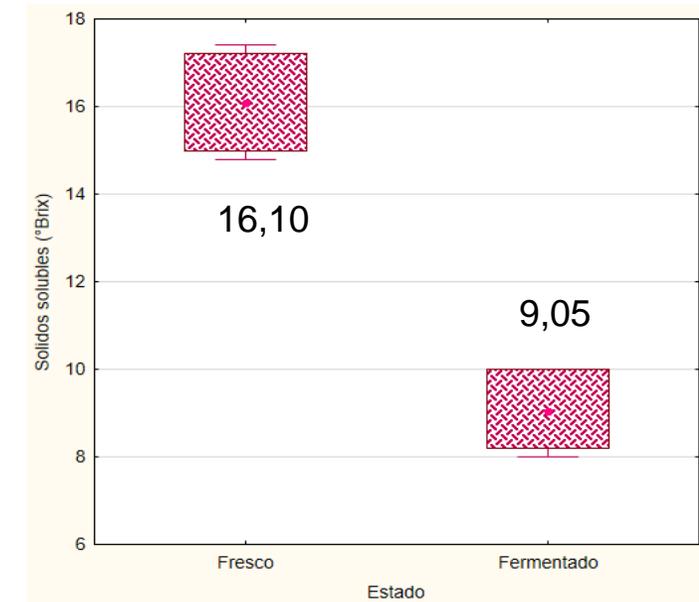
pH



Acidez



Sólidos solubles



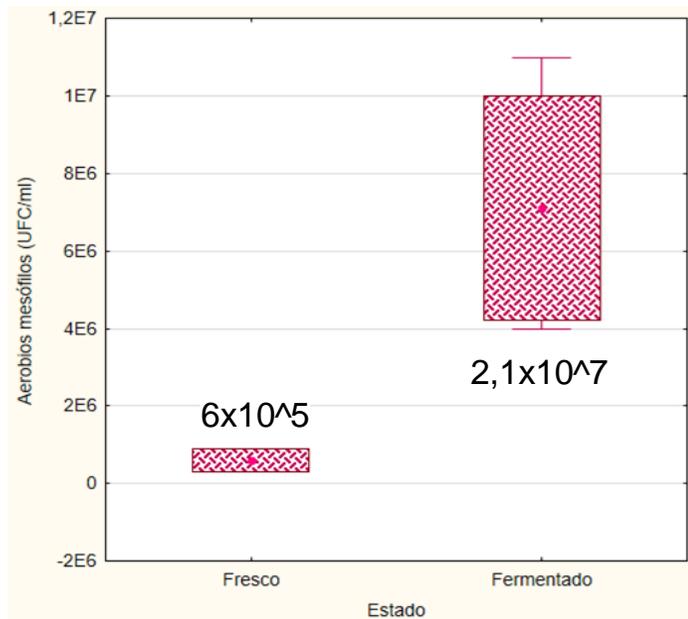
Porrás (2011) el mucílago del penco se encontró en un nivel ligeramente ácido en su estado fresco. Para el valor del fermentado la INEN 2304 (2017) se considera que es un valor aceptable.

Herrera (2008) estableció un valor parecido y determinó que para el pulque el valor mínimo debe ser de 0,40 y el máximo de 0,75.

Robles et al. (2016) explican que la reducción de sólidos solubles se debe a la transformación de los azúcares a etanol y CO₂.

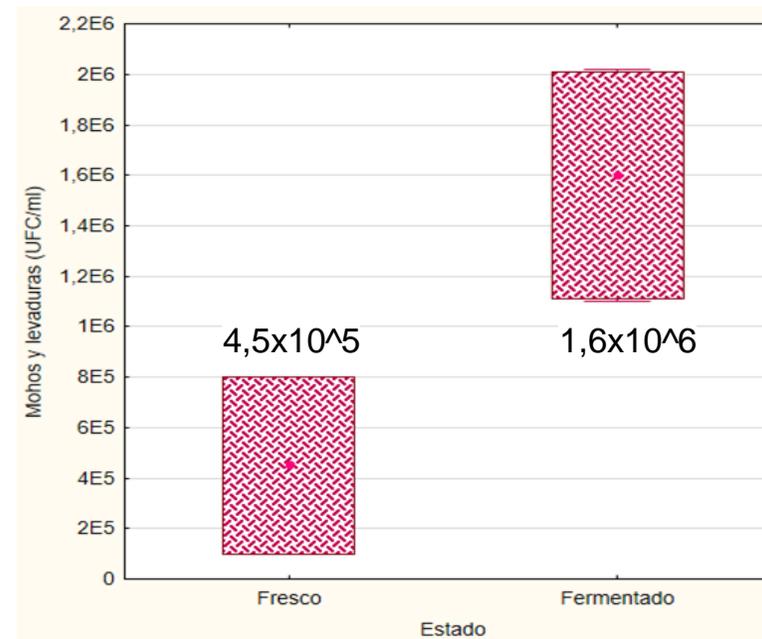
Caracterización Factor B

Recuento de aerobios



(Ramirez et al., 2011) este valor incrementó debido a que las bacterias llegan a una etapa de crecimiento exponencial

