



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano”

Autores: Serpa Gavilánez, Evelyn
Viteri Uribe, Brandon Fernando

Tutora: Ph.D. Sánchez Llaguano, Sungey Naynee

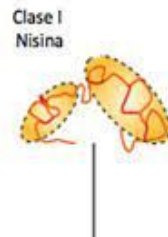
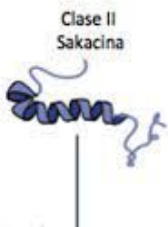
Santo Domingo, Ecuador
2023





Chicha de Chontaduro

Es una bebida fermentada tradicional de la Amazonía que prepara la población Shuar entre los meses de marzo y junio



Bacteriocinas

Son sintetizadas por BAL, y están inactivas.

Objetivos

1
Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro)

2
Evaluar distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y fructosa-peptona), en la producción de bacteriocinas.

1

2

5

5
Estudiar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas de la bebida fermentada tradicional (Chicha de chontaduro), en distintos microorganismos patógenos (Hongos y bacterias).

Aislar y caracterizar bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano.

3

3
Establecer concentraciones adecuadas de sustrato, en la producción de bacteriocinas.

4

4
Determinar el tiempo óptimo requerido, en la producción de bacteriocinas.



Hipótesis

Factor A (Tipo de sustrato)

H0: Los dos tipos de sustratos no influyen en los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocina

H1: Los dos tipos de sustratos influyen en los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocina

Factor B (Concentración del sustrato)

H0: La concentración del sustrato no influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocinas

H1: La concentración del sustrato influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de las bacteriocinas

Factor C (Tiempo)

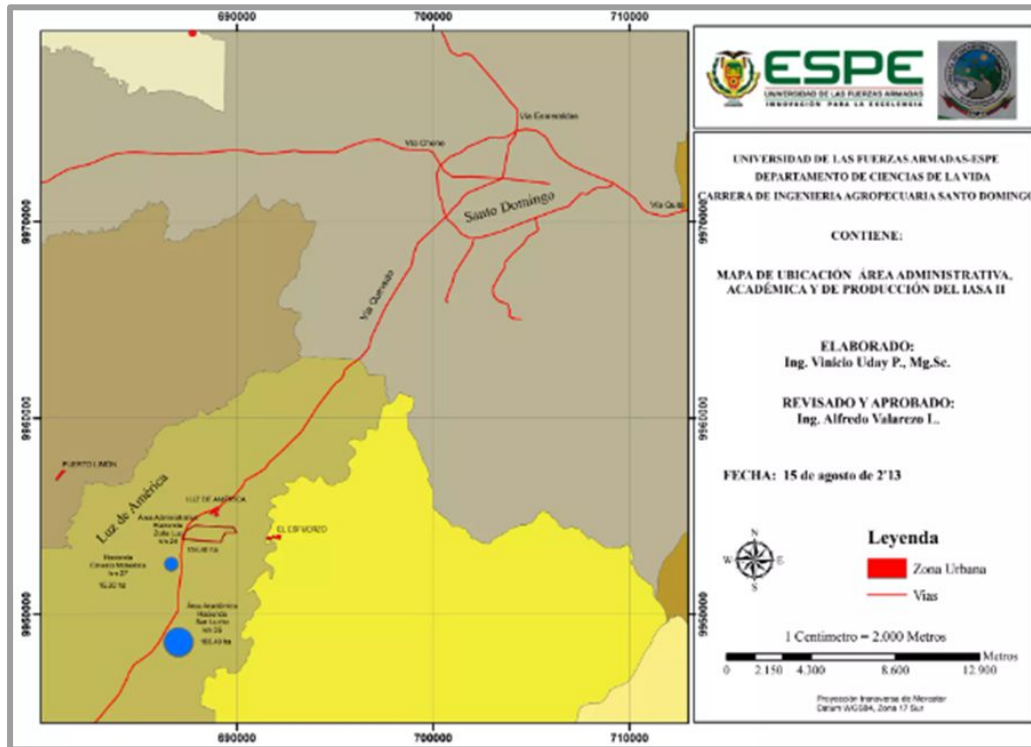
H0: El tiempo no influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocinas

H1: El tiempo influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de las bacteriocinas



Materiales y Métodos

Figura 1. Mapa de ubicación geográfica del área de investigación.



Ubicación política

País: Ecuador
Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón: Santo Domingo
Parroquia: Luz de América
Sector: Vía Quevedo, Km 24

Ubicación ecológica

Zona de vida: Ecológica
Altitud: Bosque Húmedo Tropical
Temperatura: 25 °C
Precipitación: 2860 nm/año
Humedad relativa: 85%
Heliofania: 680 horas luz/año
Suelos: Franco arenosos



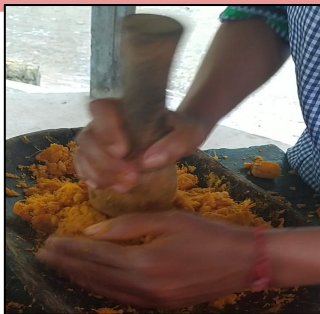
Elaboración de chicha de chonta

Comuna "Juan Montalvo"

5 Fermentación por tres días



4 Eliminación de semilla y trituración del fruto



3 Corte de la cáscara del fruto



1 Obtención del fruto chontaduro



2 Cocción del fruto

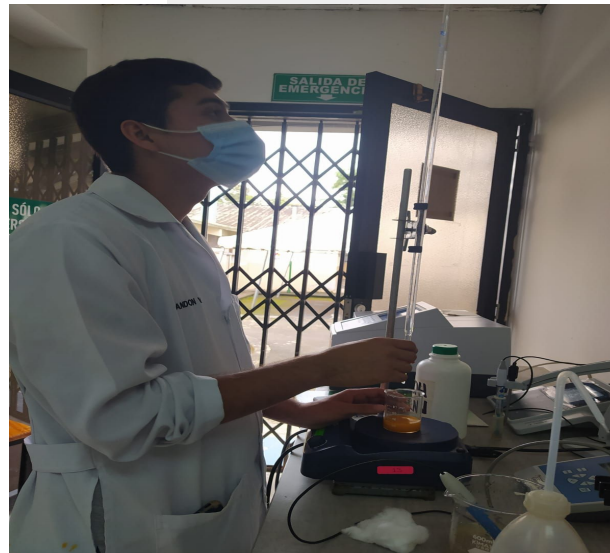


Caracterización físicoquímica de la bebida fermentada

pH



Acidez



Grados alcohólicos



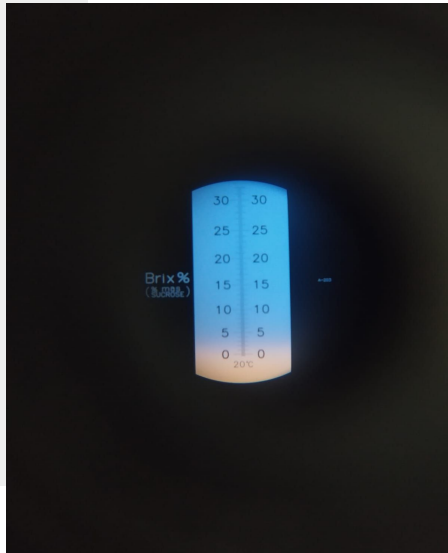
$$A = \frac{(V \text{ usado para titulación} * \text{Normalidad de NaOH} * \text{peso molecular del ácido})}{V \text{ de muestra diluida}}$$



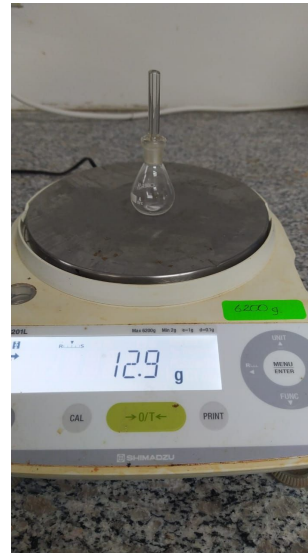
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Caracterización físicoquímica de la bebida fermentada

Grados Brix



Densidad

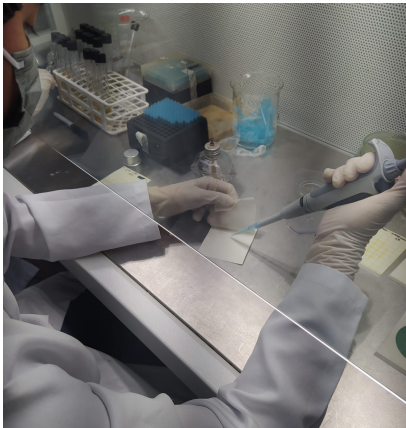


$$P = \frac{w_{\text{picnometro con muestra}} - w_{\text{picno vacio}}}{w_{\text{picno con agua destilada}} - w_{\text{picno vacio}}} * p_{\text{agua}}$$

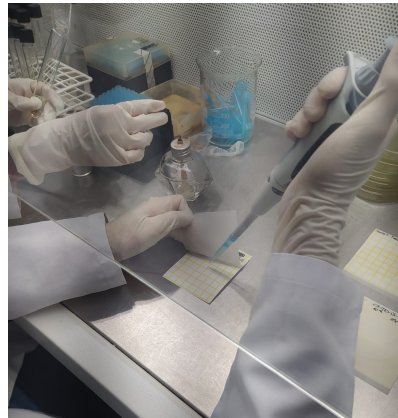


Caracterización microbiológica de la bebida fermentada

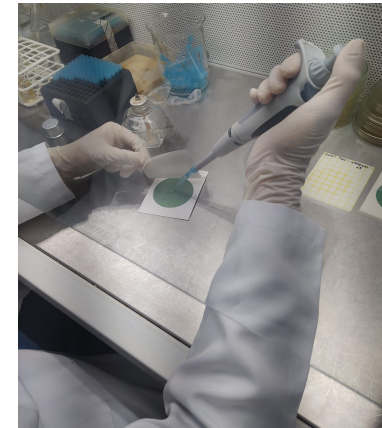
Mohos y levaduras



Aerobios mesófilos



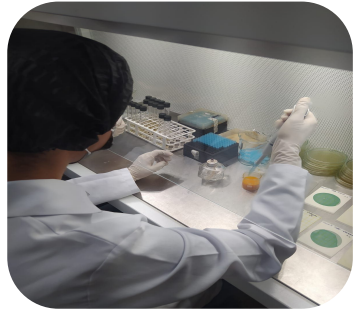
Ácido lácticas



$$\text{Recuento(UFC mL)} = \frac{\#colonias * \text{Inverso del factor de dilucion}}{\text{Volumen inoculado}}$$



Aislamiento de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro



Toma la muestra para las diluciones

1

Agitación

2



Dilución 10^{-4}

3

Sellado

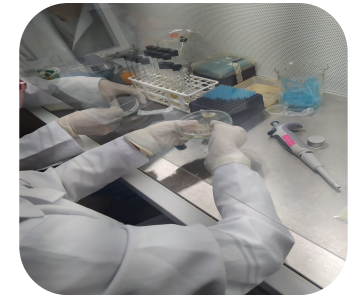
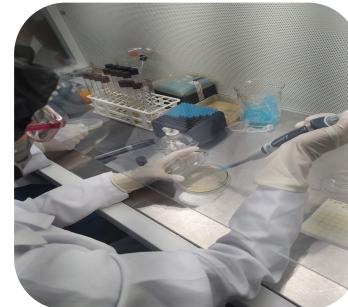
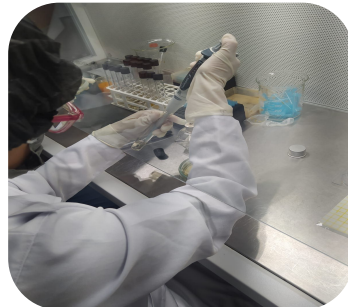
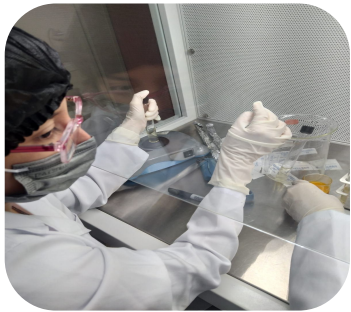
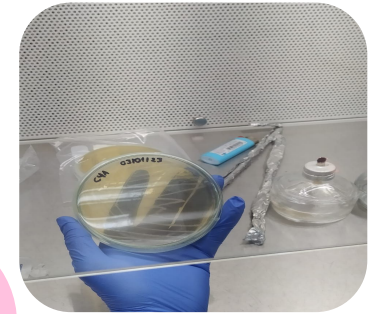
5

Siembra

4

6

Aislamiento



Identificación de colonias aisladas

Tinción gram

Cristal violeta, Lugol, alcohol cetona y safranina(60 segundos)



Prueba de catalasa

Una gota de peróxido de hidrógeno, produce burbujas



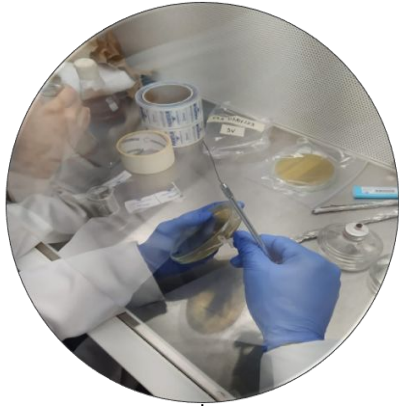
Prueba de oxidasa

3 gotas del reactivo Kovacs

Coloración rosada, púrpura o negra un resultado positivo



Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas



Replicación en Caldo MRS

Inoculación de la colonia 1 en Caldo MRS

1



Elaboración del Medio

Composición del medio con fuente de Carbono-Nitrógeno y muestra de cultivo

2



Agregación del equipo de muestreo

Equipo de venoclisis

3



Incubación

Por 72 horas

4



Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas



Muestreo

A las 0, 24, 48 y 72 horas.

5



Parámetros cinéticos

Medición de Grados Brix, Ph, acidez y Absorbancia.