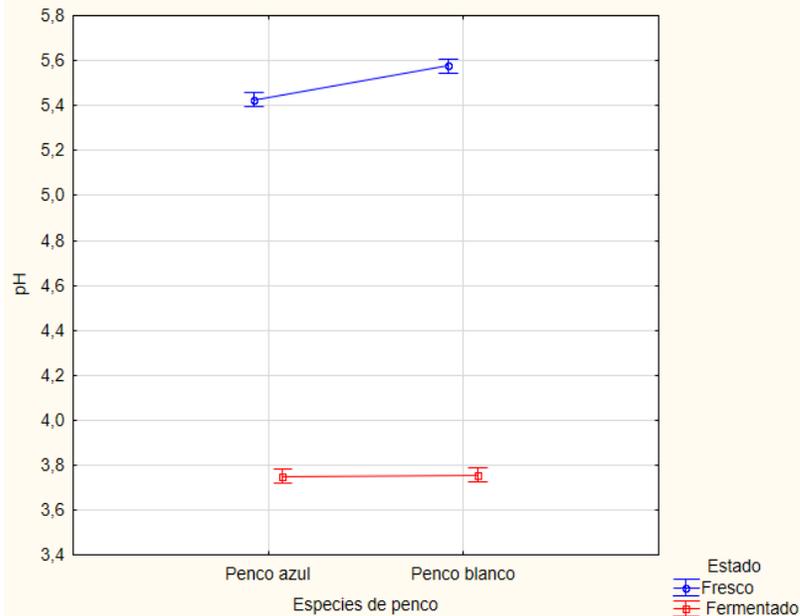
Recuento de mohos y levaduras



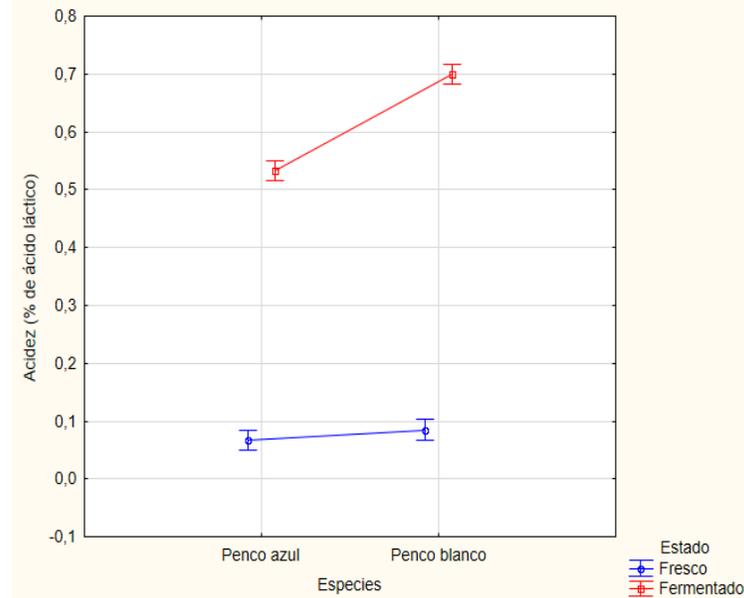
El alto valor puede atribuirse a la presencia de levaduras. Lema (2015) afirma que son las principales encargadas de la fermentación de la bebida.

Caracterización Interacción AxB

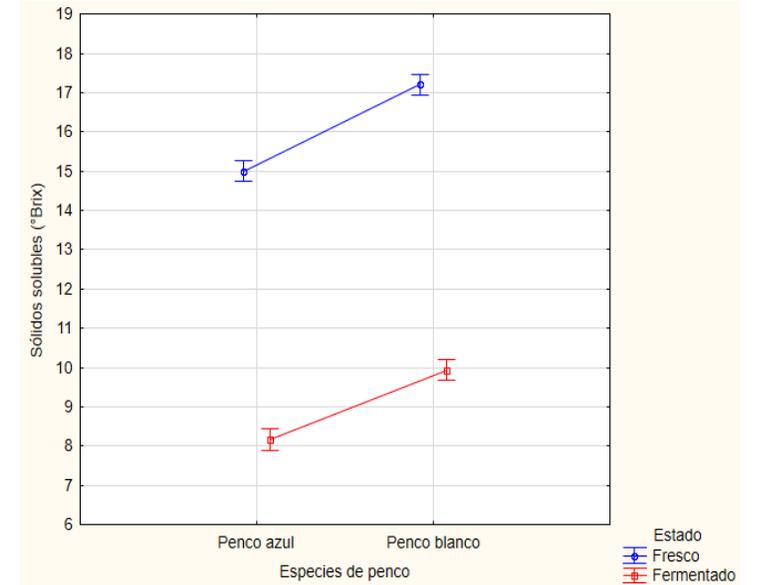
pH



Acidez



Sólidos solubles



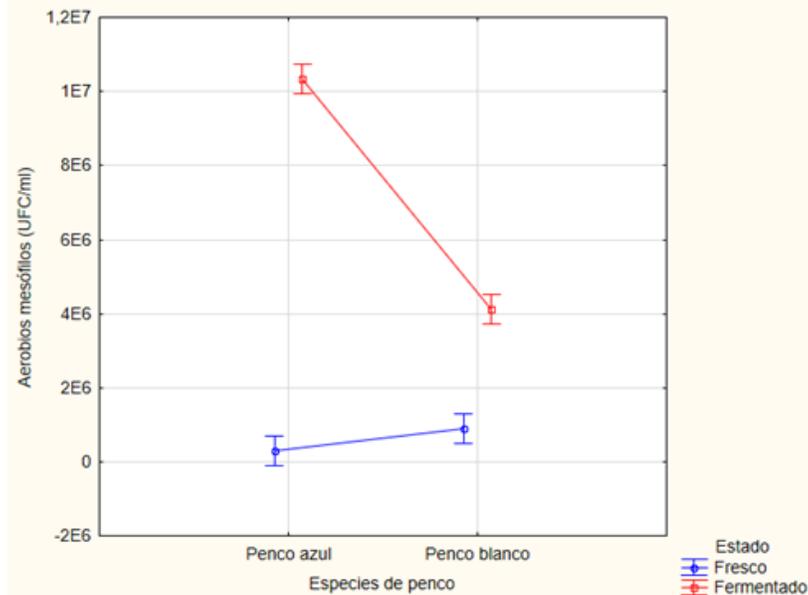
Leal et al. (2014) mencionan que el pH es la característica más importante para que ocurra la fermentación