6



Obtención del fermentado

Fructosa-peptona 5%
Glucosa-peptona 5%

7



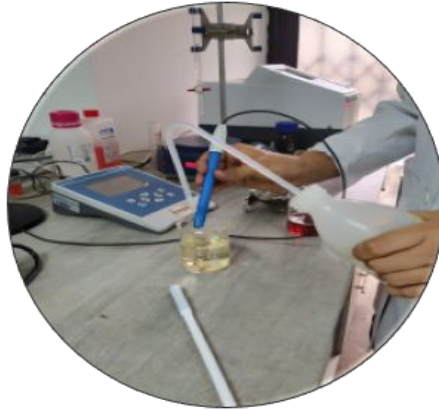
Centrifugación

10000 rpm por 20 minutos

8



Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas



Ajuste de pH

Entre 6-6,5 con NaOH 1N, para inhibir el efecto de ácidos orgánicos

9



Filtración

Se filtró el sobrenadante

10



Ensayos de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas

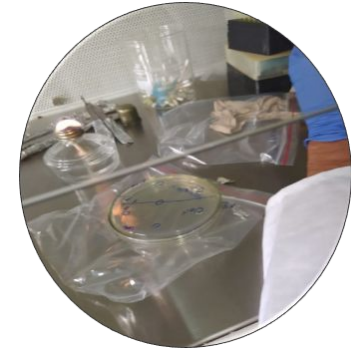
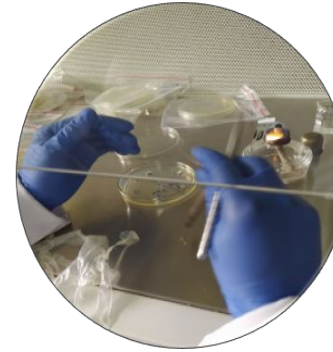
Solución salina

Toma de inóculo

Esparcimiento del inóculo patógeno

Perforación

Bacteriocina



Solución con los tres microorganismos patógenos

Volumen del inóculo microbiano patógeno

Sobre la superficie del Medio Agar Muller Hinton

Agujero de 5 mm de diámetro con sacabocados

Se introdujo en el pozo 15 μ L de bacteriocina y se incubó



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Diseño Experimental

Diseño A*B*C

Factores del experimento

Factores	Niveles
Tipo de sustrato(A)	A0: Glucosa-peptona
	A1: Fructosa-peptona
Concentración del sustrato(B)	B0: 0,5%
	B1: 2%
	B2: 5%
	B3:7%

Tiempo(C)	C0: 0 horas
	C1: 24 hora
	C2:48 horas
	C3:72 horas

Tipo de diseño
Modelo factorial
(2x4x4) conducido en
D.B.C.A

Análisis funcional
Prueba de
significancia de
Tukey al 5 %



Resultados y Discusión

Caracterización de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”

Acidez	pH	°Alcohólicos	°Brix
0,2294	4,5	<5°	3

En referencia a la Norma Técnica NTE INEN 2262:2013 sobre bebidas alcohólicas, pH (3,8 a 4,8), acidez (máximo 0,3).

(Guanoluisa & Lanchimba, 2021) obtuvo 2,5 grados alcohólicos en la chicha de chonta y grados brix 3.

Si se desea tener mayor grado alcohólico, los grados brix deben subir a 5 – 22 como lo reporta (Saigua & Sánchez, 2021)



Caracterización microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”

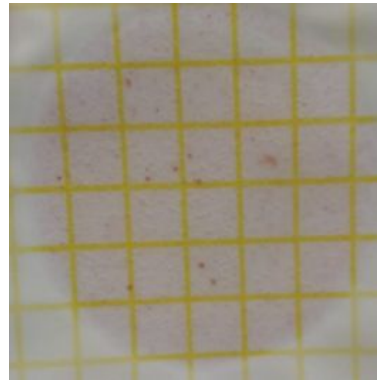
Mohos y levaduras

Aerobios

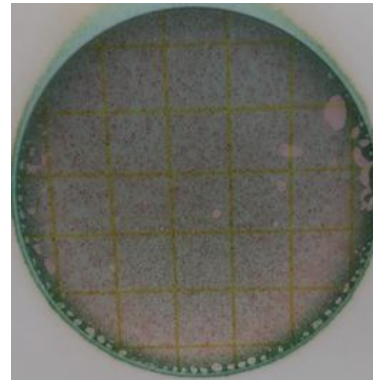
Ácido lácticas



1E+4 UFC/mL



2,17E+6 UFC/mL




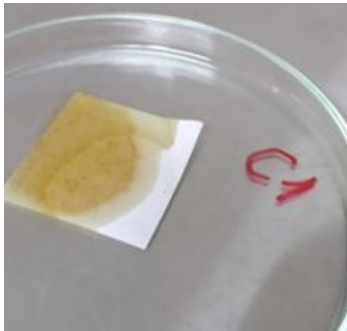


3E+6 UFC/mL

(Murillo & Chiluzza, 2019) pudo aislar 14 bacterias ácidos lácticas de la chicha de chonta



Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro

Colonia	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
			
Colonia 1	(+)	Negativo	Negativo

Según Murillo & Pullupaxi (2019), las BAL son un color crema-amarilla con textura pastosa, no esporulados, gram positiva y en su mayoría presentan en forma de bacilo.

(Khalid,2011) menciona que las BAL tienen catalasa y oxidasa negativa, que crecen en ambientes con pH ácido (4 a 4.5).



Actividad Antimicrobiana

Tratamiento	<i>Lysinibacillus macroides</i> (AU/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (AU/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (AU/mL)
Glucosa-peptona+5%+72 horas	263,9	214,3	229,7
Fructosa-peptona+7%+72 horas	324,9	263	246,2

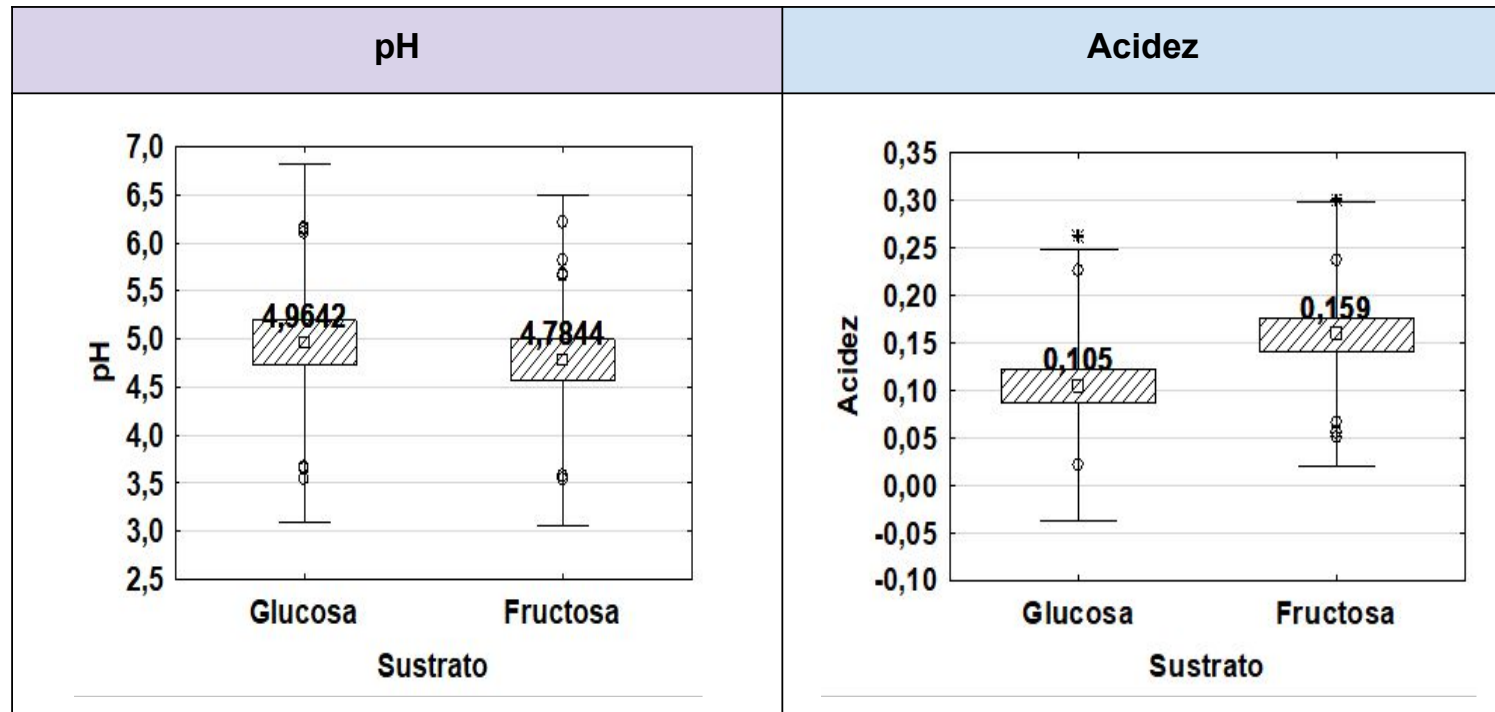
Segun (Snyder et al, 2014) para obtener bacteriocinas se usan comúnmente BAL por su actividad antimicrobiana de inhibir o destruir a otras bacterianas

Reddy y colaboradores (2008) mencionan que en una fermentación el pH puede descender hasta 4 o menos, produciendo inhibición de microorganismos patógenos.

Respecto al tiempo, el estudio de Rivera (2014) reporta concentraciones elevadas en bacteriocinas al final de la etapa fermentativa



FACTOR A (Tipo de sustrato)

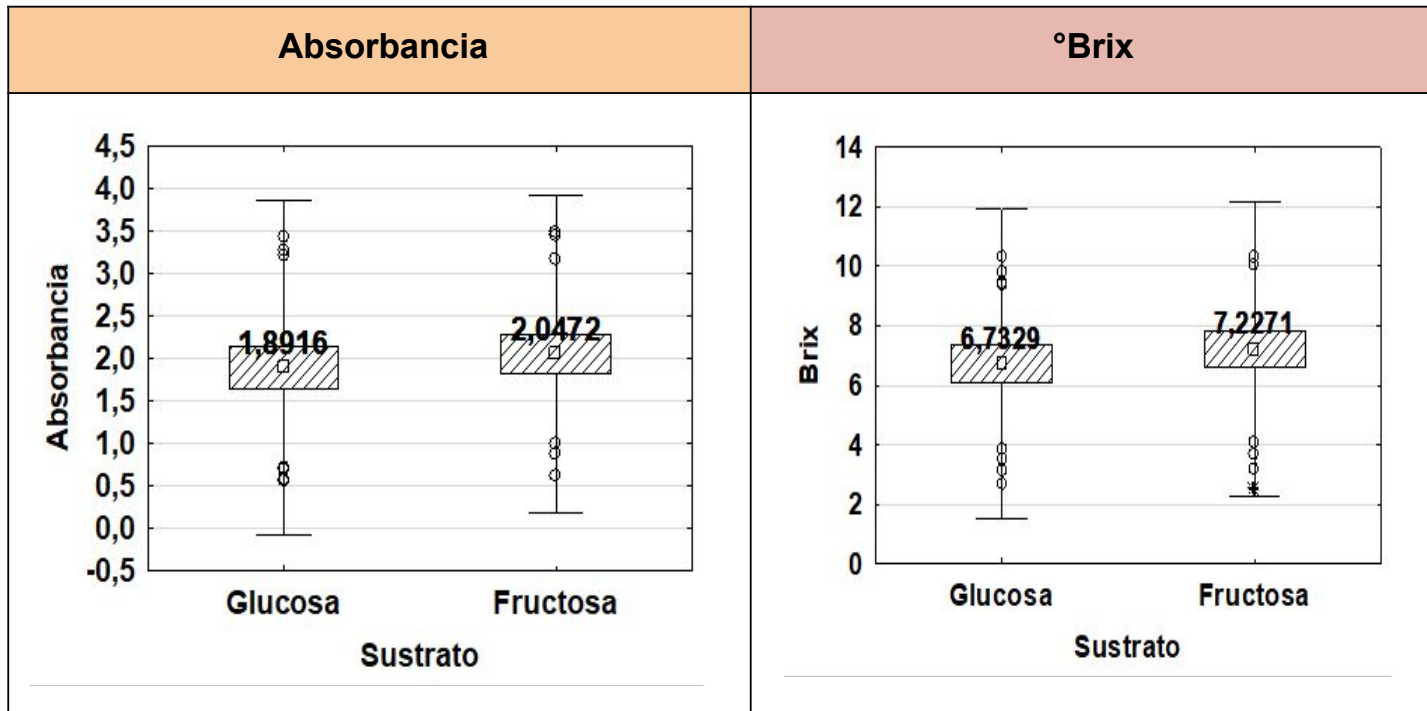


En el estudio de (García et al., 2013), menciona que utilizar una fuente extra de carbono se obtiene mayor crecimiento bacteriano, y la fuente de nitrógeno favorece la producción de ácido láctico.

Dichos valores son diferentes al trabajo de Uribe-Aveiga (2021) donde obtuvo con el sustrato Glucosa 0,9 de acidez y Fructosa 0,10.



FACTOR A (Tipo de sustrato)