Herrera (2008) y Hernandez (2019) la disminución ocurre debido a la fermentación puesto que los azúcares son transformados a ácido láctico

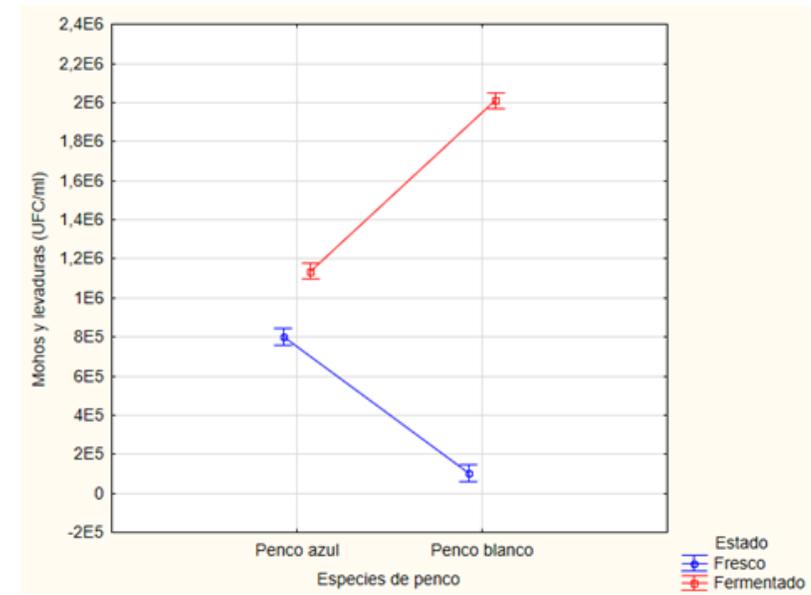
La reducción es una característica del proceso fermentativo, ya que, los microorganismos degradan los azúcares en alcohol o ácidos orgánicos (Zúñiga et al., 2020)

Caracterización Interacción AxB

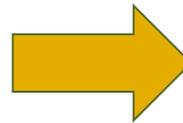
Recuento de aerobios



Recuento de mohos y levaduras



Hubo un crecimiento significativo en el transcurso de los días de fermentación. Durante la etapa exponencial de la fermentación existe un incremento de los microorganismos con capacidad fermentativa (Trávez, 2014).