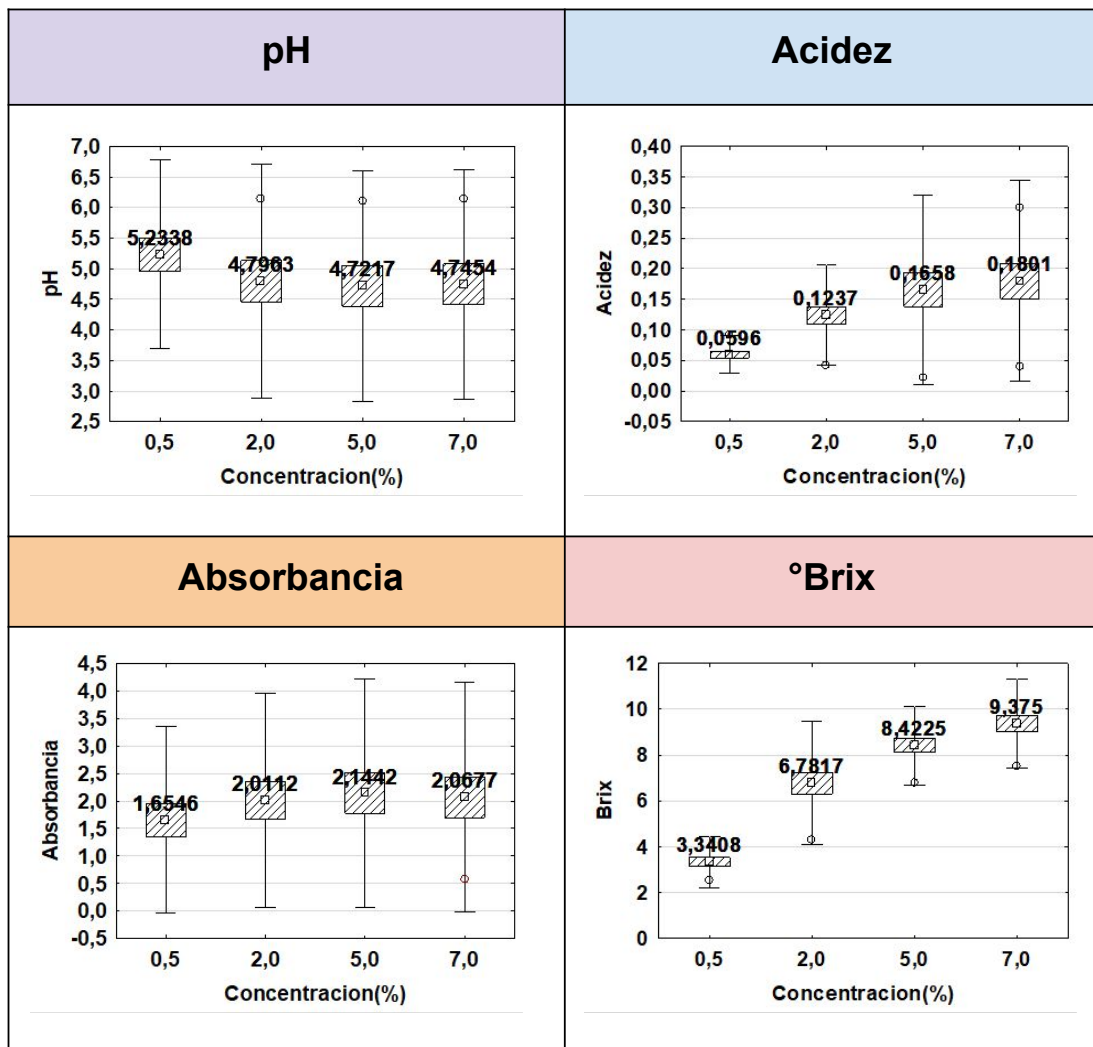


En el estudio de Uribe-Aveiga (2021) se evidencia el mismo resultado para las bacterias ácido lácticas, teniendo mayor crecimiento bacteriano para fructosa en comparación de glucosa.

Según (Reddy et al., 2008), el crecimiento reduce el contenido de carbohidratos de los alimentos que fermentan.



FACTOR B (Concentración)



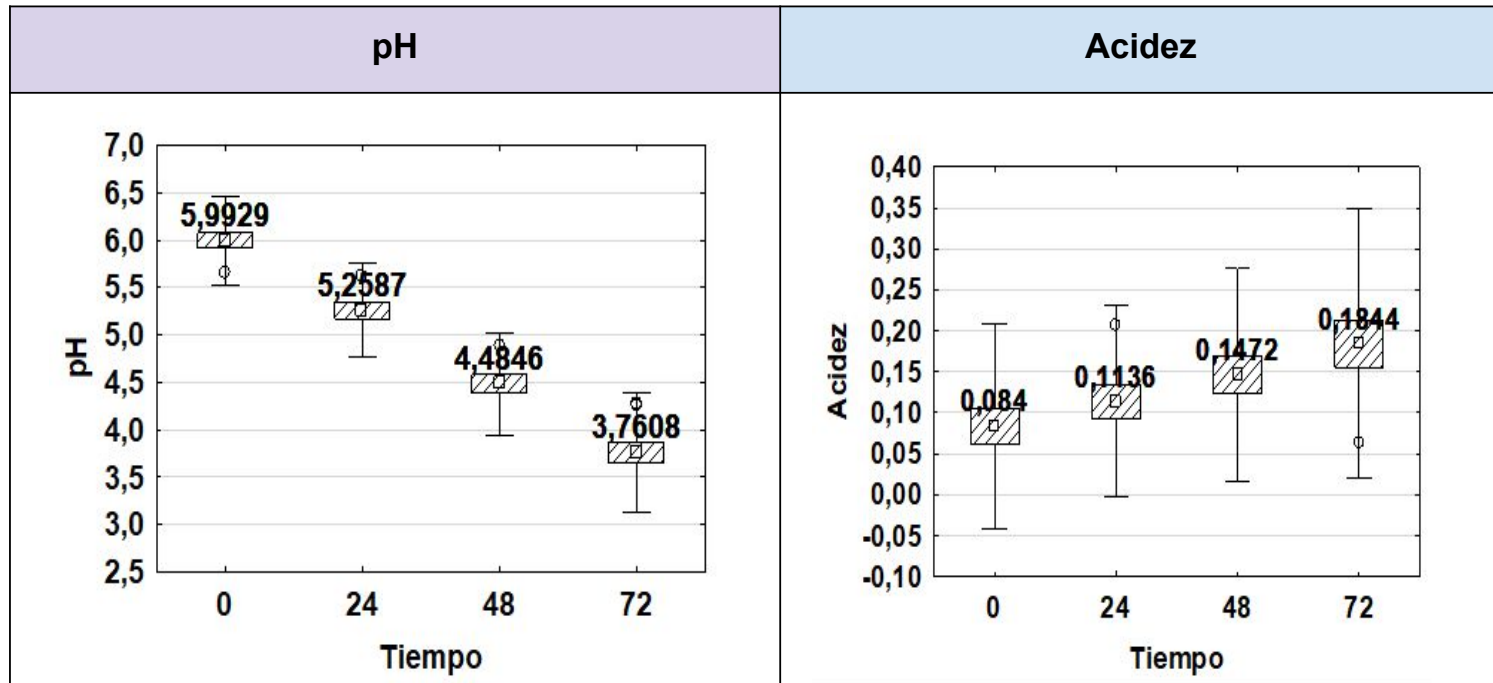
En el trabajo de Uribe-Aveiga (2021), se utilizó la concentración de 5% p/v, obtuvo un valor de 4,09 pH, 0,11 de acidez, absorbancia 1,63 y grados brix (9,43).

Papadimitriou (2016), menciona que en un medio con pH bajo y una alta concentración de carbohidratos, las BAL disminuyen la síntesis de ácido láctico viéndose afectado su crecimiento.

En el estudio de Ossa y colaboradores (2010), la influencia del exceso o deficiencia del sustrato afecta en el crecimiento celular.



FACTOR C (Tiempo)

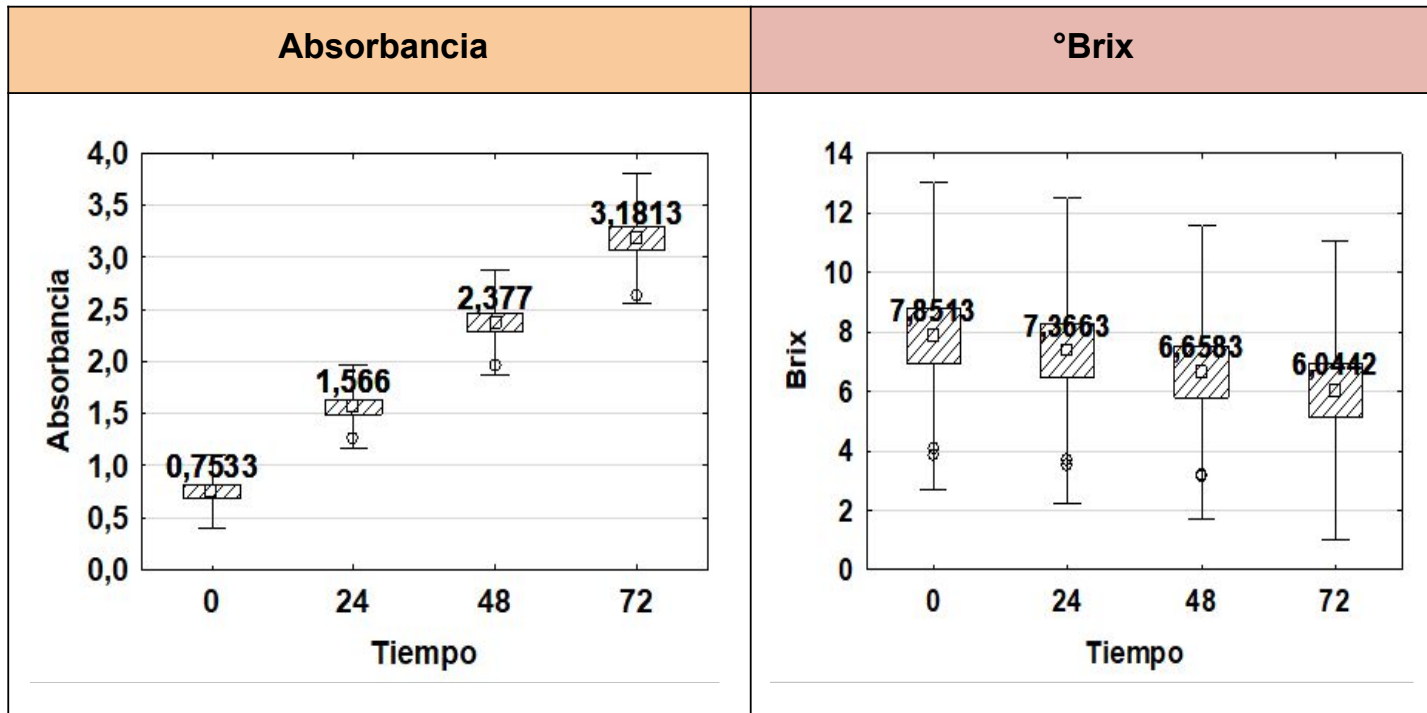


(Schirru et al., 2014), menciona que, factores como el tiempo influyen en la producción de bacteriocinas.

Según Even y (2002), las bacterias ácido lácticas son tolerantes a los ácidos colaboradores, aunque la acumulación de ácido láctico puede influir en la última etapa de crecimiento, debido a la autoacidificación.



FACTOR C (Tiempo)



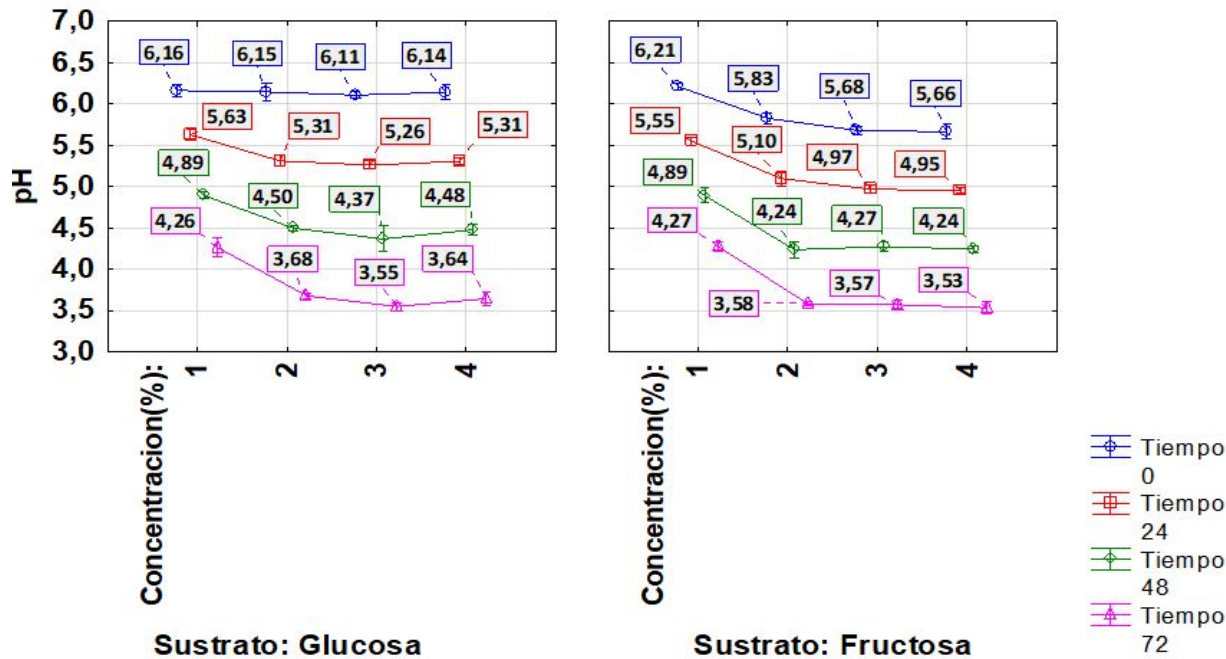
En el estudio de (Rezvani et al., 2017), obtuvo mayor crecimiento bacteriano de la bacteria *L. delbrueckii* subsp. *lactis* después de 48 horas, como sucedió en el presente estudio (72 horas).

La bacteria aún estaba metabolizando las fuentes del medio. Lo cual indica que la bacteria siguió en una etapa de crecimiento



INTERACCIÓN AXBXC

pH



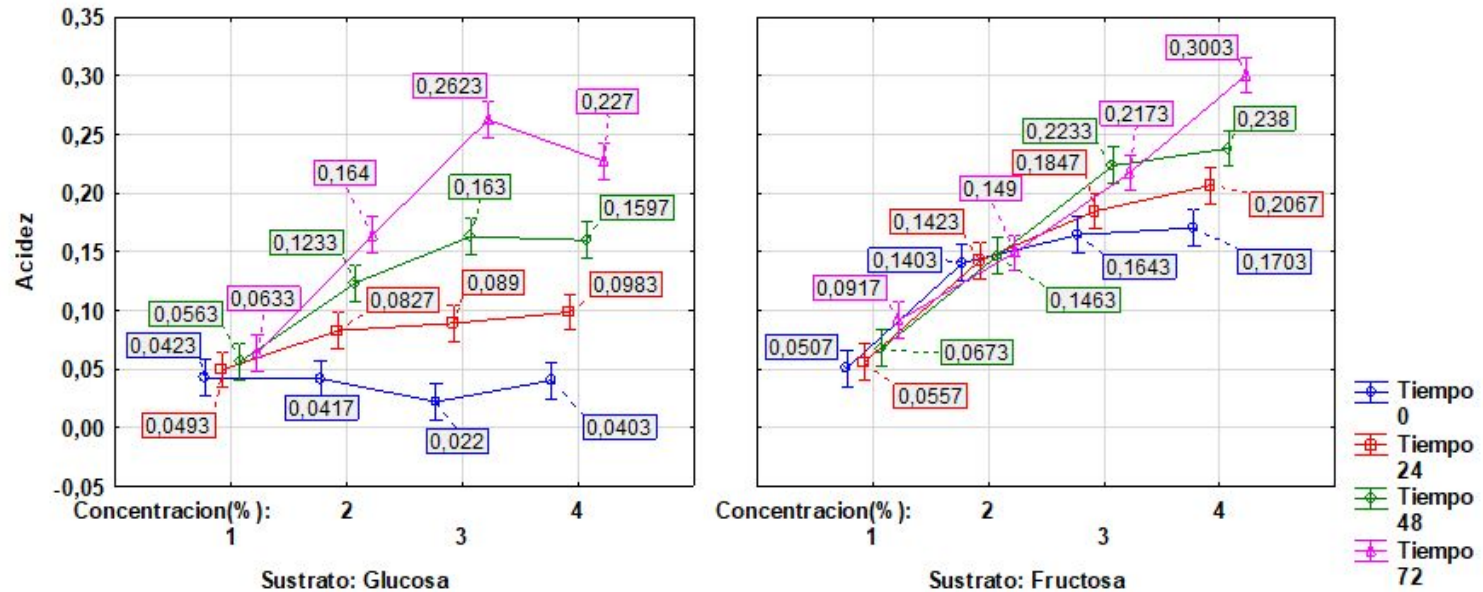
Según (Alquicira, 2006) la composición del medio de cultivo, como el tipo de sustrato y las concentraciones de las fuentes de nitrógeno y carbono tienen un efecto clave en la producción de bacteriocinas.