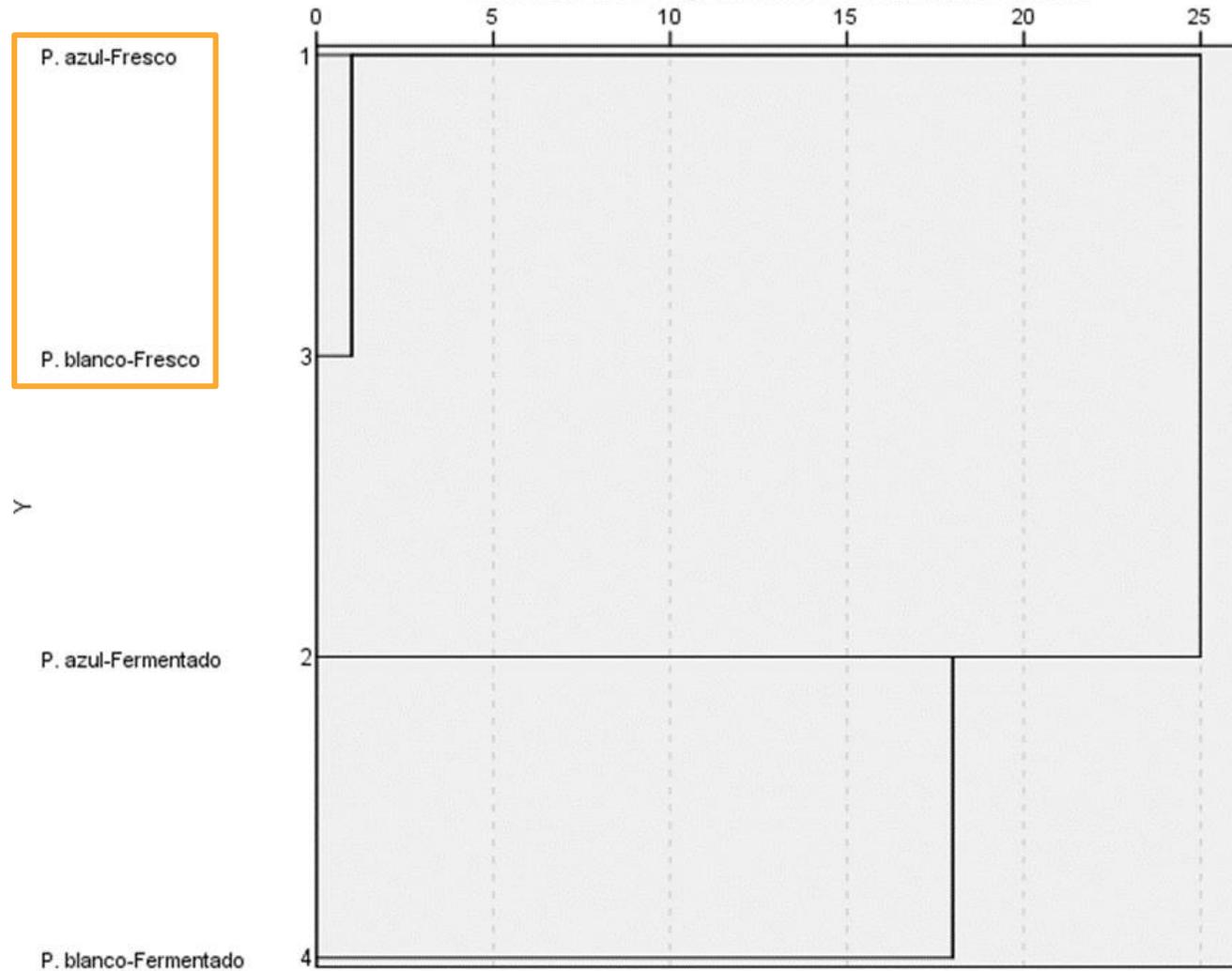


En nuestro caso de levaduras y bacterias ácido-lácticas, que son fermentadores naturales del chaguarmishqui (Hernández, 2009).

Análisis de conglomerados

Dendrograma que utiliza una vinculación única

Combinación de conglomerados de distancia re-escalados

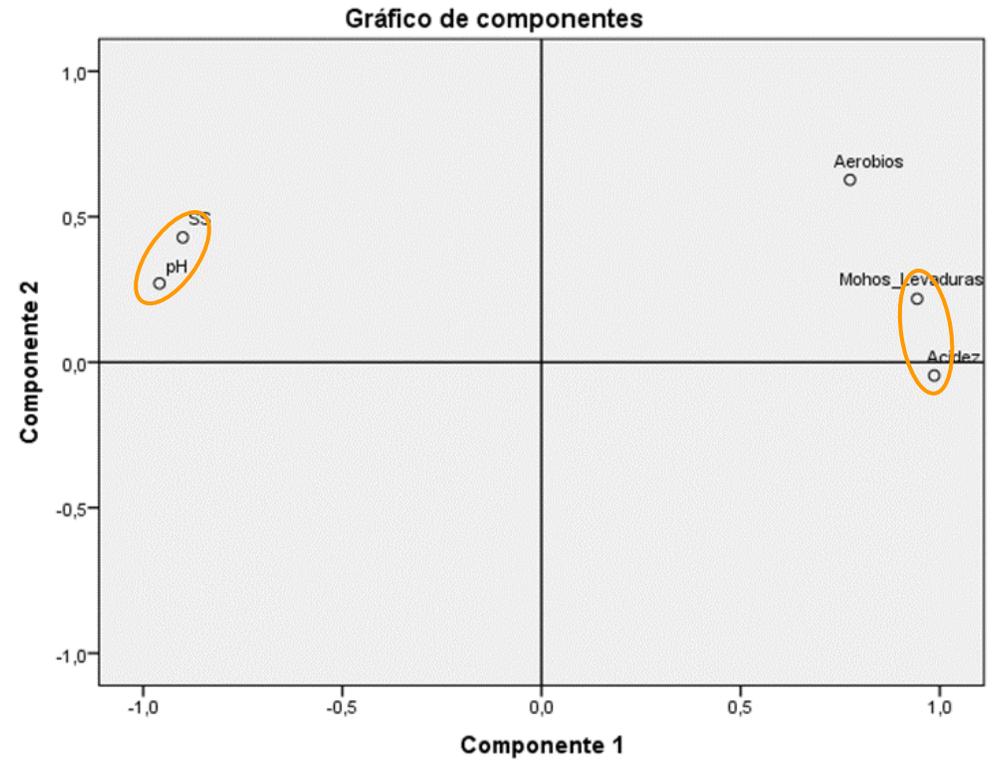


Análisis de componentes principales

Matriz de correlación

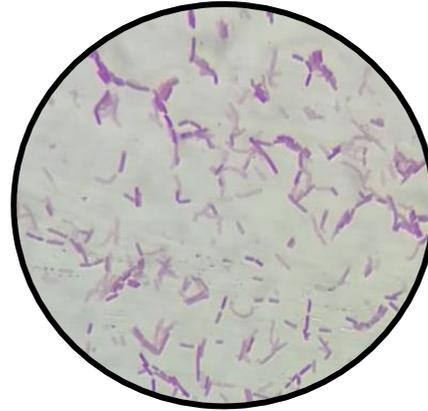
		pH	Acidez	Sólidos solubles	Aerobios	Mohos y levaduras
Correlación	pH	1,000	-,971	,974	-,580	-,825
	Acidez	-,971	1,000	-,896	,749	,880
	Sólidos solubles	,974	-,896	1,000	-,423	-,774
	Aerobios	-,580	,749	-,423	1,000	,846
	Mohos y levaduras	-,825	,880	-,774	,846	1,000

Gráfico de componentes principales

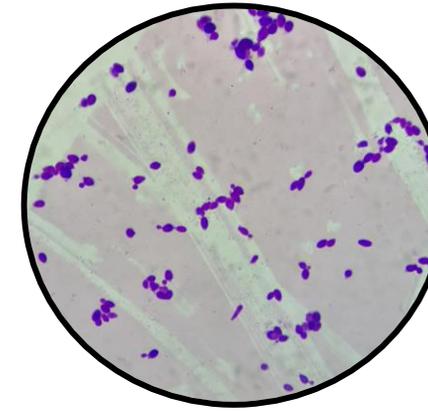


Identificación de bacterias ácido lácticas

Pruebas microbiológicas

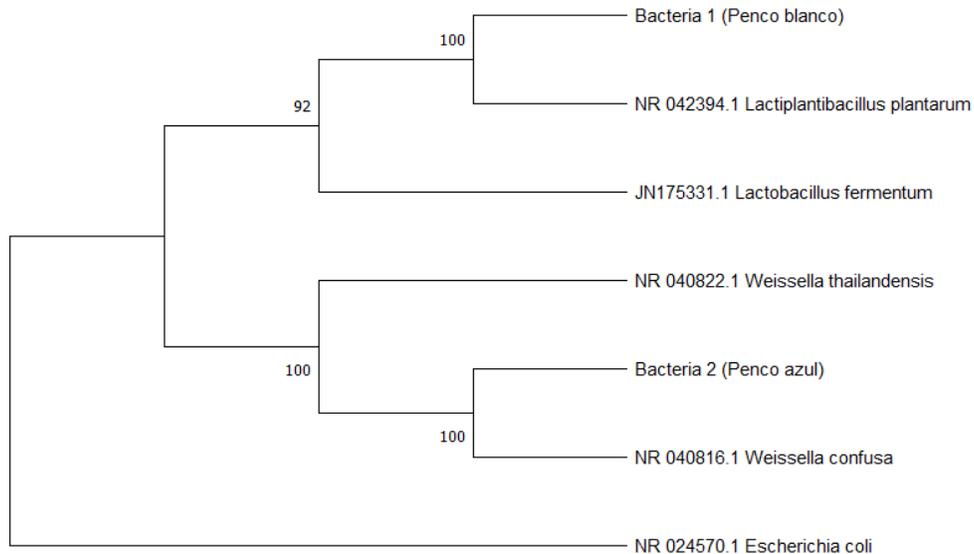


Gram positivo
Catalasa
negativo
Bacilo



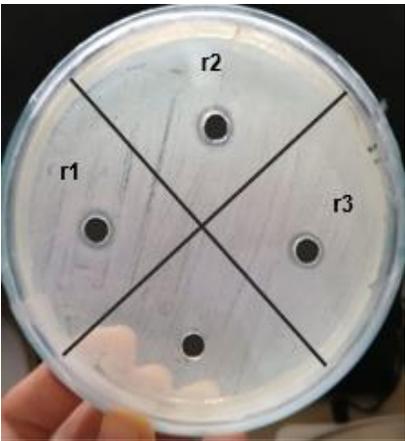
Gram positivo
Catalasa
negativo
Coco

Pruebas molecular

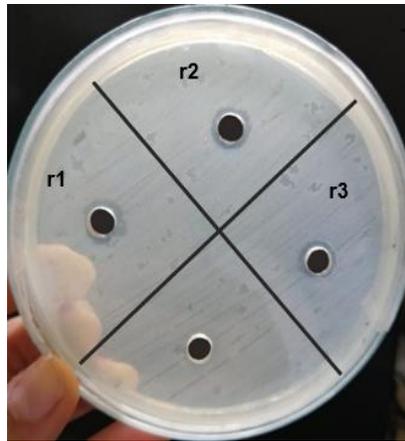


Código	Bacteria	Homología
Penco Azul	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
Penco Blanco	<i>Weissella confusa</i>	100%

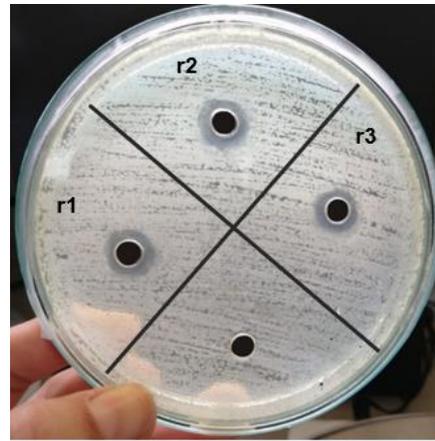
Actividad antimicrobiana



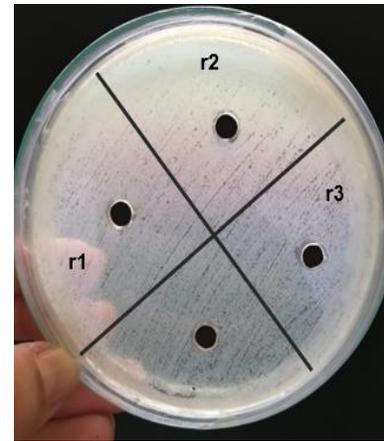
a0 b0 c0



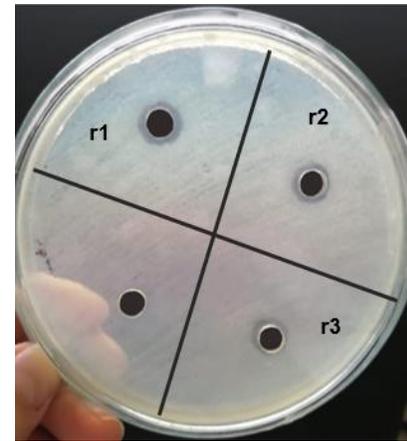
a0 b0 c1



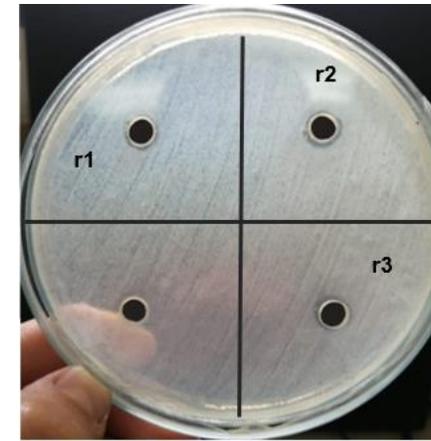
a0 b1 c0



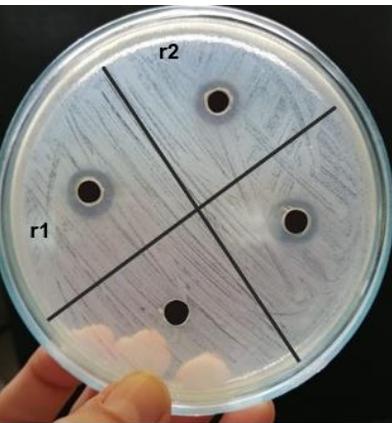
a0 b1 c1



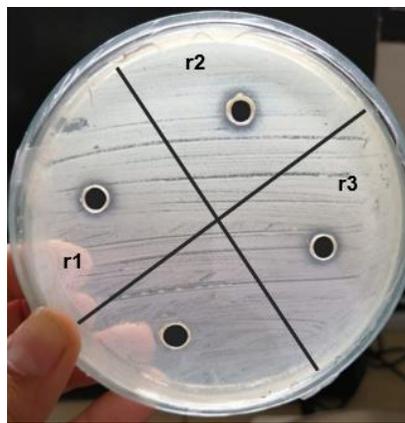
a0 b2 c0



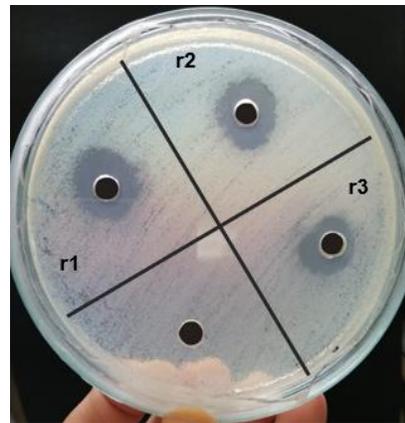
a0 b2 c1



a1 b0 c0



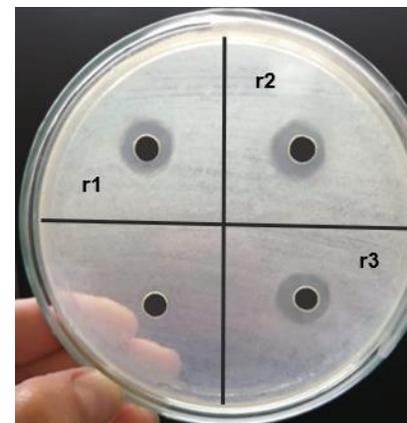
a1 b0 c1



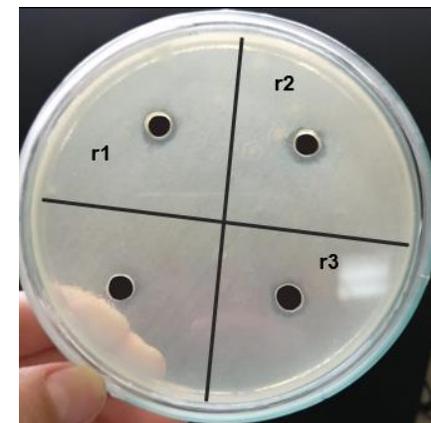
a1 b1 c0



a1 b1 c1



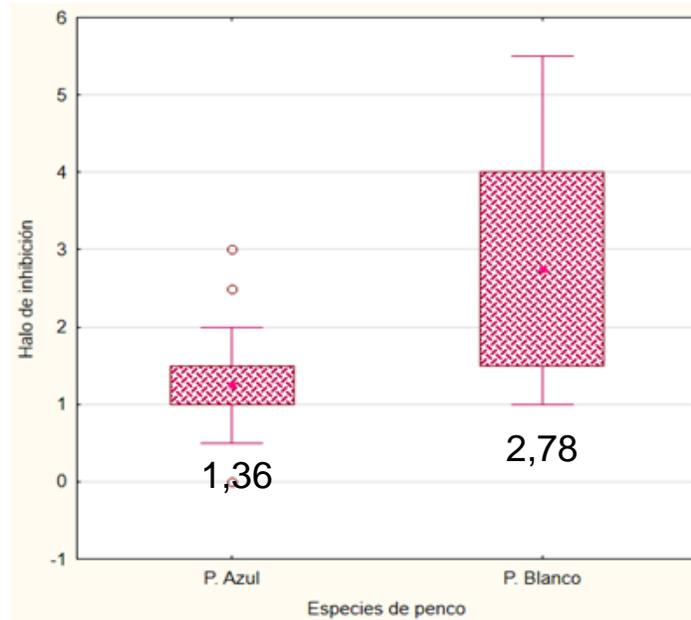
a1 b2 c0



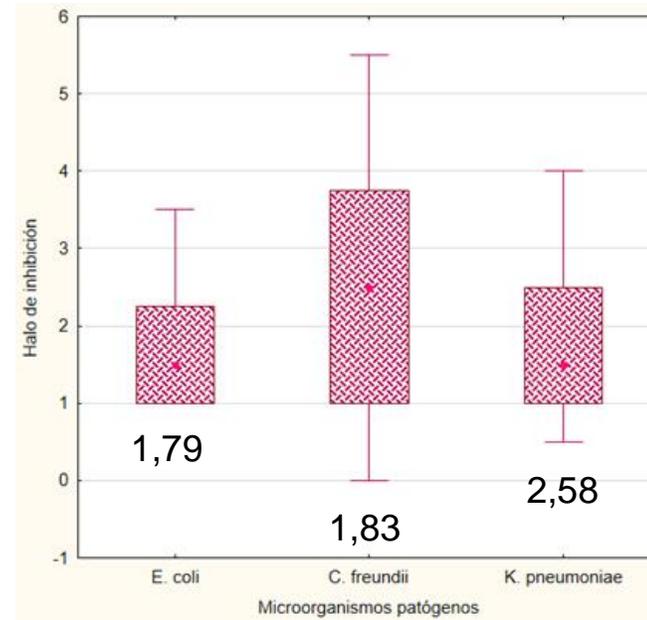
a1 b2 c1

Actividad antimicrobiana

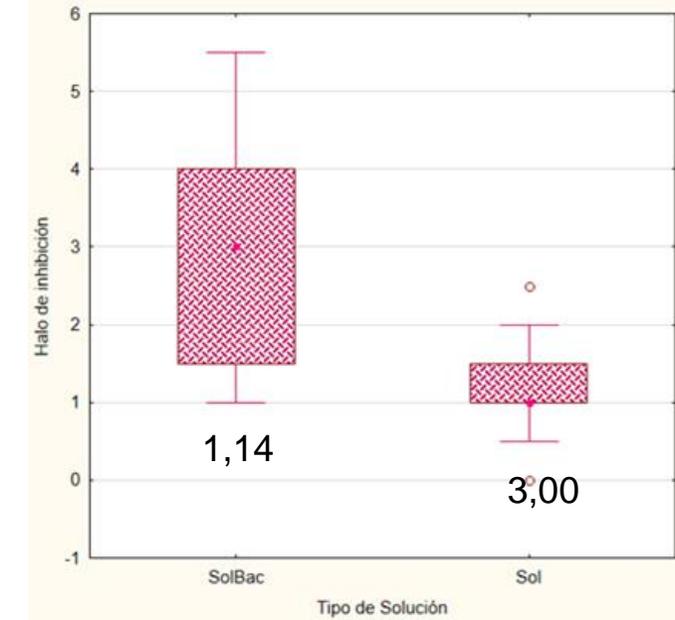
Factor A



Factor B



Factor C



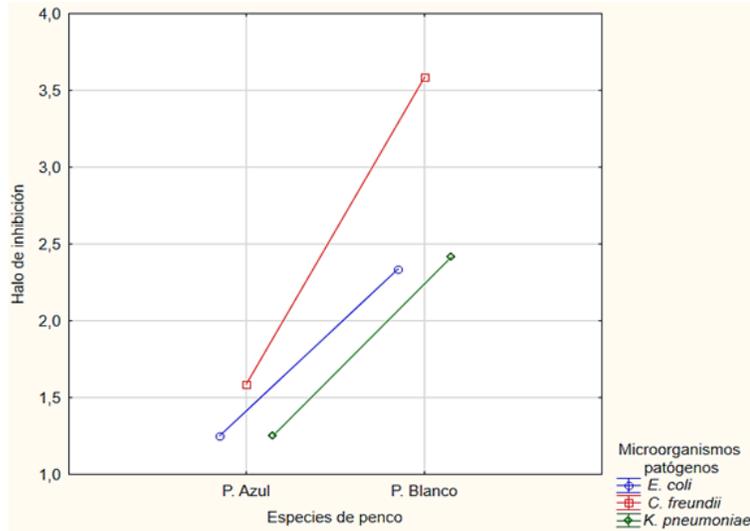
Jay (2002) menciona que en esta bebida se pueden encontrar microorganismos del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, y heterofermentativos del género *Weissella* y *Lactobacillus*.

Serna & Enríquez 2013 demostraron el efecto antimicrobiano contra *E. coli* y Bartkiene et al. (2020) evaluaron la inhibición de *K. pneumoniae* y *C. freundii* obteniendo resultados favorables.

El tratamiento que contenía la SolBac dió mejores resultados en cuanto a la actividad antimicrobiana, dado que al estar en conjunto estas tienen mayor capacidad para producir sus metabolitos (Serna & Enríquez, 2013)

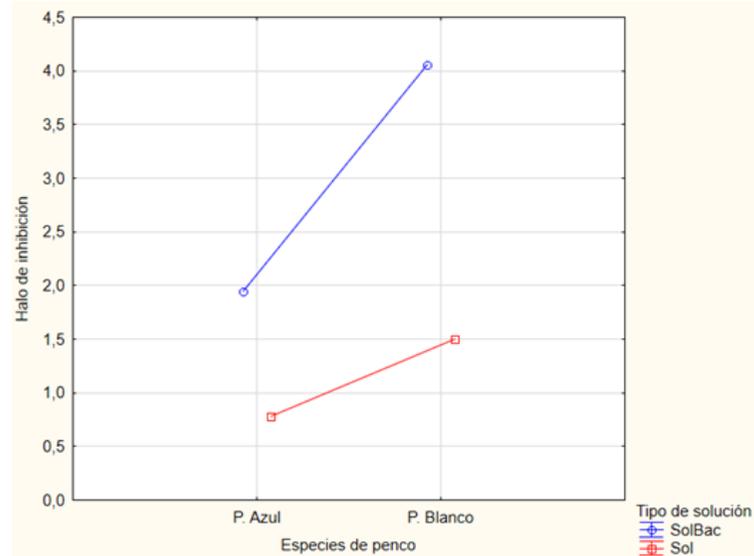
Actividad antimicrobiana

Interacción AxB



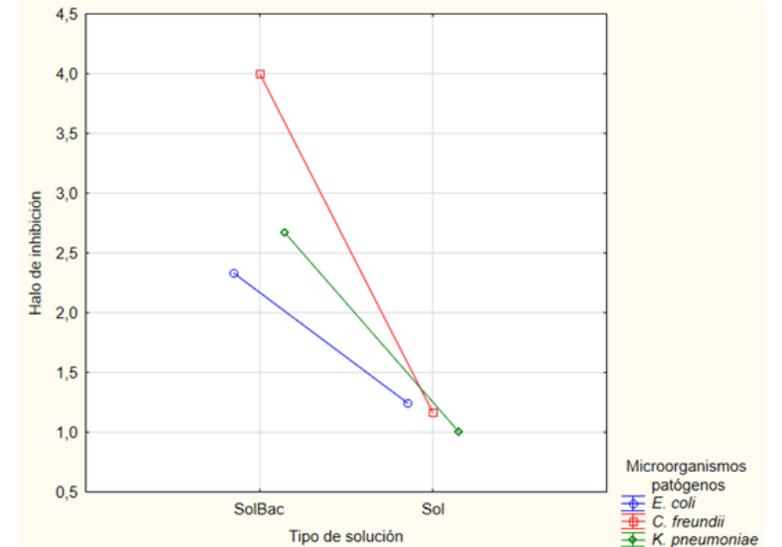
W. confusa permitió la mayor inhibición frente a *C. freundii*, debido a la producción por parte de estos de diferentes tipos de compuestos antibacterianos (Shah et al., 2016). *L. plantarum* no posee actividad antimicrobiana frente a los patógenos utilizados.

Interacción AxC



La SolBac producida a partir de *W. confusa* permitió los mejores efectos de inhibición, según Serna & Enríquez (2013) porque además la bacteria compete por los nutrientes.

Interacción BxC



La SolBac fue efectiva contra *C. freundii*, produciendo un halo de 4 mm, Bartkiene et al. (2020) menciona que esta bacteria es sensible a compuestos que exhiben las BAL.



5

Conclusión y Recomendación



Conclusiones



Respecto a la Caracterización

1

El extracto del penco blanco presenta valores más elevados de pH y grados Brix que del penco azul, debido a la notable diferencia en cuanto la maduración y además tiene una mayor población tanto de aerobios como de mohos y levaduras, ya que proporciona un medio con mayor concentración de azúcares

2

Entre los tratamientos fermentados y sin fermentan se muestra una disminución de pH y sólidos solubles, y un aumento de los valores que corresponden a la acidez, recuento de aerobios y recuento de mohos y levaduras después de los 3 días de fermentación

3

Se concluye que el chaguarmishqui del penco blanco, ofrece una mayor eficiencia para la fermentación, ya que, presentó un mayor contenido de azúcares iniciales y una mayor población de microorganismos incluso durante la fase exponencial de fermentación.



Conclusiones



Respecto al aislamiento

Se evidenció presencia de BAL para ambas especies de penco, dado que presentaron características morfológicas similares a las descritas para estas bacterias. Además, mediante una caracterización morfológica se determinó que *L. plantarum* es la bacteria predominante en la especie de penco azul y *W. confusa* en la especie de penco blanco.





Conclusiones



Respecto a la Actividad antimicrobiana

1

Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco tienen actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos. En nuestro caso, el microorganismo aislado del penco blanco, *Weissella confusa*, permitió mayor inhibición que el aislado del penco azul, *Lactobacillus plantarum*.

2

La inhibición que presentan está influenciada por la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas, demostrándose que *C. freundii* es el patógeno con mayor sensibilidad frente a las BAL y, que *E. coli* es el más resistente.

3

Los tipos de solución obtenidos a partir de la solución madre de BAL influyen en la actividad antimicrobiana frente a los distintos patógenos, siendo la SolBac la que permitió los mejores resultados en comparación con la solución libre de bacterias.



Conclusiones



4

Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos conformados por el microorganismo aislado del penco blanco frente a *C freundii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo el primero el que mayor sensibilidad mostró ante esta cepa.

5

La actividad antimicrobiana más representativa se mostró en un solo tratamiento, en específico, la SolBac obtenida de la BAL aislada del penco blanco fue la que exhibió el mayor halo de inhibición y por tanto la más efectiva para contrarrestar el crecimiento de patógenos.

6

El enfrentamiento entre la SolBac contra *C. freundii* fue el que mayor capacidad inhibitoria mostró en relación con los demás, por lo tanto, se concluye que el efecto de las interacciones entre los microorganismos patógenos y los tipos de solución influyen en la actividad antimicrobiana.

7

Finalmente, debido a que no existió diferencia significativa entre los tratamientos de los factores A, B y C, se concluye que el efecto de las interacciones entre las especies de penco, los microorganismos patógenos y los tipos de soluciones preparadas no influye en la actividad antimicrobiana.



Recomendaciones



1

Debido a la falta de investigaciones en torno a la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui, se recomienda realizar más estudios comparativos, especialmente de la especie de penco blanco. Además, en un estudio de comparación entre el extracto de ambas especies, se recomienda conseguir la pulpa de plantas con el mismo tiempo de maduración y técnicas de recolección.

2

Se recomienda realizar una caracterización más detallada de las bacterias ácido lácticas presentes en el Chaguarmishqui, ya que, en nuestro estudio únicamente se analizaron las predominantes.

3

Se recomienda utilizar la SolBac para estudios de capacidad antimicrobiana de las BAL, además para mejores resultados en cuanto a la actividad antimicrobiana el uso de *W. confusa* para contrarrestar el efecto de patógenos Gram negativos, especialmente contra *C. freundii*.

4

Debido a que no se logró una caracterización de los metabolitos obtenidos por las diferentes BAL, se recomienda un estudio del contenido péptidos mediante espectrofotometría de alta densidad (HPLC), especialmente para *W. confusa* de la cual no se tiene mucha información. Asimismo, para realizar estudios de antagonismos entre bacterias probióticas y bacterias patógenas se recomienda utilizar el método de difusión de pozos, ya que es una técnica que resulta más sensible.

Gracias