Se obtuvo un mayor valor de pH en el grupo Glucosa-Peptona+0,5%+0 horas (6,21) evidenciando que la bacteria prefiere un medio más suplementado, además este valor se dio debido a que la bacteria aún estaba en un proceso de adaptación.



INTERACCIÓN AXBXC

Acidez



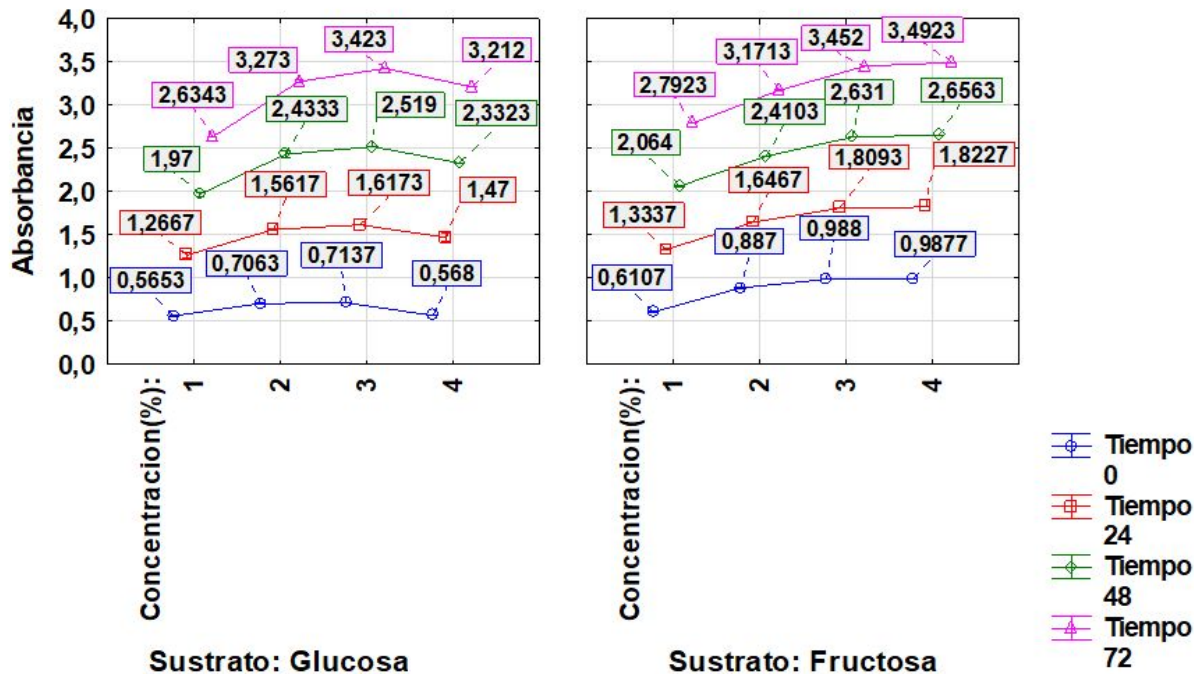
A mayor concentración del sustrato fructosa tendrá mayor producción de ácido láctico, hasta llegar una etapa de muerte autoacidificandose (Serrazanetti et al., 2013).

La bacteria produce mayor ácido láctico a través del tiempo.



INTERACCIÓN AXBXC

Absorbancia



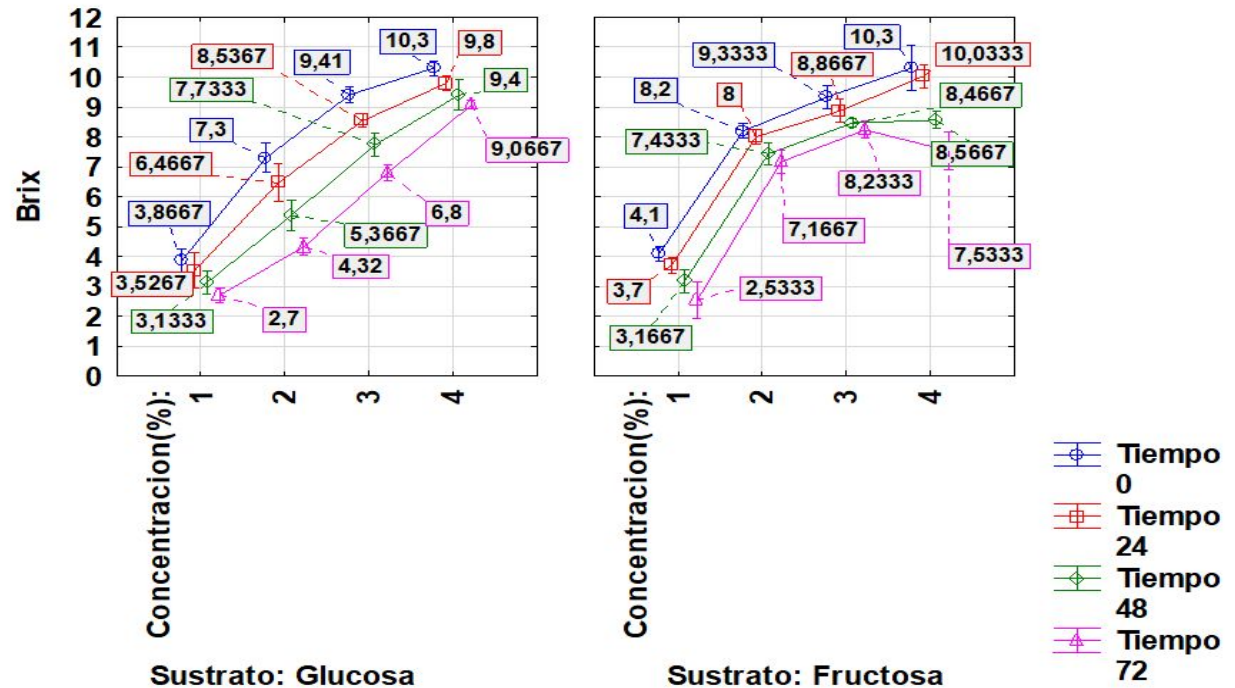
La cepa bacteriana creció más en el tratamiento Fructosa-peptona+7%+72 horas (3,49), lo cual demostró que el crecimiento bacteriano está correlacionado con la acidez. Sin embargo, el pH con la absorbancia contiene una relación muy estrecha inversamente proporcional



INTERACCIÓN AXBXC

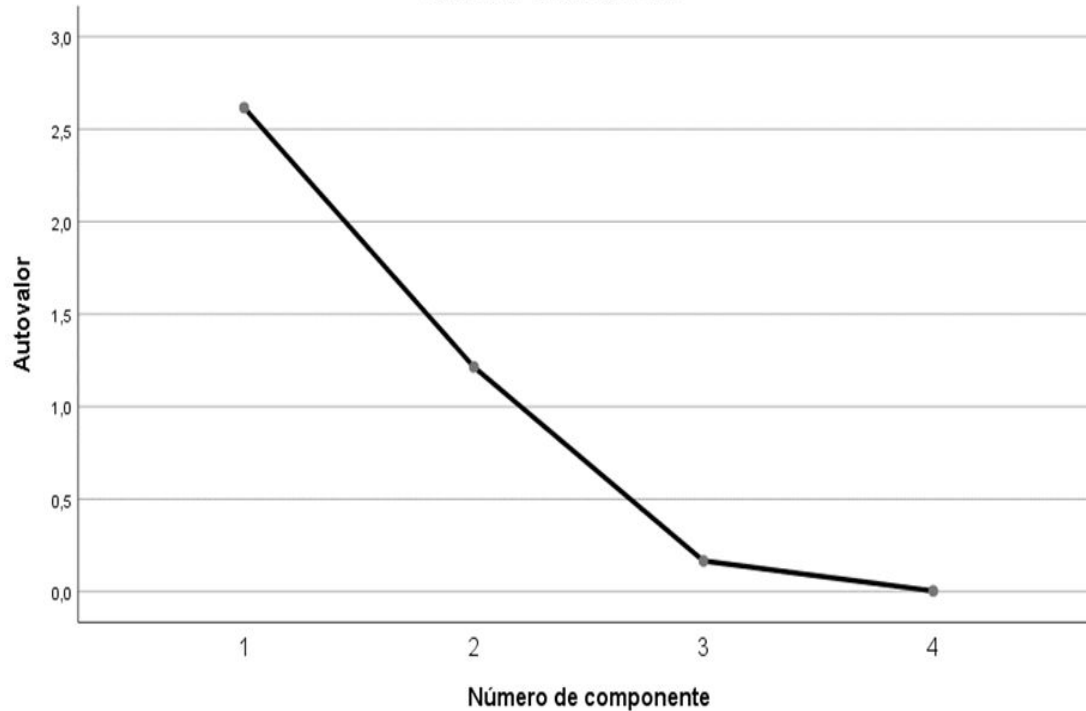
Fructosa-peptona+0,5%+7
2 horas (2,53 grados brix)
debido a que contiene la
menor concentración, y
que la bacteria consume
los nutrientes en el mayor
rango de tiempo estudiado.

Brix



INTERACCIÓN AXBXC

Gráfico de sedimentación



Se identifica los 2 componentes principales:



Donde:

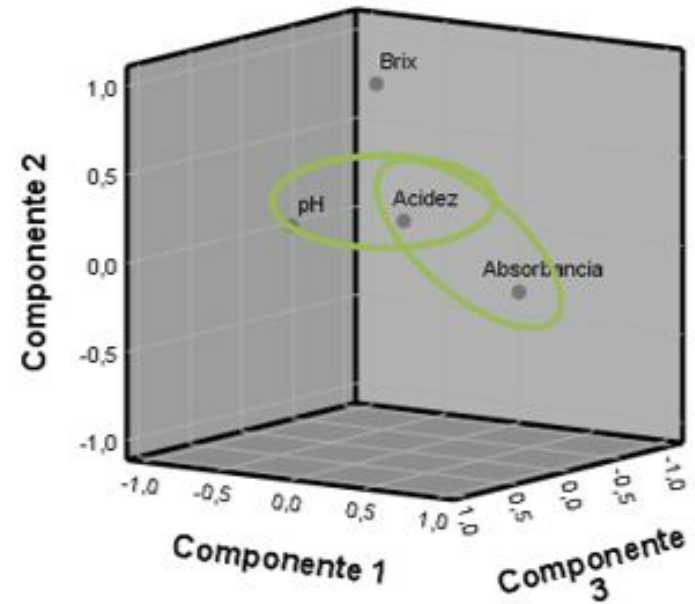
- El componente 1 aporta a la reducción con un valor de 65,40%.
- El componente 2 aporta 30,37%.
- Explica el 95,77% del total del gráfico tridimensional.



Análisis de componentes principales

Matriz de correlaciones

	pH	Acidez	Absorbancia	°Brix
pH	1,000	-,710	-,995	,048
Acidez	-,710	1,000	,685	,444
Absorbancia	-,995	,685	1,000	-,099
°Brix	,048	,444	-,099	1,000



FACTORES

Conclusiones

FACTOR A	FACTOR B	FACTOR C
Los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos (pH: 4,78, acidez: 0,16; absorbancia: 2,05 ; °brix: 7,23) en la fermentación muestran que el mejor sustrato es Fructosa-peptona.	El exceso de concentración de azúcar puede estresar a la BAL afectando los parámetros cinéticos.	El tiempo es un factor influyente en la producción de bacteriocinas, por las etapas de crecimiento de las bacterias,
Utilizar una fuente extra de carbono y nitrógeno en el medio fermentativo favorece a un mayor crecimiento bacteriano y producción de ácido láctico.	La cepa bacteriana utilizada obtuvo mejores resultados a la concentración de 5% p/v, en base al pH:4,72 , acidez: 0,17, absorbancia: 2,07 y grados brix: 9,38.	En base al pH: 3,76, acidez: 0,18, absorbancia: 3,18 y grado brix: 6,04, se concluye que el mejor tiempo para que se den condiciones óptimas es a las 72 horas.



INTERACCIÓN AXBXC



1

El mejor tratamiento fue Fructosa.peptona+7%+72 horas, ofrece mayor producción de bacteriocinas y mayor eficiencia en la fermentación. (pH:3,53, acidez: 0,30, absorbancia:3,49 y grados brix:7,53)

2

El crecimiento bacteriano para cualquier tipo de bacteria depende principalmente de la composición del medio, concentración del medio de sustrato, pH, temperatura y presencia de inhibidores.

3

La variable pH tiene una correlación inversa con la absorbancia y la acidez con la absorbancia se correlacionan directamente.



Recomendaciones

Según los parámetros cinéticos microbianos de la chicha de chontaduro se recomienda al sustrato fructosa-peptona como medio de crecimiento óptimo para las bacterias aisladas.

Para mayor producción de bacteriocinas, se puede emplear suplemento de carbono-nitrógeno hasta del 5% con respecto a la concentración

Las bacterias llegan a una etapa de muerte por lo cual se debe tener en cuenta el tiempo de fermentación para cada cepa bacteriana.

Para BAL aisladas de la chicha de chonta se puede suplementar el medio con Fructosa-peptona al 7%, por 72 horas para obtener mayor crecimiento bacteriano.

Debe haber un equilibrio de nitrógeno y carbono si se desea tener un balance entre el crecimiento bacteriano y producción de ácido láctico para BAL.





*Muchas
gracias por
su atención*



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA