



**Determinación de la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos  
aislados a partir chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de:  
*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.**

Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra

Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura

Carrera de ingeniería en biotecnología

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

Ponce Loaiza, Lourdes Karina B. Sc., M. Sc.

2 de septiembre del 2020



### Document Information

Analyzed document	Tesis-final.docx (D78216966)
Submitted	8/27/2020 5:45:00 AM
Submitted by	Karina Ponce
Submitter email	lkponce@espe.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	lkponce.espe@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Beca13-56_Yadira%20Parra.pdf">https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Beca13-56_Yadira%20Parra.pdf</a> Fetched: 7/13/2020 11:56:31 PM	3
<b>SA</b>	<b>LAURA MÉNDEZ GRANO DE ORO 2017.pdf</b> Document LAURA MÉNDEZ GRANO DE ORO 2017.pdf (D76176565)	1
<b>SA</b>	<b>TESIS CARY NARANJO.docx</b> Document TESIS CARY NARANJO.docx (D14937321)	2
<b>SA</b>	<b>TESIS FINAL SALOME TRAVEZ.docx</b> Document TESIS FINAL SALOME TRAVEZ.docx (D14901665)	5
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2096/Tesis%20doct...">https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2096/Tesis%20doct...</a> Fetched: 10/22/2019 8:42:23 AM	4
<b>SA</b>	<b>TESIS PAOLA VARGAS.docx</b> Document TESIS PAOLA VARGAS.docx (D35985774)	1
<b>W</b>	URL: <a href="https://core.ac.uk/download/pdf/267888753.pdf">https://core.ac.uk/download/pdf/267888753.pdf</a> Fetched: 7/13/2020 8:46:43 PM	3
<b>SA</b>	<b>TFM Jessica Valdivieso.pdf</b> Document TFM Jessica Valdivieso.pdf (D74377772)	1
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB53-_POZ...">https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB53-_POZ...</a> Fetched: 8/2/2020 3:32:35 AM	1



Firmado electrónicamente por:

**LOURDES  
KARINA PONCE  
LOAIZA**

Ponce Loaiza, Lourdes Karina B. Sc., M. Sc.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Determinación de la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados a partir chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.**” fue realizado por la señorita **Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 25 de Agosto del 2020



Firmado electrónicamente por:

**LOURDES  
KARINA PONCE  
LOAIZA**

**Ponce Loaiza, Lourdes Karina B. Sc., M. Sc.**

C.C. 0914304779



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1723372965, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Determinación de la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados a partir chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de Agosto del 2020

Firma

*..Alejandra Cajas Toapanta..*

**Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra**

C.C.: 1723372965



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra, con cédula de ciudadanía n°1723372965, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: Título: **"Determinación de la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados a partir chicha tradicional expandida en mercados de Quito contra bacterias de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*."** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 25 de Agosto del 2020

Firma

*... Alejandra Cajas Toapanta ...*

Cajas Toapanta, Lisseth Alejandra

C.C.: 1723372965

## **Dedicatoria**

A Dios por acompañarme, guiarme y brindarme las lecciones necesarias para ser un mejor ser humano y profesional.

A mis padres por su apoyo incondicional en esta larga travesía, por el esfuerzo moral y económico que realizaron para poder culminar con mi etapa universitaria, por su amor y comprensión.

A mi hermano por ser un ejemplo de fortaleza y dedicación. Por concederme el privilegio de ser tía de dos hermosas nenas Shayel y Dahily. Quienes con su inocencia y al ver en mí su ejemplo me inspiraron a llegar hasta el final.

A Adrian por ser mi apoyo incondicional, brindándome ánimos e impulsándome a continuar sin opción a decaer, por ser mi inspiración y guía.

A mis maestros, quienes con paciencia me compartieron de su conocimiento sin límite alguno, estimulándome a ser mejor cada día, con humildad y liderazgo.

A Kary, quien en su labor como docente llego a ser más que una amiga, un familiar al que al llegar a su oficina siempre obtuve una respuesta, una ayuda, un consejo, un aliento. Quien además de compartirme su conocimiento, es como una segunda madre.

A mis amigos y compañeros de aulas que en conjunto atravesamos diferentes escenarios y supimos apoyarnos con el fin de impulsarnos todos hasta la meta.

A mi familia, quienes confiaron ciegamente que este día llegaría y día a día me motivaron para conseguirlo.

A las personas que ya no están conmigo en la tierra pero desde el cielo, sé que estarán orgullosos.

Lisseth Alejandra

## **Agradecimientos**

A mi familia, quienes día a día estuvieron presentes en cada etapa de mi vida. Esta meta cumplida es por y para ellos.

Lisseth Alejandra

## Índice de Contenidos

<b>Carátula</b>	
<b>Certificación.....</b>	<b>3</b>
<b>Responsabilidad de Autoría .....</b>	<b>4</b>
<b>Autorización de Publicación.....</b>	<b>5</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de Contenidos .....</b>	<b>8</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>12</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>12</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>14</b>
<b>Generalidades.....</b>	<b>14</b>
Planteamiento del problema .....	14
Descripción resumida del problema .....	19
Justificación e importancia .....	20
Objetivos .....	22
<i>Objetivo general</i> .....	22
<i>Objetivos específicos</i> .....	22



<b>Capítulo 2.....</b>	<b>23</b>
<b>Marco referencial.....</b>	<b>23</b>
La Fermentación .....	23
Fermentación en alimentos .....	24
<i>Fermentación alcohólica.....</i>	<i>25</i>
<i>Condiciones físico químicas necesarias para la fermentación alcohólica .....</i>	<i>27</i>
Bebidas fermentadas .....	28
Microbiología de las bebidas fermentadas .....	30
<i>Levaduras .....</i>	<i>30</i>
<i>Bacterias ácido lácticas .....</i>	<i>32</i>
<i>Aerobios mesófilos.....</i>	<i>35</i>
<i>Mohos.....</i>	<i>35</i>
<i>Coliformes totales y fecales .....</i>	<i>35</i>
<i>Enterobacterias .....</i>	<i>36</i>
Enfermedades gastrointestinales .....	36
Indicadores microbiológicos para actividad antibacteriana .....	38
<i>Staphylococcus aureus.....</i>	<i>39</i>
<i>Escherichia coli .....</i>	<i>41</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa.....</i>	<i>42</i>
Antibióticos .....	44
Probióticos .....	45

<b>Capítulo III.....</b>	<b>52</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>52</b>
Análisis físico - químico.....	52
Aislamiento de microorganismos.....	52
Aislamiento directo de bacterias lácticas.....	52
Identificación de levaduras ácido lácticas.....	53
Identificación de bacterias lácticas.....	53
Caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) .....	53
Reactivación de cepas.....	53
Pruebas oxidasa y catalasa .....	54
Densidad Celular.....	54
Actividad antimicrobiana.....	54
Análisis estadístico.....	54
Hipótesis de investigación.....	55
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>56</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>56</b>
Evaluación físico química.....	56
Evaluación organoléptica.....	56
Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	56
Aislamiento de levaduras ácido lácticas .....	58
Caracterización en términos morfológicos.....	59

Prueba Oxidasa y Catalasa.....	59
Actividad Antimicrobiana .....	60
<b>Capítulo V .....</b>	<b>62</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>62</b>
Discusión de Propiedades Físico Químicas y Organolépticas. ....	62
Discusión Aislamiento de Microorganismos .....	65
Discusión Actividad Antimicrobiana.....	66
<b>Capítulo VI .....</b>	<b>70</b>
<b>Marco administrativo .....</b>	<b>70</b>
Factibilidad del Proyecto .....	70
<i>Recurso Humano</i> .....	70
<i>Recursos Materiales</i> .....	71
<i>Recursos Financieros</i> .....	72
<b>Conclusiones.....</b>	<b>74</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>75</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>76</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> <i>Resumen reacciones bioquímicas de E. coli, S. aureus y P. aeruginosa</i> .....	43
<b>Tabla 2.</b> <i>Condiciones de incubación y medios de cultivo selectivos</i> .....	52
<b>Tabla 3.</b> <i>Características organolépticas de muestras de chicha de maíz</i> .....	56
<b>Tabla 4.</b> <i>Talento humano</i> .....	70
<b>Tabla 5.</b> <i>Insumos, reactivos y equipos empleados en el desarrollo del proyecto de titulación</i> .....	71
<b>Tabla 6.</b> <i>Reactivos empleados en el desarrollo del proyecto de titulación</i> .....	72

### Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Características macroscópicas en Agar MRS</i> .....	57
<b>Figura 2.</b> <i>Colonias desarrolladas en Agar MRS. A. Bal 1 y B. Bal 2</i> .....	58
<b>Figura 3.</b> <i>Características Microscópicas (100X)</i> .....	59

## Resumen

Se recolectó un total de 2 muestras de chicha de cocción tradicional (1 Litro) provenientes de la Provincia de Pichincha de las Parroquias Amaguaña y Fajardo, con la finalidad de aislar bacterias y levaduras ácido lácticas (BAL) fermentadoras de ácidos orgánicos. Se aislaron 2 cepas, mediante la técnica de estriado. Se identificó 2 colonias mediante observación microscópica. Se analizó la actividad antimicrobiana frente a microorganismos indicadores de calidad *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas BAL 1 y BAL 2 presentaron un promedio de 15% de inhibición frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* según revisión bibliográfica. Las cepas aisladas presuntamente pueden producir un halo de inhibición frente a microorganismos patógenos indicadores. Por bibliografía el diámetro de inhibición fue de 2 a 26 mm frente a *Staphylococcus aureus* mientras que para *Escherichia coli* fue de 12 a 14 mm. Para *Pseudomonas aeruginosa* no existe evidencia de actividad bacteriana de cepas aisladas de alimentos fermentados, se consideró cepas ATCC que presentaron inhibición del 72.7% con un diámetro de 20 a 21 mm. La identificación bioquímica de las cepas se realizó mediante prueba de oxidasa y catalasa. Se registró valores de pH, grados de alcohol y contenido de azúcar. Los valores obtenidos para la muestra de Amaguaña (M1) fueron 0°GL, 3.40 de pH a 23.3°C y 1.050 SG a 12.2% mientras M2 presentó 10°GL, 3.55 de pH a 23.4°C y 1.017 SG a 4.2%.

### PALABRAS CLAVE

- **CHICHA**
- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**
- **IDENTIFICACIÓN**
- **ANTAGONISMO.**

### Abstract

A total of 2 samples of traditional chicha (1 liter) from the province of Pichincha were collected from the parishes of Amaguaña and Fajardo, in order to isolate lactic acid bacteria and yeasts (LAB) fermenting organic acids. Two strains were isolated, by means of the striated technique. Two colonies were identified by microscopic observation. It was analyzed the antimicrobial activity against quality indicator microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. BAL 1 and BAL 2 strains presented an average of 15% inhibition against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* according to bibliographic review. Isolated strains presumably can produce an inhibition halo against pathogenic indicator microorganisms. According to literature, the diameter of inhibition was 2 to 26 mm against *Staphylococcus aureus* while for *Escherichia coli* it was 12 to 14 mm. For *Pseudomonas aeruginosa* there is no evidence of bacterial activity of isolated strains from fermented foods, it was considered ATCC strains that presented 72.7% inhibition with a diameter of 20 to 21 mm. The biochemical identification of the strains was carried out through oxidase and catalase test. It was registered pH values, alcohol degrees and sugar content. The values obtained for Amaguaña's sample (M1) were 0°GL, 3.40 pH at 23.3°C and 1,050 SG at 12.2% while M2 presented 10°GL, 3.55 pH at 23.4°C and 1,017 SG at 4.2%.

#### KEY WORDS

- **CHICHA**
- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **IDENTIFICATION**
- **ANTAGONISM**

## Capítulo 1

### Generalidades

#### Planteamiento del problema

Los procesos de urbanización han generado un cambio demográfico en los países tercermundistas y en desarrollo (Zuo *et al.*, 2018). La urbanística promete mejorar la calidad de agua, limitar el espacio territorial, aumentar el número de cesáreas y uso de antibióticos de pretemporada, disminuir la tasa de lactancia y condicionar a más de 60 años de uso generalizado de antibióticos, en particular en los niños pequeños (Stewart & Costerton, 2001). Además incrementa la incidencia de enfermedades autoinmunes, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal EII (Zuo *et al.*, 2018). Aun cuando existe evidencia en varios países tercermundistas el impacto es más dramático en los países en vías desarrollo, donde aproximadamente 3.2 millones de niños menores de 5 años mueren anualmente (Bresee *et al.*, 2002)

Dentro de la EII consta la gastroenteritis, una de las causas más comunes en la población de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Coria José *et al.*, 2001). La sintomatología implica procesos diarreicos agudos que representan un problema de salud mundial, y aunque hay variaciones geográficas en su epidemiología, los países como los de América Latina, reportaron altos índices de morbimortalidad (Vaningelgem *et al.*, 2004).

La identificación del agente causal representa un reto para los galenos, sin embargo su aparición se asocia a virus, bacterias y parásitos (Barrett & Fhogartaigh, 2017). La Organización Mundial de la Salud OMS asocia algunas de estas muertes a patógenos transmitidos por los alimentos, la manipulación de los mismos durante la cadena de transporte y el proceso de comercialización son susceptibles de contaminación con microorganismos como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacterias como

*Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus* (Ramon-Pardo *et al.*, 2018). Alimentos específicos o grupos de alimentos son considerados como vehículo de contagio (Andino & Castillo, 2010; Flint *et al.*, 2005).

La seguridad alimentaria presenta desafíos por la globalización del suministro de alimentos y contribuye a la problemática internacional de salud pública de las males transmitidos por los comestibles (Flint *et al.*, 2005). Este tipo de microorganismos están inmersos en superficies sin desinfección, corrientes de viento y malas prácticas higiénicas (Basualdo *et al.*, 1996), además son los principales agentes etiológicos de alteraciones en el sistema digestivo (Riveros & Ochoa, 2001). Las estimaciones de la carga microbiana de este tipo de padecimientos se complican al vincularse con las provisiones alimentarias (Barrett & Fhogartaigh, 2017). Existen factores ambientales, del huésped y del agente causal que contribuyen a la aparición de esta patología (Lopez, 2018).

El uso de cultivos convencionales y métodos moleculares han identificado patógenos intestinales. *Campylobacter* es el principal agente causal encontrado en los casos graves, mientras *Escherichia coli* es el principal agente causal de los últimos 20 años y productora de toxinas (Barrett & Fhogartaigh, 2017). *E. coli* generalmente se aísla en casos esporádicos de diarrea y episodios de gastroenteritis en diversas regiones del mundo (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). Se ha identificado también *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* (Riveros & Ochoa, 2001; Von Klitzing *et al.*, 2018). Los brotes de diarrea de origen alimentario se han atribuido a *Campylobacter* y *E. coli* (Barrett & Fhogartaigh, 2017). Las bacterias representan la principal causa de diarrea de tipo viajero (Riveros & Ochoa, 2001).

La gastroenteritis es un tipo de infección pequeña no inflamatoria a nivel intestinal y del colon (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). Los síntomas de estos trastornos pueden causar molestias, que van desde inconvenientes sociales hasta angustia personal profunda (Zuo *et al.*, 2018). La sintomatología manifiesta dolor abdominal, náuseas,



vómitos y fiebre; existe diferente espectro de gravedad puede iniciar con una molestia simple y convertirse en una afectación sistémica; capaz de provocar deshidratación aguda y muerte en pocas horas (Lopez, 2018). Para aquellos con síntomas severos, los trastornos pueden ser debilitantes, dejándolos incapaces de participar de una vida plena (Baldi *et al.*, 2009). También puede presentar movimientos intestinales alterados: diarrea o estreñimiento y sangrado del tracto gastrointestinal, su presencia es sin previo aviso o está precedido por uno o más de los antes mencionados (Cervantes-García *et al.*, 2014). La estimación del grado de deshidratación requiere evaluar la apariencia de los ojos, presencia de lágrimas, humedad en la boca y en lengua, turgencia de la piel y presencia de sed (Abdul-Mumin *et al.*, 2019)

La diarrea se presenta de forma común como consecuencia de varias enfermedades gastrointestinales (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). La evaluación de procesos diarreicos en las enfermedades y afecciones digestivas permite distinguir si son agudas o crónicas (Cisternas, 2011). Se considera diarrea cuando las heces pierden coherencia es decir se vuelven blandas o líquidas y la frecuencia de evacuación aumenta a más de 3 deposiciones por día (Baldi *et al.*, 2009). Los procesos diarreicos prolongados o recurrentes se asocian a proceso de desnutrición y efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo de la población (Barrett & Fhogartaigh, 2017). La clasificación del tipo de diarrea en acuosa, grasa e inflamatoria y el tiempo de tendencia son los parámetros considerados por los galenos al momento de decidir el diagnóstico y el tratamiento óptimo basado en antibióticos (Cisternas, 2011). Las peculiaridades de las heces diarreicas: sangrientas, mucosas o acuosas ayudan a determinar con mayor certeza los pacientes que requieren de terapias antimicrobianas suplementarias (Goldfarb *et al.*, 2014).

La diarrea infecciosa en países en desarrollo es una preocupación de salud pública, los niños menores de cinco años presentan tres o cuatro episodios anuales, con mortalidad significativa (Barrett & Fhogartaigh, 2017). En países desarrollados como Estados Unidos representa la tercera causa mortal de los episodios por persona y año; el 80% se asocian al origen alimentario (Baldi *et al.*, 2009). Los casos diarreicos identificados en Reino Unido representan el 30% del total de las muertes asociadas a esta etiología (Riveros & Ochoa, 2001). Además de las elevadas pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares anualmente (Bresee *et al.*, 2002). Cerca del 30% del total de muertes anuales corresponde a infantes de 5 años, en países como África y Asia Sudoriental, es decir cerca de 125.000 niños (OMS, 2015). Los episodios de diarrea que contribuyen a la mortalidad infantil en las regiones en desarrollo y la morbilidad sustancial representa del 20 – 40% (Barrett & Fhogartaigh, 2017). En Ecuador la gastroenteritis representa la principal causa de morbilidad en hombres adultos (INEC, 2017). Dentro de las diez principales causas de morbilidad, la diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso representa la cuarta causa de un total de 21.241 egresos, 10.239 corresponden a hombres como quinto principio de morbilidad, en mujeres e infantes representa la séptima causa con 11.002 egresos para mujeres y 2.763 de infantiles (INEC, 2019).

La fisiopatología aún representa un enigma por descubrir; la eficiencia de un tratamiento a base de farmacéuticos ha desatado un debate mundial sobre el uso de antibióticos y antidiarreicos de venta libre (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). El tratamiento con ciprofloxacina, o con ejemplares de venta libre no acorta la duración de la diarrea (Riveros & Ochoa, 2001). La prescripción médica ha sido reemplazada por gran cantidad de información que reposa en sitios web, se ha estandarizado la sintomatología y de forma general se suministra un tratamiento sin evaluación médica (Riveros & Ochoa,

2001). Procesos de resistencia antibiótica se han visto como consecuencias de la automedicación (Cervantes-García *et al.*, 2014; Riveros & Ochoa, 2001). La OMS ha calificado a las bacterias gramnegativas resistentes a múltiples fármacos en humanos y animales, como una grave amenaza para la salud pública por su creciente incidencia (Heimesaat *et al.*, 2019). La resistencia antimicrobiana en patógenos gastrointestinales limita la prescripción de un tratamiento efectivo (Barrett & Fhogartaigh, 2017). El principio de acción inhibido de múltiples fármacos y el 58% de las cepas resistentes se presenta en los casos de diarrea de los viajeros (Barrett & Fhogartaigh, 2017). El plan de manejo alternativo se basa en la corrección de la deshidratación y la optimización nutricional de fluidos (Abdul-Mumin *et al.*, 2019).

La regulación biológica subyacente que estabiliza las diversas poblaciones microbianas frente al huésped, representa un tratamiento preventivo para contrarrestar la incidencia de enfermedades gastrointestinales (Kareb *et al.*, 2018). El consumo de probióticos se considera como un tipo de tratamiento alternativo de primera mano para pacientes ambulatorios u hospitalizados (Abdul-Mumin *et al.*, 2019; Durchschein *et al.*, 2016). Los microorganismos comensales protectores facilitan la adquisición de nutrientes y vitaminas; promueven el desarrollo de microorganismos benéficos además de conservar la integridad de los tejidos, y estimular múltiples aspectos de la inmunidad (Motta & Gomes, 2015). El cuerpo desarrolla respuesta inmunológica en las primeras etapas de vida, la infancia (Riveros & Ochoa, 2001). Las defensas se desarrollan en función a las trayectorias metabólicas basadas en la disponibilidad de recursos y la adaptación a condiciones microbianas locales (Riveros & Ochoa, 2001). La exposición a microbios ambientales durante los primeros años desarrollan propiedades inmunorreguladoras mediante exposición directa a ambientes que fortalecen la capacidad del sistema inmunitario para resolver la inflamación (Herrero, 2011; Houck, 2017).

A partir del siglo XIX y apresurando el siglo XX, se han presentado cambios y alteraciones dramáticas en la ecología humana (Vilnitzky, 2018). Los principales pilares de la estabilidad biológica considera el comensalismo entre la humanidad con los microorganismos endémicos y el equilibrio en la composición de la microbiota intestinal (Blaser & Falkow, 2009). Existen múltiples beneficios asociados a su consumo moderado de probióticos (Hernandez, 2010). Estudios aplicados a grupos humanos sugiere que la microbiota confiere beneficios conservados a la barrera intestinal (Blaser & Falkow, 2009). Algunos de estos organismos tienden a conservan propiedades patógenas y, a través de las prácticas médicas y los cambios en el estilo de vida, su prevalencia en las poblaciones humanas está cambiando, a menudo en un grado extremo (Pogreba-Brown *et al.*, 2020). Es necesario el suministro de la dosis adecuada en función al peso y volumen del paciente (Hernandez, 2010). La sobredosis de consumo desliga efectos adversos para la salud humana (Cisternas, 2011).

### **Descripción resumida del problema**

En esta investigación se plantea evaluar la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados de chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Proporcionará una perspectiva de la biodiversidad microbiana de una bebida tradicional de consumo frecuente y aportará una alternativa de probiótico, de fácil adquisición, consumo frecuente y bajo costo, además de no representar riesgos para la salud. Por otro lado, promover el consumo de este tipo de bebidas fermentadas que tienden a desaparecer por la influencia de la industrialización de productos comerciales.

Los microorganismos fermentadores de ácido láctico Gram positivos, han recibido recientemente atención debido a su condición, son reconocidos por ser cepas seguras y sus potenciales efectos promotores de la salud como probióticos (Mulaw *et al.*, 2019). La

Organización Mundial de la Salud OMS define a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades suficientes, confieren un beneficio para la salud del huésped (Ouwehand *et al.*, 1999).

### **Justificación e importancia**

Muchas enfermedades gastrointestinales, como la diarrea, el síndrome del intestino irritable y la enfermedad inflamatoria crónica del intestino, son causadas por el desequilibrio de la microflora intestinal (Cisternas, 2011), que es un factor importante en la translocación e infección bacteriana. El tratamiento actual del desequilibrio de la microbiota intestinal consiste en el uso de antibióticos (Ramírez José *et al.*, 2007) sin embargo, el uso indebido o excesivo de los antibióticos contribuye a la resistencia, que es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo (Ramon-Pardo *et al.*, 2018). Otra preocupación es la disminución de la eficacia de los antibióticos en el tratamiento de las infecciones humanas y animales debido a la formación de biopelículas de bacterias patógenas.

Los probióticos de bacterias ácido lácticas con propiedades beneficiosas útiles para iniciar la fermentación de los alimentos (Cisternas, 2011). Mejoran la digestión y la asimilación de los nutrientes (De Roock, 2009), modulan el sistema inmunológico (Vázquez *et al.*, 2009), eliminan las sustancias tóxicas e inhiben el crecimiento o la invasión de parásitos y bacterias patógenas para prevenir las infecciones gastrointestinales (Servin, 2004).

La amplia aplicación de este tipo de bacterias se asocia a su tolerancia a pHs ácidos. A partir de esta característica se les confiere la ventaja de supervivencia en relación de otras bacterias presentes en procesos de fermentación. Su mecanismo consiste en la producción de ácidos orgánicos capaz de aumentar la acidez (Bergey, 1994). El ácido láctico es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos

contaminantes que sean capaces de alterar la calidad y seguridad de los alimentos fermentados (Giraffa, 2014).

El mercado de los probióticos mueve anualmente en torno a 26.000 millones de euros, cifra que procede principalmente de Europa, según datos de un metaanálisis de la Universidad de Copenhague (Dinamarca) publicado en 'Genome Medicine' en el año 2016. La razón, es que en Europa donde las virtudes de estos microorganismos, que despliegan un efecto positivo para la salud, se han divulgado más.

Las bebidas fermentadas representan una fuente de bacterias ácido lácticas especialmente del género *Lactobacillus* son reconocidas por sus potenciales efectos como probióticos (Mulaw *et al.*, 2019).

Las técnicas biotecnológicas apuntan a obtener beneficios máximos, ya sea como productividad de compuestos de interés o alternativas de materia prima, que reduzcan costos y eleven rendimiento, en procesos de bioconversión, la producción de microorganismos de interés industrial, en este caso las bacterias ácido láctico (BAL) podría ser considerados probióticos biológicos.

La industria biotecnológica en el Ecuador está dando sus primeros pasos, existen dos compañías biotecnológicas, Laboratorios Ordesa Ecuador y Greentech que usen los recursos de manera eficiente y ecoamigables. El aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos, establecer su actividad antibacteriana y determinar su sensibilidad antibiótica, proyecta una manufactura nacional de inóculos bacterianos con elevados estándares de calidad que certifiquen su actividad y aplicación en la salud.

El presente proyecto presentará el análisis de biodiversidad microbiana de chicha tradicional y su efecto antibacteriano frente a cepas referenciales de calidad alimenticia.

Los productos artesanales representan una fuente de cepas bacterianas ácido lácticas autóctonas, la aplicación de estas nos brinda un elevado potencial industrial, además de representar un comienzo de cultivos iniciadores. Además de ser considerados un alternativa de tratamiento para la gastroenteritis representa la optimización de los procesos fermentativos, y así la obtención de productos de características específicas e invariables con el fin de conservar sus propiedades organolépticas (Chekhlov *et al.*, 2005).

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Determinar la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados a partir chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### ***Objetivos específicos***

Aislar e identificar microorganismos ácido lácticos procedentes de muestras de chicha tradicional, por medio de cultivo en medio diferencial Man, Rogosa y Sharpe (MRS), tinción Gram y pruebas bioquímicas.

Seleccionar cepas microbianas ácido lácticas de levaduras y bacterias de acuerdo a su morfología mediante observación microscópica.

Determinar la actividad antimicrobiana de las cepas ácido lácticas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por medio de pruebas antagónicas de difusión en disco.

## Capítulo 2

### Marco referencial

#### La Fermentación

Desde los 3000 A.C. en la Mesopotamia, India y Egipto se manejaba principios básicos sobre la fermentación; la palabra proviene del latín *fermentare* que significa *ebullir*, a causa de la producción de dióxido de carbono (Pazmiño *et al.*, 2014).

La fermentación involucra la conversión de la materia en alimentos fermentados por la actividad metabólica y el crecimiento de microorganismos deseables (Bibek & Arun, 2008). La transformación es a partir de reacciones de reducción y oxidación con productos de interés, así como la acumulación, con un balance de energía positivo, energía utilizada por los microorganismos (Montville *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista microbiológico representa la acción de la enzimas producidas en ausencia o presencia de oxígeno, que como resultado se obtiene metabolitos y biomasa (Pazmiño, 2013). Los productos son: enzimas, ácidos orgánicos, etanol, acetona, etc. (Müller, 1964).

Según Ramos en el 2012, el proceso de fermentación contempla 3 fases: elaboración del inóculo, elección del medio de cultivo y la obtención de la biomasa. La modificación de estas fases permite la optimización de la fermentación (Pazmiño *et al.*, 2014).

Para obtener sustancias deseadas diferentes se aplica modificaciones en las diferentes rutas bioquímicas de empleo de azúcares. Las principales vías son: Ciclo de Krebs, La glucólisis y la Cadena respiratoria (Pazmiño *et al.*, 2014). A su vez la concentración de oxígeno eleva el rendimiento de la sustancia de interés, al limitar el



oxígeno se obtiene etanol y al elevar las concentraciones se obtiene mayor cantidad de biomasa (Tórtora *et al.*, 2007).

La concentración de oxígeno determina un proceso fermentativo aerobio o anaerobio, es decir la presencia o ausencia de oxígeno, el principal producto de una fermentación de tipo aerobia es el dióxido de carbono mientras en el de tipo anaerobia proporciona biogás, mezcla de diversos componentes (Tórtora *et al.*, 2007). Los microorganismos presentes pueden ser de tipo estricto y facultativos, es decir que requieren de mínimas cantidades de oxígeno hasta su desarrollo (Müller, 1964).

Los diferentes productos de los procesos fermentativos diferencian los tipos de fermentación (Pazmiño, 2013). Los tipos más comunes son: la fermentación alcohólica con etanol como producto final, fermentación láctica con la obtención de ácido láctico, fermentación propiónica con producción de ácido acético y ácido propiónico, fermentación fórmica con la formación de ácido fórmico y la fermentación butírica con la obtención de ácido butírico, acetona, butanol e isopropanol (Cummings *et al.*, 2000).

### **Fermentación en alimentos**

La fermentación en alimentos ha surgido bajo la necesidad de preservar los alimentos, como un método biotecnológico (Koolman & Klaus, 2004). Puede efectuarse por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, o combinaciones entre ellos; existen grupos bacterianos que comparten el ecosistema de los fermentos (Tórtora *et al.*, 2007).

Los alimentos fermentados, generalmente se producen de forma tradicional mediante fermentaciones naturales, no se añaden inóculos, se aprovecha los microorganismos presentes en los alimentos (Ara Rojas *et al.*, 2017). La determinación de la composición microbiana de esta variedad de alimentos se basa en el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes (Díaz Ruiz & Rodarte, 2003).

Existe una variedad de alimentos originados por fermentación que se producen de forma regional y son de desconocimiento para las personas fuera del lugar del origen; este tipo de alimentos forma parte de la dieta de grupos étnicos, desde tiempos inmemorables (Ara Rojas *et al.*, 2017). Los métodos y costos de producción son de fácil acceso, no requieren de tecnología sofisticada y existe disponibilidad abierta de materia (García *et al.*, 1993).

Latinoamérica es la región que consume bebidas tradicionales fermentadas a partir de sustratos como el maíz, este tipo de bebidas pueden consumirse al inicio de la elaboración o una vez que se encuentre fermentado (Bach & Bustamante, 2013). A nivel global se contemplan nueve grupos de alimentos fermentados, basados en la materia prima ya sean cereales, vegetales, legumbres, tubérculos y raíces, productos lácteos y cárnicos, productos de pescado fermentados y bebidas alcohólicas (Steinkraus, 1997).

La chicha tradicional es una bebida alcohólica procedente de Colombia y otros países suramericanos como Ecuador, Perú y Bolivia (Andrés López-Arboleda *et al.*, 2010). Es una bebida que perdura con los años y se consume en las regiones de la Sierra, aunque por el transcurso del tiempo y la inclusión de bebidas como gaseosas y energizantes de sabores artificiales se ha perdido la costumbre producirla y elaborarla (Pazmiño, 2013). La chicha es preparada en actividades andinas, por lo que no es fácil de adquirirla en ciudades o tiendas locales (Ara Rojas *et al.*, 2017). La comercialización de estas bebidas se conserva en parroquias de las grandes ciudades.

### ***Fermentación alcohólica***

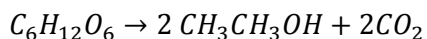
Una bebida alcohólica fermentada se obtiene a partir de mostos fermentados, sin destilación (Ara Rojas *et al.*, 2017); el mosto es el líquido de origen vegetal que contiene sustancias azucaradas susceptibles de transformarse a alcohol por fermentación (INEN,

1998). La fermentación es la conversión de un mosto azucarado, hasta un producto alcohólico (Pazmiño et al., 2014). Por acción de microorganismos en medio anaerobio (Ara Rojas *et al.*, 2017) y un complejo de enzimas zimasa (Pazmiño, 2013).

Microorganismos como las levaduras proporcionan las condiciones óptimas de fermentación, aportan los nutrientes suficientes, pH óptimo, temperatura apropiada y acidez (Bibek & Arun, 2008), de esta forma se asegura la formación de alcohol etílico (Coronel, 2011). Este proceso libera moléculas energéticas ATP (Pazmiño, 2013).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico facultativo que procesa hidratos de carbono, la concentración de etanol aumenta de tal manera que se convierte en un producto tóxico, al 12% las levaduras empiezan a morir (Pazmiño, 2013).

Según Pazmiño en el 2013 presenta la ecuación simplificada de la fermentación del azúcar de la siguiente forma:



Se obtiene la mitad de alcohol que el peso de azúcar que haya sido empleado en el proceso fermentativo.

A una temperatura de 20°C el tiempo de fermentación es de una semana y se comprueba de forma visible por una disminución de la densidad (Ara Rojas *et al.*, 2017). La oxidación del carbono genera la producción de  $CO_2$  junto con el etanol, hay una liberación de moléculas energéticas en estas reacciones, asociados al flujo de energía metabólica aprovechada por organismos fermentadores (Corrales *et al.*, 2015)

La fermentación alcohólica se presenta en tres fases, la primera es una etapa preliminar, en donde la levadura entra en contacto directo con el mosto, el objetivo de esta fase es la proliferación del número de levaduras, posterior a esta está la fase

tumultuosa, la oxidación de los azúcares, la conversión de  $CO_2$  y etanol; la fase final, la terminación del proceso fermentativo se caracteriza por la detención del desprendimiento de  $CO_2$  y la disminución de la temperatura (Glices & Veloz, 2006).

La industria ha desarrollado y tomado en consideración algunas modificaciones del proceso de fermentación con la finalidad de realizar una fermentación continua y con elevados volúmenes de etanol (Pazmiño, 2013). Este tipo de alternativas han sido implementadas por la Biotecnología al desarrollar cepas de levaduras con mayor rendimiento y mejor calidad de producción (Pazmiño et al., 2014).

Al sureste de México y en algunos países de centroamérica su consumo es de forma individual, sin embargo es común agregarle cacao o coco (Monar *et al.*, 2014). Una gran cantidad de microorganismos se desarrollan en este tipo de bebidas, así la acidificación de la masa se produce por bacterias ácido lácticas mientras los aromas y sabores son proporcionados por los mohos y levaduras (Bach & Bustamante, 2013).

### ***Condiciones físico químicas necesarias para la fermentación alcohólica***

#### **Efecto de la temperatura.**

La temperatura durante el proceso fermentativo representa una influencia compleja, el aumento o disminución entre un intervalo de 4 y 40°C altera el funcionamiento de las actividades enzimáticas, la temperatura óptima se maneja en un intervalo de 5 a 40°C para el desenvolvimiento de la fermentación alcohólica, valores superiores producen la desnaturalización proteica y la muerte celular (Hidalgo, 2018).

#### **Aireación.**

Las funciones metabólicas: síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados se realizan en presencia de oxígeno, así como la multiplicación de las levaduras (Corrales *et al.*, 2015).

**pH.**

El desarrollo de la fermentación tiene repercusiones bajo la influencia del pH, la estabilidad de este factor se refleja en la formación de gas con valor de 4 a 5.5, el desarrollo óptimo se encuentra en un intervalo de 4 a 6 con valores mínimos de 2.6 y 2.8 donde el proceso fermentativo queda inhabilitado (Hidalgo, 2018).

**Presión.**

La presión producida por el anhídrido carbónico puede influir en el metabolismo de los microorganismos, a mayor presión el proceso fermentativo disminuirá, a una presión de 5 a 6 atmosferas la actividad fermentativa será eficiente (Hidalgo, 2018).

**Bebidas fermentadas**

El consumo de este tipo de bebidas data a partir de la elaboración de cerveza al sur de Babilonia hace 4000 a.C., en Egipto se la conocía como “eli” conocida como una bebida de alto valor energético y suministro bajo ciertas modificaciones en planes de dieta ligera (Pazmiño, 2013).

La preparación de alimentos fermentados no requiere de tecnologías, puede ser preparada por cualquier persona, no requiere de utensilios especiales para su preparación, su consumo es enfocado a todas las edades, es de uso común (Pazmiño, 2013). Este tipo de alimentos inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, además de aportar nutricionalmente al consumidor, son apetecidos por sus diferentes sabores, colores, textura y olor (Paéz, 2010).

La chicha es una bebida característica del Ecuador, producto de un proceso de fermentación (Rodrigues *et al.*, 2018). Su nombre proviene del kuna chichab o náhuatl chichiatl que significan “maíz” y “agua fermentada” respectivamente, es decir es una

bebida preparada a partir del maíz tras procesos fermentativos (Villegas Ubidia & Alfredo, 2005).

Existen diversos sabores, colores y olores de chicha tradicional asociada a las diferentes provincias que conforman el Ecuador, además del tipo de maíz que se utilice, su preparación varía en función a su lugar de origen, pueden tomar diferentes nombres, en ciertos casos el nombre lo otorgan festividades autóctonas del lugar en las que son consumidas (Villegas Ubidia & Alfredo, 2005).

### ***Bebidas fermentadas por regiones del Ecuador***

Según Aguirre en el 2009 la chicha de jora es representativa de la región Sierra del Ecuador, elaborada por una variedad especial de maíz y endulzada con panela (Aguirre, 2009). La provincia de Chimborazo destaca por la variedad de chichas que ofrece al público (Pazmiño, 2013). La de mayor consumo es la chicha andina preparada a base de jugo de piña, la chicha de ciruela se elabora a base de pasas, mientras la chicha de colta, se asemeja a la chicha tradicional con la diferencia que proviene de maíz negro (Ara Rojas *et al.*, 2017).

Podemos encontrar también la chicha “huevoona”, nombre atribuido por los ingredientes utilizados en su elaboración, se utiliza: huevo, malta, alcohol etílico y azúcar (Pazmiño, 2013).

Las forma de elaborar este bebida tradicional puede variar de una región a otra (Medina, 2003). En la amazonia se utiliza productos propios de la zona como el chontaduro, ayahuasca y la yuca (Guamán, 2013). La preparación de esta bebida es de forma peculiar, las mujeres mastican la yuca para realizar el proceso fermentativo, la cocción la realizan en vasijas hechas de barro (Aguirre, 2009).

En la provincia de Bolívar se prepara la chicha de jora y la chicha de arroz (Guamán, 2013). El lugar también ofrece chichas a base de cereales y variedad de ingredientes, desde morocho, machica, quinua, afrecho de harina de trigo hasta remolacha, hongos y zanahoria amarilla (Pazmiño, 2013). La preparación se hace de forma artesanal y sin el correcto manejo de buenas prácticas de manufactura (Pastrana *et al.*, 2015).

En Pichincha el consumo de bebidas fermentadas es concurrente así como el Guarapo, el Chaguarmishque, chicha de avena y morocho (Carrera, 2014). La producción ha disminuido con el tiempo sin embargo es común encontrar en expendio en parroquias provinciales como Fajardo y Sangolquí (Guamán, 2013).

### **Microbiología de las bebidas fermentadas**

La composición microbiológica presente en bebidas fermentadas establece la calidad y acreditación de las mismas para el consumo humano (Pazmiño, 2013). La comunidad microbiana que interviene en este tipo de procesos son las cepas con capacidad de fermentar ácido láctico (Pomasqui Benavides, 2013). También podemos encontrar organismos patógenos como coliformes, hongos, anaerobacterias y organismos aerobios (Guamán, 2013). Este tipo de microorganismos vienen inmersos en las superficies de la materia prima (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). La mala higiene de las personas y errores en el lavado de los utensilios son otra fuente de posible contaminación (Escudero Bruna, 2014).

### **Levaduras**

El uso de las levaduras ha trascendido durante siglos, permite la obtención de productos fermentados como la cerveza, el vino y el pan (Guamán, 2013). Son las encargadas de metabolizar azúcares como la fructosa, glucosa y manosa; en

condiciones anaerobias o aerobias para la producción de alcohol y anhídrido carbónico (Pomasqui Benavides, 2013).

Se encuentran distribuidas en la naturaleza, suelo, superficie de las frutas, néctar de las flores, cereales e incluso en ambientes acuáticos (Pomasqui Benavides, 2013). Su proliferación la realizan en materia orgánica muerta; se desarrollan en otros seres por ser parásitas, facultativas u obligadas (Pomasqui Benavides, 2013). Su identificación y caracterización se basa en términos de morfología, pruebas de fermentación de azúcares y pruebas moleculares (Pazmiño, 2013).

Las levaduras son microorganismos eucariotas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 5 a 30  $\mu\text{m}$  de largo, el diámetro fluctúa entre 3 y 8  $\mu\text{m}$  (Pomasqui Benavides, 2013). El desarrollo de las mismas es evidente posterior a los cinco días de fermentación, con temperatura de 25°C (Müller, 1964). El rango de pH óptimo para su desarrollo es de 4,5 a 8 (Pazmiño, 2013). Se observan colonias brillantes o mates, de contorno regular y superficie convexa a lo largo de la superficie del medio (Vandevenne & Ribes, 2002).

Según Pomasqui Benavides en el 2013 menciona que el 96% de la fermentación de etanol se lleva a cabo por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo la industria ha utilizado diferentes especies dependiendo del tipo de bebida como por ejemplo *Saccharomyces allipsoideus* en el caso del vino (Medina, 2003). La fuente de energía que utilizan las levaduras son los carbohidratos, de esta manera originan diferentes metabolitos así como cantidades representativas de etanol además de ácidos orgánicos que otorgan la variabilidad de características organolépticas de los diferentes fermentos (Pazmiño, 2013).



Una amplia diversidad de levaduras es posible identificar al inicio del cultivo, mientras en el transcurso de la fermentación las levaduras presentan elevada capacidad fermentativa y desarrollan resistencia al alcohol (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016).

### ***Bacterias ácido lácticas***

Las bacterias ácido lácticas BAL son de interés industrial (Bergey, 1994). Existen diferentes tipologías en función a su morfología, fisiología y metabólica (Pomasqui Benavides, 2013). Su capacidad biosintética es limitada, requieren ambientes nutricionalmente ricos en carbono y nitrógeno (Motta & Gomes, 2015). Las bacterias son de morfología cocos no esporulados y bacilos, Gram positivos, catalasa negativo, inmóviles y no esporulados, son anaerobios facultativos, presentes en los procesos fermentativos y ácidos tolerantes (Sansonetti *et al.*, 2009).

Las BAL son tolerantes a pHs ácidos (Bergey, 1994). Generalmente se desarrollan en un intervalo de pH de 3.2 a 9.6, sin embargo tiene afinidad por un pH de 4 a 4.5 (Pescuma *et al.*, 2012; Pomasqui Benavides, 2013). lo que les confiere ventaja al competir con otras bacterias de una fermentación natural; el ácido láctico, principal producto de su metabolismo junto a otros metabolitos, son inhibidores eficientes de otros microorganismos autóctonos que están comprometen la calidad y seguridad de alimentos fermentados (Giraffa, 2014).

La presencia de este tipo de bacterias está asociada a materia prima sin cocción como carnes, cereales y vegetales (Medina, 2003). Así también en el tracto intestinal, respiratorio y genital de los mamíferos (Giraffa, 2014). Prakash *et al.* en el 2015 menciona que este grupo bacteriano está conformado por cerca de 380 especies, 40 géneros y 6 familias (Pomasqui Benavides, 2013). Los géneros de las BAL comprende *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, entre otros (García *et al.*, 1993). Este grupo

de bacterias comprende heterogeneidad morfológica, presentan formas de varilla o cóctel, en células solas o en parejas, tétradas y corto largo de cadenas (Giraffa, 2014).

La bioquímica de las bacterias ácido lácticas BAL indica que son las encargadas de la conversión de los diferentes hidratos de carbono hasta ácido láctico, CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos en ausencia de oxígeno (Bibek & Arun, 2008). Estas bacterias son descritas como microaerófilas, es decir requieren de una mínima cantidad de oxígeno para un crecimiento eficiente (Giraffa, 2014).

La presencia de BAL en los alimentos puede modificar las propiedades sensoriales del producto final (Ara Rojas et al., 2017). Estas bacterias no representan efectos adversos, es decir no son tóxicos ni nocivos para la salud humana (Rodrigues et al., 2018). Su consumo se facilita por el sabor agradable de sus productos metabólicos (Ingraham & Ingraham, 1998).

Las BAL son utilizadas en diversas áreas industriales, como cultivo iniciador (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016). La industria láctea la utiliza como suplementos dietéticos y agentes de bioconversión (Giraffa, 2014).. La variedad del género *Lactobacillus* es reconocido por su potencial efecto como probióticos (Motta & Gomes, 2015). La versatilidad metabólica de estas bacterias se asocia a la variedad de hábitats; son de amplio consumo humano además de ser reconocidos como seguros (GRAS) (Klaenhammer et al., 2005).

Las BAL en presencia de carbohidratos crecen frecuentemente asociadas a levaduras en bajos niveles (Pomasqui Benavides, 2013). Los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, entre otros, pueden proliferar y causar fermentaciones alcohólicas espontáneas (Steinkraus, 1997). Constituyen alternativas

más económicas de cultivos iniciadores, como es el caso de las fermentaciones espontáneas de vino y de cerveza (Medina, 2003).

Las BAL pueden agruparse en cultivos primarios y secundarios o complementarios (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016). Al añadirse al inicio del proceso fermentativo desenvuelven un rol importante, contribuyen a la producción de ácido láctico (Pazmiño *et al.*, 2014). El cultivo primario generalmente está conformado por *Lactococcus* ssp. y *Leuconostoc* spp. entre los de tipo mesófilos, y a *Strep. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, y *Lb. helveticus* entre termófilos (Giraffa, 2014). Los cultivos secundarios participan indirectamente en la producción de ácido, pero su papel fundamental es la definición de las características organolépticas de los alimentos (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016). Las bacterias ácido lácticas de este tipo de alimentos fermentados son *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococos* y *Pediococos* (Beresford & Williams, 2004).

Este tipo de bacterias pueden categorizarse según su tipología de fermentación en tres grupos: homofermentativa, heterofermentativa y heterofermentativa obligada (Giraffa, 2014). La producción de ácido láctico se origina en el primer grupo, mientras en el segundo producen fermentación de hexosas con bajas cantidades de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> (Pomasqui Benavides, 2013). Al ser de tipo obligada fermenta hexosas con producción de ácido láctico, acético, fórmico y CO<sub>2</sub> (Klaenhammer *et al.*, 2005).

La presencia de bacterias ácido lácticas en bebidas fermentadas como la chicha de maíz, permite la fermentación de los carbohidratos produciendo ácidos orgánicos como el ácido láctico y otros metabolitos que contribuyen a la biopreservación, características organolépticas y potencial nutritivo de la chicha (Pomasqui Benavides, 2013).

### ***Aerobios mesófilos***

Los microorganismos aerobios mesófilos crecen en temperaturas entre los 20 a 45°C (Bravo, 2004). Su presencia se asocia a condiciones de higiene de la materia prima y la correcta manipulación en el transcurso de la elaboración. Este grupo de bacterias incluye bacterias lipolíticas, proteolíticas, sacarolíticas y patógenas (Pascual & Calderón, 2000).(Riveros & Ochoa, 2001)

### ***Mohos***

Microorganismos filamentosos mesófilos de importancia por su capacidad de alterar los alimentos una vez que colonizan el sustrato; no se evidencia por simple observación; pero son capaces de originar toxinas de origen micótico, sustancias tóxicas para la salud del consumidor (Vandevenne & Ribes, 2002).

### ***Coliformes totales y fecales***

El origen no necesariamente es intestinal pero las podemos encontrar entre los residuos fecales humanos y animales (Riveros & Ochoa, 2001). Su presencia es por diferentes fuentes, la de mayor relevancia corresponde a la calidad del agua (Pazmiño, 2013). Se reportan en UFC (Unidades formadoras de colonias). Son aerobias o anaerobias facultativas; no forman esporas; Gram negativas; oxidasa negativa (Ortega *et al.*, 2008).

Los microorganismos de mayor relevancia es *Klebsiella*, *Enterobacter*, entre otros (Ortega *et al.*, 2008). Las coliformes fecales forman parte de la microbiota intestinal (Pazmiño, 2013). Se desarrollan a 35° C (Tórtora *et al.*, 2007). Producen aldehídos a partir de la fermentación de la lactosa con la producción de gas y ácido posterior a 1 y 2 días de incubación (Wang *et al.*, 2016).

*E. coli* son parásitos quimioheterótrofos presentes en la microbiota del hombre y de los animales (Rodrigues *et al.*, 2018). Por sus condiciones se acoplan a los alimentos (Rivera, 2014). Su presencia asegura el correcto funcionamiento en el tracto digestivo, sin embargo por alteraciones genéticas son capaces de generar infecciones gastrointestinales (Pascual & Calderón, 2000).

### ***Enterobacterias***

Bacterias de distribución mundial, se encuentran en el suelo, agua, vegetales y microbiota intestinal de los seres vivos (Pazmiño, 2013). Esta familia está conformada por miembros como: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersiniapestis*, *Echerichia coli*, *Klebsiellapneumoniae*, *Proteusmirabilis*, entre otros (Barrett & Fhogartaigh, 2017). Su clasificación se basa en la presencia y ausencia de diferentes enzimas envueltas en el metabolismo, se utiliza técnicas microbiológicas para su identificación (Bou *et al.*, 2011).

### **Enfermedades gastrointestinales**

Las enfermedades gastrointestinales se relacionan con modificaciones en la carga microbiana intestinal (Montoro, 2019). Las infecciones de este tipo son causa representativa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Barros *et al.*, 2019)

La estadística del INEC del 2019 define morbilidad como:

Enfermedades que se atienden, a nivel médico u hospitalario. Las orientaciones y definiciones formalmente aprobadas se han establecido más que todo para uso en los episodios de atención de la salud (Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud CIE-10). (p. 7)

La conexión con el medio exterior es el tracto gastrointestinal, funciona en forma de barrera intestinal como sistema multicapa conformada por dos piezas principales: una

barrera física y una barrera funcional (Herrero, 2011). La barrera funcional permite la diferenciación entre patógenos y microbiota comensal. Una red de células inmunes conforma la barrera intestinal interna, el deterioro de la misma permite el paso del contenido luminal en los tejidos subyacentes y por lo tanto al flujo sanguíneo, una especie de fuga desde el intestino, activando la respuesta inmune e inflamación (Bowen *et al.*, 2015). Alteraciones en la permeabilidad de esta barrera es el fundamento de la patogénesis de una amplia gama de enfermedades gastrointestinales (Hidalgo *et al.*, 2017).

Según la OMS en el 2015 presenta un informe de la “Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria” en el cual se estima que casi 1 de cada 10 personas enferman tras consumir alimentos contaminados por 31 agentes como bacterias, virus, parásitos y toxinas. Las enfermedades gastrointestinales presentan dos epidemiologías, brotes de gastroenteritis en la familia y comunidad, niños en edad escolar, el contacto familiar y los adultos (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). Las infecciones varían en función de la población del paciente, la localización geográfica y la localización en el sistema sanitario (Montoro, 2019).

Este tipo de enfermedades se evidencian a las 24 y 48 horas posteriores a la exposición con el ente patógeno (Durchschein *et al.*, 2016). La segunda etiología se presenta de forma esporádica y ocurre predominantemente en niños y jóvenes, esta forma típicamente viene acompañada de diarrea severa y vomito (Riveros & Ochoa, 2001). En los niños se presenta de forma severa, requiriendo de hospitalización (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). La posibilidad de infección e insensibilidad están influenciados por un elevado número de factores de riesgo; tales como: inmunodeficiencia adquirida o congénita, edad menor de tres meses, y daño en el retículo endotelial (Zuo *et*

*al.*, 2018). Los factores bacterianos también favorecen la severidad de la infección (Riveros & Ochoa, 2001)(Coria José *et al.*, 2001).

Los síntomas implican ausencia o presencia de fiebre dependiendo de que exista infección, además de náuseas y vómitos, vómitos en el caso de ser viral (Montoro, 2019). El síntoma principal es la diarrea. La OMS define a la diarrea como la expulsión de 3 o más heces blandas o líquidas al día, estableciendo diarrea aguda con duración de menos 7 días, prolongada en el caso de 7 a 13 días y crónica cuando perdura más de 30 días (Montoro, 2019).

El diagnóstico de este tipo de afecciones requiere del análisis de la etiología de la enfermedad del paciente así como de la edad y el estado inmunitario (Montoro, 2019). La identificación de microorganismos genera resultados positivos y falsos positivos en el caso de existir ausencia de síndrome clínico (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2018). El tratamiento consiste en dos alternativas: la primera el suministro de antimicrobianos de tipo  $\beta$ -lactámicos en el caso de *E. coli* y la segunda en circunstancias epidemiológicas en el contexto de brotes (Montoro, 2019).

### **Indicadores microbiológicos para actividad antibacteriana**

Las deficiencias sanitarias en la manipulación, proceso de elaboración y de expendio generan la contaminación de los alimentos (Ortega *et al.*, 2008). Los microorganismos indicadores son empleados para definir la calidad e inocuidad de un alimento; deben cumplir ciertos parámetros para ser un indicador fiable, estar presentes en todos los alimentos a analizar, detectables y diferenciables de otros (Jay, 1993). Su crecimiento no debe ser altero por la carga microbiana del alimento (Castro, 2017).

El antibiograma es una prueba microbiológica que permite determinar la susceptibilidad de una bacteria a un grupo de antibacterianos (Toure *et al.*, 2003). Según

estudios realizados los agentes antibacterianos describen 3 efectos sobre los cultivos bacterianos: efecto bacteriostático, efecto bactericida y efecto bacteriolítico (Castro, 2017). El de tipo bacteriostático inhibe el crecimiento bacteriano, pero no mueren las células bacterianas, por inhibición de la síntesis de proteínas (Basualdo *et al.*, 1996). El de tipo bactericida elimina bacterias pero no genera lisis celular y el bacteriolítico existe muerte de bacterias además de lisis celular (Liébana, 2002).

El desarrollo de antibacterianos busca inhibir el crecimiento de bacterias presentes en ecosistemas complejos donde coexisten con bacterias benéficas protectoras, es importante que la aplicación de los mismos no generen daños en las bacterias beneficiosas (Castro, 2017; Palomer R., 2006).

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utiliza cepas de bacterias Gram negativas y Gram positivas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* procedentes de cepas de referencia ATCC (Curtis & Cummins, 2007).

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, en forma de cocos, con un tamaño de 0.5 a 1.5  $\mu$ ; están dispuestos en forma de racimos o grupos de uvas; no presentan movilidad; no esporulan y algunas cepas pueden estar encapsuladas; se desarrollan en temperaturas de 37°C; pH de 7.4; son aerobias y anaerobias facultativas (Kannan, 2016; Vasanthakumari, 2007). El 30% de los adultos sanos presenta *S.aureus* (Cervantes-García *et al.*, 2014).

Normalmente se encuentra en la flora normal de la piel y la mucosa nasal (Kannan, 2016). Su transmisión es por contacto directo con las manos posterior a estornudos, ingesta de alimentos contaminados y por contaminación endógena (Camarena &



Sánchez, 2017; Vasanthakumari, 2007). Los portadores son asintomáticos (Kannan, 2016).

La bacteria puede colonizar el huésped humano y causar enfermedades graves (Liu, 2009). Reside e infecta una amplia gama de tejidos del huésped, desde superficies hasta tejidos más profundos como el tracto gastrointestinal, el corazón y los huesos (Feng *et al.*, 2008). Debido a su estilo de vida multifacético, *S. aureus* utiliza redes reguladoras complejas para detectar señales que le permiten adaptarse a diferentes entornos y modular la virulencia (Vasanthakumari, 2007).

El tratamiento suministra penicilina como antibiótico de mayor eficiencia (Vasanthakumari, 2007), sin embargo el desarrollo de toxinas como mecanismo de resistencia bacteriana al medicamento ha sugerido el suministro de meticilina y cloxacilina eficientes contra otras cepas de *Staphylococcus* (Kannan, 2016). Las cepas de mayor interés han sido aisladas de infecciones que han requerido de hospitalización (Liu, 2009).

La cepa de *Staphylococcus aureus* ha conmocionado tanto la comunidad como en el entorno sanitario (Kannan, 2016). Es el resultado de una alta carga socioeconómica tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (Balasubramanian *et al.*, 2017). Existe una necesidad crítica de nuevas estrategias de tratamiento (Kannan, 2016). Las cepas de mayor interés son las que presentan resistencia a la meticilina adquiridas en la comunidad capaces de desarrollar diferentes patologías (Vasanthakumari, 2007), especialmente a nivel cutáneo y de tejidos blandos (Kannan, 2016).

La evolución natural de las infecciones por *S. aureus* se resume: en neonatos, la mayoría de los niños y los adultos serán colonizados en forma intermitente por *S. aureus*

(Kannan, 2016). Albergarán el microorganismo en forma preferente en la nasofaringe, ocasionalmente en la piel y raramente en mucosas (Cervantes-García *et al.*, 2014).

### ***Escherichia coli***

*E. coli* es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilos cortos; tiene un tamaño de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0.4 a 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho; presentan movilidad y no esporulan; son aerobios y anaerobios facultativos; se desarrollan en un rango de temperatura de 15 a 40 °C; temperatura óptima de 37 °C (Bibek & Arun, 2008; Vasanthakumari, 2007). Su presencia es predominante en la microflora intestinal normal de los humanos y otros mamíferos (Vasanthakumari, 2007). Perdura en suelo y agua por varios meses (Pogreba-Brown *et al.*, 2020). Se transmiten a los humanos a través de alimentos y agua, y la transmisión también puede ocurrir de animales y de persona a persona (Kannan, 2016).

*Escherichia coli* contiene muchos patotipos que causan una variedad de enfermedades (Kannan, 2016). Causa diversas enfermedades intestinales por medio de factores de virulencia especializados (FV) (Riveros & Ochoa, 2001). El antígeno somático es una endotoxina que evita la fagocitosis de la bacteria al igual que el antígeno K, las fimbrias permiten la adherencia a la célula huésped en enfermedades diarreicas y del tracto urinario (Barrett & Fhogartaigh, 2017; Curtis & Cummins, 2007; Kannan, 2016). Las exotoxinas están presentes en patogénesis y procesos diarreicos (Kannan, 2016).

La bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal. Se considera patógena cuando causa infecciones en el humano como sintomatología y diarrea (Manning, 2010). Sobrevive por comensalismo en situaciones específicas (Curtis & Cummins, 2007).

El tratamiento implica el uso de antimicrobianos como fosfomicina, nitrofurantoina y ampicilina (Jochmans *et al.*, 2017). En la actualidad no hay tratamientos efectivos que

mitiguen la infección, únicamente alivian los síntomas y limitan posibles complicaciones (Kannan, 2016). Las recomendaciones consisten en evitar tomar medicamentos antidiarreicos, realizar reposo e hidratación (Barrett & Fhogartaigh, 2017). La diarrea además de eliminar toxinas del cuerpo, genera en el desequilibrio electrolítico por lo que es necesario el consumo de probióticos que reestablezcan las condiciones (Klaenhammer et al., 2005).

### ***Pseudomonas aeruginosa.***

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilos rectos o ligeramente curvos; aerobios estrictos; tienen movilidad por la presencia de uno o dos flagelos polares; su temperatura óptima es de 42 °C (Koneman & Allen, 2006). Su tamaño aproximado es de 0.5 x 2.5 µm (Samadpour, 2001). La presencia de esta bacteria genera un olor característico similar al frutal de uvas o tortillas de maíz (Alhazmi, 2015; Koneman & Allen, 2006). Está presente en ambientes de suelo, agua de consumo y agua superficial (Samadpour, 2001). Cambios fenotípicos permiten su adaptación de ambientes mucoide a no mucoide, por secreción de exopolisacáridos (Heimesaat et al., 2019).

Es un patógeno oportunista capaz de infectar a los humanos con defensas naturales comprometidas y causar enfermedad pulmonar severa (Gellatly & Hancock, 2013). El 95% de casos hospitalarios presenta *P. aeruginosa* (Koneman & Allen, 2006). Este tipo de patógenos está asociados con las infecciones nosocomiales (Alhazmi, 2015). Tiene un vasto arsenal de factores de patogenicidad que se utilizan para interferir con las defensas del huésped (Gellatly & Hancock, 2013). La patogénesis en *P. aeruginosa* facilita la adhesión, modula o interrumpe las vías de la célula huésped y apunta a la matriz extracelular.

*P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a una gran cantidad de antibióticos (Samadpour, 2001). Para tratamientos a base de carboxipenicilina, ureidopenicilina, cefalosporinas, carbapenémicos y aminoglucósidos el espectro de eficiencia es deficiente (Koneman & Allen, 2006). La mayoría de cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a la ampicilina, cefuroxina y cefotaxima (Monar *et al.*, 2014). Esta bacteria es capaz de colonizar desinfectantes, como el amonio cuaternario, acumulaciones de agua y elementos del ambiente (Samadpour, 2001).

La potente respuesta inflamatoria durante el proceso infeccioso genera el mayor número de muertes en pacientes inmunocomprometidos por consumo de drogas o terapias (Alhazmi, 2015; Samadpour, 2001). El agua es el principal agente de contaminación en los ambientes hospitalarios (Samadpour, 2001). El tratamiento de infecciones persistentes se ve obstaculizado por la resistencia adaptativa, debido al estado de crecimiento de la bacteria en el paciente (Heimesaat *et al.*, 2019)

Se contempla el uso de probióticos como una alternativa para contrarrestar la resistencia de enteropatógenas de forma autónoma desde el microorganismo potencializando la flora microbiana (Becerra & Villegas, 2007).

**Tabla 1.**

*Resumen reacciones bioquímicas de E. coli, S. aureus y P. aeruginosa*

<b>Prueba</b>	<b>S. aureus</b>	<b>E. coli</b>	<b>P. aeruginosa</b>
<b>Catalasa</b>	+	---	---
<b>Oxidasa</b>	-	-	+
<b>Indol</b>	-	+	-
<b>Hidrolisis de urea</b>	+	-	+
<b>Lipolítico</b>	+	---	---

*Nota.* Tomado de Essentials of Microbiology for Nurses

## Antibióticos

Los antibióticos o medicamentos antimicrobianos son moléculas biológicas activas contra organismos patógenos (Bibek & Arun, 2008). El origen de estas moléculas puede ser de tipo natural, derivados parcialmente sintéticos y componentes químicos sintetizados (Gualerzi *et al.*, 2014). El mecanismo de acción busca inhibir la síntesis de proteínas, la replicación de DNA y la lisis de la pared celular (Camarena & Sánchez, 2017). El tratamiento más exitoso de terapia química aplicada en el siglo pasado son los antibióticos (Gualerzi *et al.*, 2014).

La terapia química antimicrobiana considera la eficiencia del agente antimicrobiano, estableciendo tres categorías: efectivo, posiblemente efectivo y no efectivo (Farthing & Ballinger, 2001). El suministro de antibióticos depende del tipo de infección y eventos diarreicos. Los antibióticos disminuyen la duración de la diarrea (Montoro, 2019). La terapia estandarizada provee tetraciclina durante tres días, doxiciclina, norfloxacin y ciprofloxacina como alternativas efectivas (Farthing & Ballinger, 2001).

La bacteria más frecuente que se busca eliminar es *E. coli* con un amplio espectro de antibióticos eficientes, aunque la creciente resistencia a trimetoprim – sulfamethoxazol y ampicilina hace que estos terapéuticos sean menos adecuados (Basualdo *et al.*, 1996). En la actualidad se prescribe quinolona con dosis estandarizada de 3 a 5 días, reduce la duración y severidad de enfermedad al menos en un 50% (Farthing & Ballinger, 2001). La dosificación única individual es necesaria para limitar procesos de resistencia microbiana (Farthing & Ballinger, 2001). La distribución de los antibióticos es importante para limitar la resistencia o consumo excesivo para sí reducir la selección de bacterias resistentes (Riveros & Ochoa, 2001).

El uso de antibióticos es indeseable ante enfermedades autolimitadas de tipo leve o moderada (Farthing & Ballinger, 2001). La preocupación de la resistencia microbiana a los antibióticos aumenta (Gualerzi et al., 2014; Riveros & Ochoa, 2001). El uso indiscriminado y sin prescripción médica ha desencadenado una serie de reacciones adversas en la salud humana, problemática de interés mundial, la disponibilidad de antibióticos para estos padecimientos será nula. El uso de probióticos es considerada una alternativa de tratamiento para el fortalecimiento de la microbiota endógena.

### **Probióticos**

La OMS define probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”. La mayor parte de probióticos pertenecen a las bacterias productoras de ácido láctico BAL (Hernandez, 2010). Microorganismos benéficos a partir de productos fermentados (Hernández, 2003). Las bacterias lácticas representan las cepas fermentadoras más eficientes (J. M. Rodríguez, 2006). La función de los probióticos se agrupan en tres categorías: metabólicas, tróficas y protectoras (Ramos et al., 2013). Las bacterias más utilizadas pertenecen a grupos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, además de levaduras como *Saccharomyces boulardii* (Kareb et al., 2018).

Es difícil precisar las características ambicionadas por los probióticos debido a la incertidumbre de los constituyentes de la microbiota intestinal que contribuyen al equilibrio microbiano del hospedador (J. M. Rodríguez, 2006). Sin embargo se busca la ausencia de toxicidad o patogenicidad, supervivencia a lo largo del sistema gastrointestinal, colonización de mucosas, producción de sustancias antimicrobianas, capacidad industrial y el efecto clínico demostrado (Hernandez, 2010; Monar et al., 2014; J. M. Rodríguez, 2006). Los requisitos indispensables para este tipo de cepas son: conservar su viabilidad en condiciones asociadas a la formulación de alimentos, tolerancia a extrema acidez en

su paso por el estómago y elevada velocidad de colonización en relación a otros microorganismos presentes (Hernández, 2003).

Este tipo de microorganismos predomina en los primeros meses de vida y contribuye a la maduración inmunológica y fisiológica del sistema gastrointestinal (J. M. Rodríguez, 2006). Forman parte de la dieta del ser humano por el consumo de productos fermentados saludables (J. M. Rodríguez, 2006). El expendio de este tipo de productos se ha generado en farmacias y supermercados (Ramos *et al.*, 2013). La industria alimenticia y farmacéutica dispone en presentaciones de polvo que al momento de la ingesta se reconstituye en agua (Hernández, 2003; Ramos *et al.*, 2013). La dosis contiene un número de células viables óptimas para producir el efecto favorable sobre la salud del consumidor (Ramos *et al.*, 2013). Los probióticos generalmente se inoculan a concentraciones superiores de  $10^7$  UFC/ml (Hernández, 2003).

Los beneficios del consumo de probióticos se ven reflejados en procesos de intolerancia a la lactosa, prevención de procesos diarreicos asociados a bacterias patógenas, cáncer y respuesta inmunológica (Hernandez, 2010). La intolerancia a la lactosa limita el consumo de productos lácticos y a su vez genera deficiencia en determinados nutrientes como el calcio (J. Sánchez *et al.*, 2004). El uso de probióticos en presencia de diarrea busca reestablecer la microbiota normal posterior a terapia con antibióticos (Hidalgo *et al.*, 2017). En procesos cancerígenos el consumo de estos microorganismos limita la aparición mediante la reducción de niveles de sustancias cancerígenas (Dalla Pria & Bower, 2018). El sistema inmunológico a partir de la respuesta natural killer y producción de anticuerpos previene la aparición de alergias (Houck, 2017). La prescripción de este tipo de productos también se considera en el tratamiento preventivo de enterocolitis necrosante y la sepsis en bebés prematuros, además en procesos de cólico infantil, padecimiento periodontal y colitis ulcerosa (NIH, 2019).

Su mecanismos de acción busca inhibir la colonización de patógenos mediante el efecto barrera, limita la propagación excesiva de microorganismos oportunistas (Hernández, 2003; J. M. Rodríguez, 2006). Los microorganismos compiten por sitios de unión a superficies epiteliales y nutrientes, además de la producción de inhibidores microbianos como ácido orgánicos y peróxido de hidrógeno (J. M. Rodríguez, 2006).

A escala industrial estas cepas deben conservar su viabilidad durante el proceso de almacenamiento ya sea por refrigeración o congelación (Ramos *et al.*, 2013). Caso contrario el efecto benéfico se ve inhabilitado por la muerte o lesión de los microorganismos. La producción en masa se realiza en función a su metabolismos y condiciones de crecimiento óptimas (Ramos *et al.*, 2013). Se considera las propiedades morfológicas y bioquímicas específicas de cada cepa para determinar el perfil fisiológico (Hernández, 2003).

### **Identificación de bacterias**

La identificación de bacterias permite el aislamiento de microorganismos, además de proporcionar información sobre la sensibilidad a antimicrobianos y desarrollar marcadores epidemiológicos (Olmos *et al.*, 2010). El análisis contempla características morfológicas a nivel macroscópico y microscópico (Murray *et al.*, 2007). La observación macroscópica del cultivo de las colonias identifica particularidades como: color, olor, tamaño y las propiedades de cada medio (Murray *et al.*, 2007). A nivel microscópico la mayoría de algoritmos de identificación definen de forma preliminar la capacidad retentiva en tinción Gram y la forma de la célula (Tórtora *et al.*, 2007). El análisis de la morfología de la colonia se utiliza como caracterización provisional y de selección de técnicas de mayor especificidad (Murray *et al.*, 2007).



El uso de pruebas bioquímicas y metabólicas permite la determinación de una especie de microorganismos de forma confiable (Olmos *et al.*, 2010). Para definir si un microorganismo pertenece o no a un género en común se utiliza el biotipado; en el caso de la presencia de antígenos en bacterias, el análisis de los anticuerpos se realiza mediante serotipado (Murray *et al.*, 2007; Tórtora *et al.*, 2007). Las pruebas de serotipado se aplican cuando las bacterias son inertes frente al uso de pruebas bioquímicas (Tórtora *et al.*, 2007). El proceso de identificación requiere de la experiencia del microbiólogo al momento de elegir una prueba o conjunto de pruebas aplicables de forma secuencial (Olmos *et al.*, 2010).

La identificación de bacterias tradicional se realiza en tres niveles de procesamiento:

•**Primer nivel:** Se realiza un análisis a nivel macro y microscópico (Murray *et al.*, 2007). A nivel microscópico se dispone de estrategias como tinción Gram u otras alternativas, crecimiento en diferentes condiciones de incubación, crecimiento en medios de cultivo y pruebas de crecimiento como oxidasa y catalasa (Olmos *et al.*, 2010). El primer paso busca situar a las bacterias dentro de los grupos principales.

•**Segundo nivel:** Busca definir la probable identidad de la cepa apoyado de pruebas como: Oxidación-fermentación, fermentación de azúcares, producción de esporas, tipo de crecimiento y movilidad (Olmos *et al.*, 2010). El segundo paso busca especificar el género al que pertenece el microorganismo, basado en las características y experiencia del investigador (Tórtora *et al.*, 2007).

•**Tercer nivel:** Busca definir la especie del aislado a partir de la aplicación de pruebas más específicas de tipo comercial (Olmos *et al.*, 2010). Los resultados

son comparados con pruebas estandarizadas (Murray *et al.*, 2007). Errores en la identificación son consecuencia del primer y segundo paso.

El aislamiento de bacterias se realiza a partir de cultivos primarios de diferentes muestras de análisis (Montville *et al.*, 2003). A partir del subcultivo o siembra por agotamiento se obtiene colonias puras (Bowen *et al.*, 2015). La aplicación de pruebas de identificación se realizan posterior al aislamiento de microorganismos (Olmos *et al.*, 2010). Es importante la selección del medio de cultivo en función a los requerimientos del microorganismo.

La aplicación de pruebas bioquímicas se realiza en cultivos puros obtenidos a partir de cultivos primarios. El medio de cultivo permite la multiplicación de los microorganismos tras un proceso de incubación y transcurrido no menos de 24 horas se observara su crecimiento (Olmos *et al.*, 2010). La selección del medio de cultivo debe considerar las requerimientos nutricionales de la bacteria (Müller, 1964).

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo según su capacidad de crecimiento se definen en básicos, enriquecidos, selectivos y diferenciales (Olmos *et al.*, 2010). Los medios básicos permiten el crecimiento de la mayoría de microorganismos, generalmente se utilizan en la siembra primaria (Tórtora *et al.*, 2007). Los medios de mayor uso para el aislamiento son Agar Nutriente AN, Potato Dextrose Agar PDA y Agar Sabouraud (Montville *et al.*, 2003). Los medios enriquecidos son utilizados para la recuperación de bacterias con requerimientos nutricionales exigentes (Olmos *et al.*, 2010). Para el aislamiento a partir de un consorcio de microorganismos se utiliza los medios selectivos (Tórtora *et al.*, 2007). La diferenciación entre los diferentes grupos bacterianos requiere de medios diferenciales (Hernández, 2003). La detección de sustancias cromogénicas como enzimas presentes

en los microorganismos se realiza a partir de medios cromogénicos (Basualdo *et al.*, 1996).

El aislamiento de BAL se lo realiza a partir de cultivos primarios de productos fermentados (Bergey, 1994). El medio de cultivo apropiado fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe MRS que permite el aislamiento de lactobacilos y bacterias ácido lácticas (Benaissa *et al.*, 2017). Los requerimientos nutricionales para este tipo de bacterias son: aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Olmos *et al.*, 2010). La inoculación se la realiza de forma directa a partir de la muestra de análisis y con posterior proceso de estriado (Tórtora *et al.*, 2007). La temperatura óptima de incubación es de 35 a 37 °C por 24 horas (Bergey, 1994).

### ***Prueba Oxidasa***

La prueba oxidasa busca determinar la presencia de la enzima oxidasa; la mayoría de las bacterias Gram positivas son oxidasa negativa (MacFaddin, 2003). La reacción de la prueba de oxidasa se realiza en función de la producción de la enzima oxidasa intracelular mediante un sistema de citocromo oxidasa, que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, a su vez el oxígeno actúa como el aceptor final de electrones, se obtiene como producto de esta reacción agua y peróxido de hidrógeno (Basualdo *et al.*, 1996; MacFaddin, 2003). El sistema citocromo oxidasa está presente en bacterias aerobias, anaerobias facultativas y en algunas microaerófilas (MacFaddin, 2003; Olmos *et al.*, 2010). La reacción oxidasa positiva es limitada para microorganismos aerobios capaces de producir la enzima catalasa (Olmos *et al.*, 2010).

### ***Prueba Catalasa***

La prueba catalasa permite determinar la presencia de la enzima catalasa (MacFaddin, 2003). La bioquímica de esta prueba consiste en la unión del oxígeno y las

oxidasas presentes con proteínas asociadas a hierro y azufre o las flavoproteínas en estado reducido, se generan dos productos: el peróxido de hidrogeno y el radical superóxido (Motta & Gomes, 2015). Los microorganismos que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso liberándolo en forma de burbujas (Olmos *et al.*, 2010). En bacterias que presentan citocromo como anaerobias facultativas y aerobias está presente la enzima catalasa, mientras en los anaerobios obligados está ausente. Bacterias productoras de ácido láctico aerotolerantes carecen de una verdadera catalasa (MacFaddin, 2003).

### ***Difusión en disco***

La difusión en disco es un método para medir la actividad antibacteriana (Pomasqui Benavides, 2013). Consiste en preparar placas con agar y la bacteria de estudio, posteriormente se inocula la cantidad establecida de la sustancia (Camarena & Sánchez, 2017). Define la relación entre la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria de estudio (Tórtora *et al.*, 2007). Se produce un halo de inhibición en la placa de agar. Los resultados son altamente reproducibles (Castro, 2017; Olmos *et al.*, 2010).

## Capítulo III

### Metodología

Las muestras estuvieron conformadas por dos chichas de maíz procedente de la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui parroquia Fajardo y parroquia Amaguaña. Se aplicaron los siguientes procedimientos:

#### **Análisis físico - químico.**

Las muestras fueron llevadas en condiciones ambientales al laboratorio. Se analizaron los siguientes parámetros: grado alcohólico, contenido de azúcar y pH.

#### **Aislamiento de microorganismos**

Se utilizaron medios selectivos de crecimiento detallados a continuación.

#### **Tabla 2.**

*Condiciones de incubación y medios de cultivo selectivos*

Microorganismos	Medio de cultivo Condiciones	Temperatura	Tiempo
Mohos y levaduras	Agar PDA	25° C	3 a 5 días
Bacterias ácido lácticas BAL	Agar MRS	37° C	24 a 48 horas
Hongos	Agar Sabouraud	37° C	24 a 48 horas

*Nota.* Tomado de Diversidad microbiana asociada a la chicha de arroz: una bebida tradicional de Bolívar – Ecuador

#### **Aislamiento directo de bacterias lácticas.**

Se aislaron bacterias a partir de muestras de chicha de maíz de cocción artesanal, ensayo por duplicado, para lo cual se tomó un hisopo para cultivo primario y palillo para siembra por agotamiento en agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe), se incubó por 72 horas a 37°C en condiciones aerobias.

Se seleccionaron al azar colonias representativas en términos de morfologías y se purificaron por subcultura en el mismo medio. Siembra por agotamiento.

#### **Identificación de levaduras ácido lácticas.**

Para el aislamiento de levaduras se sembró en agar Sabouraud, se realizó siembra por agotamiento, esto fue realizado por duplicado. Las cajas Petri fueron incubadas por 48 horas a temperatura ambiente (37°C).

#### **Identificación de bacterias lácticas.**

Se apreció las características macroscópicas por observación directa y características microscópicas mediante tinción Gram, a partir del cepario en agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe).

#### **Caracterización morfológica (macroscópica y microscópica)**

Tras el periodo de incubación se identificó la morfología macroscópica de las colonias formadas, se seleccionó las que presentaron apariencia redondeada y en forma regular, bordes definidos y blancas o blanco-amarillentas, estas cepas fueron observadas posterior a una tinción Gram, el criterio de selección se basó en características morfológicas típicas de microorganismos fermentadores de ácido láctico (Bedón & Quintana, 2018).

#### **Reactivación de cepas**

Para el caso de las cepas de interés se utilizó medios Agar MacConkey (MKL) y Agar Manitol. Para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó MKL mientras que para *Staphylococcus aureus* Agar Manitol. Se incubó por 72 horas en condiciones ambientales.

### **Pruebas oxidasa y catalasa**

Para la prueba catalasa se utilizó, agua oxigenada de origen comercial, se colocó una gota de peróxido de hidrogeno al 3% sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur, se suspendió la bacteria BAL 1 y BAL2, se observó la formación de burbujas.

La prueba oxidasa utilizó el kit OxiStrips™, se colocó una tirilla sobre una caja Petri, se humedeció ligeramente con agua destilada y posteriormente se suspendió la bacteria BAL 1 y BAL 2, se observó la reacción.

### **Densidad Celular**

La densidad celular fue medida por conteo celular mediante la cámara de Neubauer y comparación con escala McFarland.

### **Actividad antimicrobiana**

Los cultivos BAL fueron cultivados anaeróticamente a 37 °C durante 24 h en medio de MRS, se centrifugaron para obtener sobrenadante de cultivo sin células (CFCS).

La actividad antimicrobiana fue demostrada por un ensayo de agar difusión. Se dispuso medio TSA en cada placa Petri de 90 mm de diámetro, se colocó 100 µL de la cepa objetivo de manera uniforme y se cultivó durante 24 horas. Pozos de 9 mm de diámetro fueron perforados con un tubo de metal estéril o sacabocados.

Posterior al cumplimiento de incubación se rellenó los pozos con 100 µL del sobrenadante de las cepas aisladas con una densidad celular de  $10^6$  o  $10^9$  (UFC/mL). Las placas fueron incubadas inicialmente a 4 °C durante 2 h para hacer una predifusión de las cepas. Posteriormente se subió la temperatura a 37 °C. El diámetro de la zona de inhibición se midió después de 12 a 15 horas de incubación.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se desarrollaría por análisis de varianza (ANOVA)

### **Análisis de resultados**

Los resultados serían estudiados en la plataforma estadística Info Stat.

### **Interpretación**

La interpretación de los resultados servirían para determinar la eficiencia de inhibición ante la presencia de bacterias y levaduras ácido lácticas.

### **Hipótesis de investigación**

$H_0$ : Los bacterias ácido lácticos aisladas en chichas de Quito tienen mayor o igual inhibición sobre las bacterias ***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Staphylococcus aureus*** que las levaduras ácido lácticas.

$H_1$ : Los bacterias ácido lácticos aisladas en chichas de Quito tienen menor inhibición sobre las bacterias ***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Staphylococcus aureus*** que las levaduras ácido lácticas.



## Capítulo IV

### Resultados

#### Evaluación físico química

Las muestras de chicha de maíz, M1 para la muestra recolectada en la parroquia de Amaguaña y M2 para la parroquia de Fajardo, M1 tuvo 0°GL, 3.40 de pH a 23.3°C y 1.050 SG a 12.2% mientras M2 presentó 10°GL, 3.55 de pH a 23.4°C y 1.017 SG a 4.2%. El tiempo de fermentación para M1 es menor en relación al de la muestra M2.

#### Evaluación organoléptica.

Las características organolépticas de las muestras de chicha se resumen en la siguiente en la siguiente tabla.

**Tabla 3.**

*Características organolépticas de muestras de chicha de maíz*

<b>Característica</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>
Olor	Dulce	Ácido
Color	Amarillo oscuro	Amarillo claro
Sabor	Dulce	Agridulce
Apariencia	Viscosa	Viscosa

#### Aislamiento de bacterias ácido lácticas.

Se aislaron un total de 2 bacterias ácido láctico con borde regular e irregular redondeado, con leve elevación, de color blanco intenso y blanco difuso como se muestra en la **Figura 2**.

**Figura 1.**

*Características macroscópicas en Agar MRS*



Bacterias Ácido Láctica M1, primera siembra



Bacterias Ácido Láctica M1, segunda siembra



Bacterias Ácido Láctica M2, primera siembra



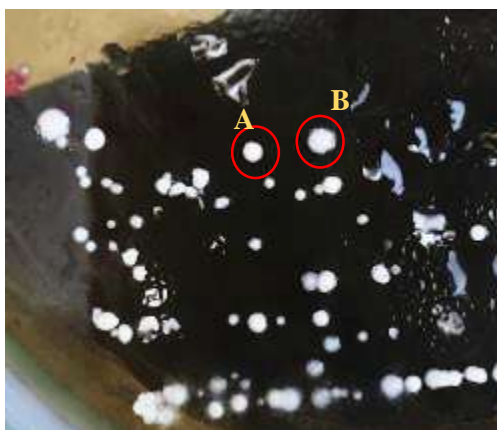
Bacterias Ácido Láctica M2, segunda siembra

Se reportó un recuento microbiano de  $1.32 \pm 0.32$  log UFC/mL y  $1.84 \pm 0.3$  log UFC/mL (Pazmiño *et al.*, 2014). Para cada etapa fermentativa se reportó un carga

microbiana de  $7.66 \pm 0.13$  log UFC/mL en el cultivo iniciador,  $8.33 \pm 0.12$  log UFC/mL en el transcurso de la fermentación y  $8.30 \pm 0.12$  log UFC/mL en la etapa final (Trávez, 2014).

## Figura 2.

*Colonias desarrolladas en Agar MRS. A. Bal 1 y B. Bal 2*



Las colonias de levaduras fermentadoras de ácido láctico morfológicamente son de forma circular, convexa, opaca, color blanco y bordes enteros. Microscópicamente y tinción Gram las células son globosas a elipsoidales grandes (Salazar, 2017). En agar glucosado de Sabouraud (SDA) las colonias se presentan abombadas o planas, de apariencia mantecosa, lisa o rugosa y de aroma dulce; se vuelven pastosas al envejecer (Coronel, 2015).

### **Aislamiento de levaduras ácido lácticas**

Se aislaron e identificaron siete diferentes especies de levaduras ácido lácticas en el análisis microbiológico de bebidas fermentadas (Castro, 2017). La presencia de levaduras fue representativa en la fase de fermentación; los recuentos en cada etapa reportados son  $5.82 \pm 0.13$  log UFC/mL en la etapa inicial,  $6.42 \pm 0.25$  log UFC/mL en la etapa fermentativa y  $0.81 \pm 0.02$  log UFC/mL en la etapa final (Trávez, 2014). El recuento microbiano para levaduras ácido lácticas fue  $2.36 \pm 0.52$  log UFC/mL (Pazmiño

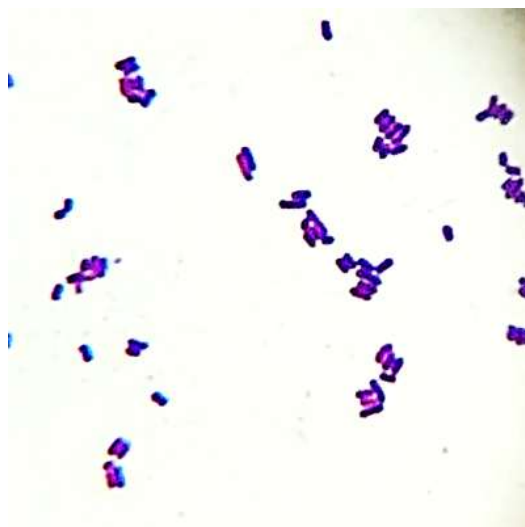
*et al.*, 2014) La información reportada es recolectada de fuentes bibliográficas debido a la suspensión de actividades académicas.

### **Caracterización en términos morfológicos**

Las colonias seleccionadas fueron Gram positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas.

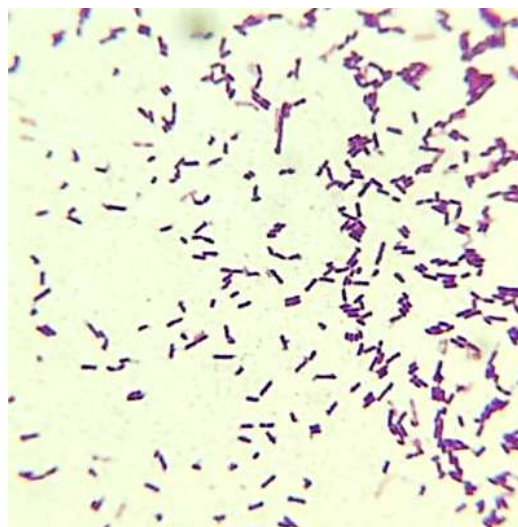
### **Figura 3.**

*Características Microscópicas (100X)*



4.

Bacteria Láctica BAL-1



Bacteria Láctica BAL-2

No existe presencia de levaduras. Durante el transcurso de la fermentación las concentraciones de etanol van aumentando, concentraciones superiores al 12% de etanol produce la muertes de las levaduras (Pazmiño, 2013). Las bebidas alcohólicas no destiladas no superan el 20% de la concentración de etanol (Vincent Vela *et al.*, 2006).

### **Prueba Oxidasa y Catalasa**

Las cepas aisladas presentaron reacción negativa para la prueba Oxidasa y Catalasa. No se evidencia formación de burbujas ni cambio de color. Los bacilos catalasa

negativos, Gram-positivos y en forma de varilla fueron considerados presuntos microorganismos ácido lácticos. Se seleccionaron y almacenaron tres o cuatro colonias de cada cultura.

### **Actividad Antimicrobiana**

Aislados de bacterias fermentadoras de ácido láctico reportan un 97.32% de inhibición sobre *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición promedio de 26 mm y un 73.96% sobre *E. coli* con un halo de inhibición promedio de 12 mm (Churqui, 2020). En aislados a partir de chicha de Molle elaborada de forma artesanal en las provincias de Huanta y Huamanga en Perú se registra un diámetro mínimo resistente de 14 mm para *E. coli* y 15 mm para *S. aureus* (J. Rodríguez & García, 2017).

En el caso de aislados de productos latinoamericanos fermentados se reportar una zona de inhibición > 10 mm en relación a *E. coli* (Alba, 2018). Las bacteriocina producidas por el fermento de la chicha de jora analizadas en Abancay definen un valor de inhibición de crecimiento para *S. aureus* de  $2.00 \pm 0,41$  mm (Huaman, 2011). Se describe el mejor efecto bacteriostático frente a *E. coli* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4  $\mu$ l/mL (Larrea *et al.*, 2007). El CMI para *Staphylococcus aureus* es de 1600 UA/ml (Huaman, 2011).

En aislamientos de alimentos fermentados elaborados de forma artesanal se evidencia un 15% de actividad bactericida sobre *Pseudomas sp*, *E. coli* y *S. aureus* (Pulido, 2013). Existe evidencia limitada acerca del halo de inhibición a partir de productos fermentados artesanales frente a *Pseudomonas sp* (S. Lindgren & Dobrogosz, 1990; L. Sánchez & Tromps, 2014). El diámetro de inhibición oscila entre 20 y 21 mm para aislados a partir quesos fermentados de producción artesanal (Pulido, 2013). La actividad bacteriana de cepas aisladas a partir de queso de elaboración artesanal es de 72.7% frente a *Pseudomonas sp* (L. Sánchez & Tromps, 2014).

El diámetro de inhibición para *E. coli* y *Staphylococcus aureus* por parte de levaduras ácido lácticas aisladas de alimentos tradicionales fue de 16 a 20 mm y 12 a 16 mm respectivamente a las 48 horas de incubación; el recuento de células viables de las células Gram negativos oscilaban entre 2 y 2.3 unidades log mientras en las cepas Gram positivos oscilaron entre 1.5 y 1.8 unidades log (Gddoa Al-sahlany *et al.*, 2020)

Los resultados de esta investigación no pudieron ser obtenidos por suspensión de actividades académicas asociadas a la pandemia del virus SARS-COVID-19.

## Capítulo V

### Discusión

El consumo de bebidas tradicionales es evidente en ciertos restaurantes y mercados del Ecuador. La composición y forma de elaboración marca la diferencia al momento de definir los diferentes tipos de bebidas fermentadas (Rivera, 2014). El análisis microbiológico asegura la calidad e inocuidad de la bebida para el consumo humano (Pazmiño *et al.*, 2014). La presencia o ausencia de coliformes son indicativos de que existió contaminación ya sea en la materia prima o en el proceso de elaboración (Ortega *et al.*, 2008). La conservación de las propiedades organolépticas está asociada a la presencia de Coliformes totales (Pazmiño, 2013). Aun cuando no se logró identificar la presencia de coliformes la chicha cumple con las características propias de este tipo de bebidas.

#### **Discusión de Propiedades Físico Químicas y Organolépticas.**

Las características organolépticas reportadas en la Tabla 4 concuerda con el caracterización típica reportada por Rojas, B. (2013) donde describe esta bebida de color pardo oscuro o un color similar, con un aroma propio característico de la bebida, inconfundible y de sabor agridulce; sensación ligera de gas producto de la fermentación. La fermentación se presenta de forma tumultuosa del mosto, tornándose turbio y espumoso por el CO<sub>2</sub> (Rojas, 2013). La bebida generalmente es turbia y presenta mínimas cantidades de sedimento durante su conservación (Ara Rojas *et al.*, 2017). La presencia de sedimentación, indica que hubo precipitación de los sólidos insolubles: gomas, proteínas, levaduras, cuando la fermentación ha terminado; debido a que las proteínas reaccionan con los polifenoles presentes en la malta y de esta manera, da lugar

a compuestos menos solubles, de alto peso molecular, que son principales causas del enturbiamiento de la chicha de maíz (Ara Rojas *et al.*, 2017; Fula, 2010).

Organolépticamente la chicha presenta sabor dulce, con ligera acidez, de bajo grado alcohólico, fluida consistencia, poca astringencia y aroma de malta fermentada (Rojas, 2013). Durante el proceso de fermentación producen el dióxido de carbono y etanol, compuestos de vital importancia a lo que se denomina como “flavor”, es decir, el aroma y el sabor (Ara Rojas *et al.*, 2017).

El análisis de los grados de alcohol indican el tiempo de fermentación (Pazmiño *et al.*, 2014). El intervalo del grado alcohólico obtenidos en esta investigación es de 0° a 10° porcentaje similar a lo reportado por Liguori *et al.*, (2015) donde menciona que el contenido de alcohol es del 2 al 12% con tendencia a aumentar dejando reposar la bebida durante algunas semanas o a su vez por la adición de fuentes de azúcar (Rivera, 2014). La cerveza al igual que la chicha se considera bebidas de bajas concentraciones de alcohol por la similitud en el proceso de obtención y elaboración (Guamán, 2013). Según la norma NTE-INEN 2262:2003, para la cerveza, determina un intervalo de 2 a 5 grados de alcohol. Los valores para el grado alcohólico de la chicha tienen relación con la concentración de azúcares del maíz y la cantidad de azúcares del mosto (Granadillo & Rodríguez, 2014).

Los azúcares utilizados en la producción de piruvato provienen del almidón contenido en los granos de maíz y que es catabolizado por enzimas hidrolíticas del grano, durante las etapas de remojo y germinación, hasta tener únicamente el azúcar que será el sustrato para la fermentación (Ara Rojas *et al.*, 2017; Garrido *et al.*, 2004; Sánchez-Pérez *et al.*, 2010).  $M_2$  presenta menor cantidad de sólidos solubles en la bebida en relación de  $M_1$ . Según Rivera, L. (2014) los grados Brix pueden estar en un rango de 4 a 12. Aun cuando este porcentaje varía de una muestra a otra no superan la unidad. A



menor cantidad de sólidos solubles en la bebida existe mayor fermentación (Monar *et al.*, 2014). Los sistemas de fermentación de las levaduras requieren de fuentes nutricionales de carbono y glucosas (Rojas, 2013).

Los valores de pH para ambas muestras fluctúan entre 3 y 4, acidez 0.4% (ácido láctico). Barbosa, *et al.* (2018) reporta valores de pH semejantes a esta investigación cuando analizaba chicha de jora, de yuca y morocho; acorde con lo descrito por los autores el pH de la chicha de jora se encontraba entre 2,62 y 4,14. Semejante a lo descrito por Huaman (2011) donde detalla la disminución de pH de 6.5 a 3.57 en su investigación. Rivera (2019) reporto una acidez de 0.2 – 5.1% en su trabajo de titulación cuando investigaba sobre la chicha de jora. Rivera, L. (2014) en su análisis reportó un porcentaje de acidez de 0.02 a 2%. Los valores de pH de un proceso de fermentación son importantes por su efecto sobre la levadura, el color, sabor y turbidez de la chicha de maíz (Ara Rojas *et al.*, 2017; Rojas, 2013). A niveles bajos de pH la actividad de las levaduras disminuye. Según investigaciones, el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras, en la fermentación alcohólica, oscila en el rango de 3 y 5 (Granadillo & Rodríguez, 2014; Rojas, 2013; Ward, 1991). La fermentación de la chicha de maíz es de tres a seis días, en base al mayor grado alcohólico obtenido; pero para extender el periodo de vida, se recomienda tres días con un pH de 4 y un grado alcohólico de 2.0 (Guamán, 2013).

Estas colonias mostraron ser Gram positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa negativa. Este resultado concuerda con lo descrito por Rivera, L. (2014) donde menciona que las bacterias ácido lácticas aisladas fueron bacilos Gram positivos. En el caso de Trávez, J. (2014) realizó también la identificación de endosporas y las define como bacilos Gram positivos. Según MacFaddin en el 2003 los anaerobios estrictos además de no tolerar la presencia de oxígeno, tienen ausencia del

sistema de citocromo oxidasa. Así lo afirma Monar *et al.*, en el 2014 en donde menciona que la mayoría de bacterias acidolácticas son aerotolerantes que presentan ausencia de citocromos y porfirinas, es decir catalasa y oxidasa negativa. Las especies de *Lactobacillus* tienen ausencia de esta actividad enzimática (MacFaddin, 2003). El sistema citocromo oxidasa utiliza el oxígeno como aceptor final del hidrogeno produciendo peróxido de hidrogeno y por medio de la catalasa elimina el peróxido de hidrogeno acumulado, que es toxico para los microorganismos (MacFaddin, 2003). Para J. M. Rodríguez en el 2006 la producción de peróxido de hidrógeno es evidencia de la producción de inhibidores microbianos.

### **Discusión Aislamiento de Microorganismos**

El análisis microbiológico de bebidas fermentadas incluye el aislamiento de bacterias, hongos y otros microorganismos. Los recuentos microbianos de levaduras en la etapa inicial son superiores a los de la etapa fermentativa. Las levaduras son microorganismos que se desarrollan en medios con abundantes azúcares, los mismos que utilizan este sustrato como fuente de energía (Rivera, 2014). Altos niveles de glucosa puede inhibir el crecimiento de la levadura y la fermentación como resultado de una elevada presión osmótica (Rojas, 2013). En la etapa inicial y fermentativa la población de levaduras es elevada por la baja concentración de alcohol y ácidos orgánicos (Rivera, 2014). La presencia en la etapa final de fermentación es mínima esto debido a que existen especies de levaduras con alta resistencia al alcohol. Según Verapinto (2009) la escasa presencia de este tipo de microorganismos se debe a un grado alcohólico alto, ya que a partir de los 13°GL se convierte en una sustancia tóxica inhibitoria de crecimiento. La presencia de alcohol limita el consumo de azúcares alterando el pH del medio de crecimiento (Rivera, 2014).

La presencia de bacterias ácido lácticas fue similar y elevada en las 3 etapas fermentativas. El ser ácido tolerante permite su crecimiento en las primeras fases, viven de forma natural en medios con pH altos y bajos con presencia de azúcares. Según Rivera, L. (2014) reporta una concentraciones elevadas en la etapa fermentativa y final. En el caso de las levaduras se reporta una diferencia de 0.5 Log UFC/mL entre la etapa inicial y fermentativa. La etapa inicial en donde existe variedad de azúcares se producen mayor número de levaduras (Ajay & Sanjay, 2008). La presencia significativa de levaduras en estas fases es directamente proporcional a la baja concentración de compuesto orgánicos y alcohol (Andrés López-Arboleda *et al.*, 2010). Al reportarse mayor concentración de bacterias ácido lácticas en el recuento microbiano se le otorga la responsabilidad de inhibición de microorganismos indicadores de calidad, donde se acepta la hipótesis nula.

### **Discusión Actividad Antimicrobiana**

Las BAL son utilizadas para el mejoramiento de sabor y textura, además del valor nutricional que le agregan a los alimentos por sus efectos sobre la digestibilidad y la bioconservación de los mismos. A las BAL se les atribuye algunos beneficios para la salud como la inhibición de patógenos (Monar *et al.*, 2014). La presencia de bacterias ácido lácticas fue diferente para cada una de las etapas de fermentación siendo más significativa el recuento en la etapa de iniciación (Trávez, 2014). La presencia de este tipo de microorganismos en cultivos iniciadores es debido a la tolerancia a pH bajos así como a medios ricos en azúcares (Granadillo & Rodríguez, 2014; Medina, 2003).

Para la inhibición se consideraron cepas de bacterias indicadoras Gram + y Gram - (Carrasco *et al.*, 2002). La actividad antimicrobiana es el resultado de la acumulación de los productos finales del proceso de fermentación: ácidos orgánicos y bacteriocinas, como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, etc. (Martín del Campo M *et*

*al.*, 2008; Monar *et al.*, 2014). Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos. Las bacterias acidolácticas estimulan el sistema inmune, aumentando el número de macrófagos, linfocitos, inmunoglobulina A (IgA), la producción de interferón gamma y la producción de anticuerpos (Martín del Campo M *et al.*, 2008). El efecto antagónico está asociado a la reducción de pH en el medio por la producción de ácidos orgánicos (Jay, 1993; Martín del Campo M *et al.*, 2008). Existen numerosas proteínas naturales producidas por las BAL con diferentes espectros de inhibición específicos.

Las bacteriocinas pueden inhibir bacterias indeseables específicas o inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos (Martín del Campo M *et al.*, 2008). La inhibición antimicrobiana se asocia a la acumulación de diferentes productos finales durante el proceso de fermentación según lo descrito por Lindgren y Dobrogoz (1990). En la actualidad la FDA aprobó el uso nisina como la única bacteriocina (Martín del Campo M *et al.*, 2008). El espectro de acción es reducido en el caso de bacterias Gram +, en el caso de las Gram- existe una mayor eficiencia de inhibición.

Aun cuando no se pudo cumplir de forma experimental el proyecto por suspensión de actividades por pandemia mundial se reportan resultados obtenidos por diferentes investigaciones. Martín del Campo M *et al.*, (2008) aisló 1962 cepas de 362 muestras de queso "Munster" (francés), probando su capacidad antimicrobiana. Reportó la inhibición de las Gram + (*Staphylococcus sp*) y más no las Gram – (*Pseudomonas sp* y *E. coli*). Los factores de inhibición antimicrobiana considerados en este estudio es la reducción del pH ajustado a 6.5 en todos los tratamientos, este se considera el mecanismo con mayor eficiencia en relación a la del peróxido de hidrogeno y la producción de bacteriocinas. Aun cuando se inhibió el peróxido de hidrogeno por presencia de catalasa no se evidenció inhibición de microorganismos indicadores indicado que el efecto inhibidor está asociado a bacteriocinas.

Los resultados presentados coinciden en la inhibición de bacterias Gram + *Staphylococcus aureus* mientras existe ausencia de inhibición para el caso de Gram -. Se corrobora la preferencia de las BAL por la inhibición de bacterias Gram + (Klaenhammer, 1993; Martín del Campo M *et al.*, 2008). En la mayoría de casos la inhibición se origina por la disminución en el pH (Karakas-Sen & Karakas, 2018).

La actividad antimicrobiana para las levaduras depende de la presencia de péptidos antibacterianos que reducen la viabilidad de cepas objetivo en función a la concentración y tiempo de exposición; estos péptidos son estables en una amplia gama de pH en relación a las bacteriocinas (Gddoa Al-sahlany *et al.*, 2020). El efecto de inhibición posterior a las 24 horas de incubación fue elevado en el caso de cepas Gram-negativas (Yildirim *et al.*, 1999). La eficiencia inhibitoria depende de la reacción electrostática de los péptidos bioactivos con la membrana de las células bacterianas y la composición interna celular (Gddoa Al-sahlany *et al.*, 2020).

La presencia bacterias y levaduras ácido lácticas permite la inhibición de microorganismos indicadores patógenos, análisis con muestras libres de bacterias ácido láctico no muestran efecto antagónico, por lo que se les atribuye la capacidad de adaptación al medio y/o la presencia de dióxido de carbono limitando el desarrollo de otras bacterias, hongos, etc (S. E. Lindgren & Dobrogosz, 1990). Los péptidos antibacterianos actúan en ambientes neutros y ácidos generando protección contra una amplia gama de microorganismos no deseados que se desarrollan en diversos ambientes, alimentos contaminados y alterando su calidad (Gddoa Al-sahlany *et al.*, 2020).

Las expectativas de las bacterias ácido lácticas recaen en las diversas aplicación en la industria alimenticia al ser consideradas como una alternativa de conservantes biotecnológicos demandados por el productor y consumidor. Se convierten en una alternativa industrial económica con versatilidad de aplicación en diversos procesos

fermentativos.

## Capítulo VI

### Marco administrativo

El proyecto de titulación determinación de la actividad antibacteriana de microorganismos ácido lácticos aislados a partir chicha tradicional expendida en mercados de Quito contra bacterias de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* considera uso de laboratorio y obtención de muestras en campo así como parámetros técnicos, administrativos y financieros para su realización.

### Factibilidad del Proyecto

Los recursos materiales, financieros, tecnológicos y humanos fueron considerados previamente con el fin de determinar la viabilidad del proyecto, se estableció un orden prioritario con el objetivo de eliminar cualquier inconveniente a futuro.

### Recurso Humano

Responsable de aportar con el conocimiento para el desarrollo del proyecto, se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla 4.**

#### *Talento humano*

	Nombre	Función
1	Lisbeth Alejandra Cajas Toapanta	Investigador
2	Karina Ponce Loaiza	Director del proyecto de titulación

### **Recursos Materiales**

El uso de todos los materiales a continuación permitió el desarrollo del proyecto. El uso de todos los materiales a continuación permitió el desarrollo del proyecto. Los equipos, materiales y reactivos serán provisto por los laboratorios de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

#### **Tabla 5.**

*Insumos, reactivos y equipos empleados en el desarrollo del proyecto de titulación*

Materiales	Reactivos	Equipos
Tubos de ensayo de 10 ml	Caldo MRS	Balanza analítica
Cajas Petri de vidrio	Tinción Gram	Plancha de calentamiento con agitación
Asas microbiológicas	Peróxido de hidrogeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Incubadora con agitación
Erlenmeyer de 250 mL	Agar MRS	pH metro
Agitadores magnéticos		Refrigerador
Pissetas		Autoclave
Probetas		Vórtex
Gradillas		Cámara aerobia
Cooler		Cámara aerobia
Masking tape		
Rotulador		
Sacabocados estéril		



### **Recursos Financieros**

La inversión total para el desarrollo del proyecto se realizó por autofinanciamiento de la investigadora, el costo asciende a un monto de 590.25 USD.

#### **Reactivos.**

**Tabla 6.**

*Reactivos empleados en el desarrollo del proyecto de titulación*

Reactivos	Cantidad	Precio Unitario \$	Precio Total \$
Agar MRS	200 g	70.00	24.00
Tinción Gram	10 mL	45.00	9.00
Peróxido de hidrogeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 mL	4.80	0.25
Total			33.25

#### **Recursos Tecnológicos.**

Enumerados en la siguiente tabla se presenta los recursos tecnológicos utilizados durante el desarrollo de este proyecto.

**Tabla 7.**

*Recursos Tecnológicos*

Número	Software	Descripción /Uso
1	Ofimática	Tabulación y Escrito
2	Microsoft Office	Escrito

**Tabla 8.***Equipos Tecnológicos*

Número	Software	Cantidad	Precio Unitario \$	Precio Total \$
1	Balanza	30 días	49.48	15
2	Autoclave	20 días	535	160
3	Plancha de calentamiento y agitación	20 días	250	120
4	Incubadora	50 días	620	150
5	Cámara de flujo	10 días	5980	100
6	Esterilizador electrónico	50 días	38	12
Total				557

## Conclusiones

- Se aisló e identificó 2 cepas de bacterias ácido lácticas procedentes de muestras de chicha tradicional, las cuales son responsables de producir ácido láctico, reducir el pH y originar compuestas inhibitorios de crecimiento.
- Se investigó y reportó 7 cepas de levaduras fermentadoras de ácido láctico procedentes de muestras de chicha tradicional, las cuales son responsables de la presencia de etanol y metabolitos que determinan las propiedades organolépticas de las bebidas fermentadas.
- Las muestras de chichas se encontraron dentro de los valores referenciales de pH, grado alcohólico, porcentaje de azúcar y grado de acidez.
- Las bacterias ácido lácticas inhibieron el crecimiento de *Escherichia. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por medio de pruebas antagonicas de difusión en disco.
- Las levaduras fermentadoras de ácido láctico estuvieron presentes en las primeras etapas de fermentación, el grado alcohólico inhibió su crecimiento e incentivó su destrucción.
- Las bacterias ácido lácticas tuvieron mayor eficiencia de inhibición en relación a las levaduras.

### **Recomendaciones**

- Observar el crecimiento de los microorganismos en intervalos de 24 horas.
- Usar medios selectivos de crecimiento para el aislamiento de bacterias y levaduras.

## Bibliografía

- Abdul-Mumin, A., Ervin, S., & Halvorson, E. E. (2019). Clinical characteristics associated with increased resource utilization of hospitalized children under 5 years with acute gastroenteritis at a tertiary hospital in the northern region of Ghana: A retrospective study. *Pan African Medical Journal*, 33. <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.33.186.13133>
- Aguirre, H. (2009). *Propuesta de una receta estándar para la elaboración de la chicha en la provincia de Chimborazo.*
- Alba, L. (2018). *Potencial biotecnológico de bacterias lácticas aisladas de productos fermentados de Latinoamérica y su aplicación en alimentos funcionales .*
- Alhazmi, A. (2015). Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.5539/ijb.v7n2p44>
- Andino, F., & Castillo, Y. (2010). *Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria.*
- Andrés López-Arboleda, W., Ramírez-Castrillón, M., Adriana Mambuscay-Mena, L., & Osorio-Cadavid, E. (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia Yeast diversity associated to Colombian traditional “chichas.” In *Rev. Colomb. Biotecnol* (Issue Diciembre).
- Ara Rojas, S., Hurtado Alendes, A., Barnett Mendoza, E., & Celi Saavedra, L. (2017). *Optimization of parameters in the process of elaboration of chicha de jora.* 11–28.

- Bach, P., & Bustamante, Y. (2013). *MAÍZ MORADO (Zea Mays) Y QUINUA (Chenopodium Quinoa) VARIEDAD INIA 420 NEGRA COLLANA*.
- Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsin, B., & Torres, V. J. (2017). Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. In *Pathogens and Disease* (Vol. 75, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx005>
- Baldi, F., Bianco, M., Nardone, G., Pilotto, A., & Zamparo, E. (2009). Enfermedades diarreicas agudas. *World Journal of Gastroenterology*, 3341–3348.
- Barrett, J., & Fhogartaigh, C. N. (2017). Bacterial gastroenteritis. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 45, Issue 11, pp. 683–689). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.002>
- Barros, L. L., Farias, A. Q., & Rezaie, A. (2019). Gastrointestinal motility and absorptive disorders in patients with inflammatory bowel diseases: Prevalence, diagnosis and treatment. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 25, Issue 31, pp. 4414–4426). Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i31.4414>
- Basualdo, J., Coto, C., & De Torres, R. (1996). *Microbiología biomédica*.
- Becerra, A., & Villegas, V. (2007). Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo bananero de Uraba –Antioquia. In *Universidad EAFIT*.
- Bedón, L., & Quintana, M. (2018). *Aislamiento, producción y comercialización de un consorcio de bacterias ácido-lácticas para fermentación y conservación de forrajes*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

- Benaissa, M., Zadi-Karam, H., & Karam, N.-E. (2017). Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*, 16(30), 1630–1637. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16088>
- Beresford, T., & Williams, A. (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 287–318). [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=a95C5Nza5\\_EC&oi=fnd&pg=PA287&dq=The+microbiology+of+cheese+ripening.&ots=diyfPiePC&sig=Xij57i3ZuJzCLPVAarOucjPmZsk#v=onepage&q=The+microbiology+of+cheese+ripening.&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=a95C5Nza5_EC&oi=fnd&pg=PA287&dq=The+microbiology+of+cheese+ripening.&ots=diyfPiePC&sig=Xij57i3ZuJzCLPVAarOucjPmZsk#v=onepage&q=The+microbiology+of+cheese+ripening.&f=false)
- Bergey, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (W. and Wikins (ed.); 9th ed.).
- Bibek, R., & Arun, B. (2008). *Fundamental food microbiology*. CRC Press.
- Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 887–894. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2245>
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bowen, C., Mardones, M., & Velasquez, L. (2015). *Guía de laboratorio de microbiología*. 1–88.

Bravo, F. (2004). *El Manejo Higiénico de los Alimentos* (Grupo Noriega (ed.)).

[https://www.google.com.ec/search?sxsrf=ACYBGNTF2Pi1hLk18X3snIW8G\\_hxWZ86xQ%3A1581004122689&source=hp&ei=WjU8XuK-J4Sb5gLzoKrgAg&q=Bravo%2C+M.+Francisco.+%282004%29.+EI+Manejo+Higiénico+de+los+Alimentos%2C+Guía+para+la+Obtención+del+Distintivo+H.+Editorial+LIMUSA+S.A.+México.+&oq=Bravo%2C+M.+Francisco.+%282004%29.+EI+Manejo+Higiénico+de+los+Alimentos%2C+Guía+para+la+Obtención+del+Distintivo+H.+Editorial+LIMUSA+S.A.+México.+&gs\\_l=psy-ab.3...331.331..597...1.0..0.0.0.....0....2j1..gws-wiz.-SDP-vbz0Mw&ved=0ahUKEwji0\\_moo73nAhWEjVkkHXOQCiwQ4dUDCAY&uact=5](https://www.google.com.ec/search?sxsrf=ACYBGNTF2Pi1hLk18X3snIW8G_hxWZ86xQ%3A1581004122689&source=hp&ei=WjU8XuK-J4Sb5gLzoKrgAg&q=Bravo%2C+M.+Francisco.+%282004%29.+EI+Manejo+Higiénico+de+los+Alimentos%2C+Guía+para+la+Obtención+del+Distintivo+H.+Editorial+LIMUSA+S.A.+México.+&oq=Bravo%2C+M.+Francisco.+%282004%29.+EI+Manejo+Higiénico+de+los+Alimentos%2C+Guía+para+la+Obtención+del+Distintivo+H.+Editorial+LIMUSA+S.A.+México.+&gs_l=psy-ab.3...331.331..597...1.0..0.0.0.....0....2j1..gws-wiz.-SDP-vbz0Mw&ved=0ahUKEwji0_moo73nAhWEjVkkHXOQCiwQ4dUDCAY&uact=5)

Bresee, J. S., Widdowson, M., Monroe, S. S., & Glass, R. I. (2002). Foodborne Viral Gastroenteritis: Challenges and Opportunities. *Clinical Infectious Diseases*, 35(6), 748–753. <https://doi.org/10.1086/342386>

Camarena, J. J., & Sánchez, R. (2017). *INFECCIÓN POR Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA.*

Carrasco, M. S., Scarinci, H. E., & Simonetta, A. C. (2002). *Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products.* <https://search.proquest.com/openview/7b08749771c77c3c41bf2d10e0fa45db/1?pq-origsite=gscholar&cbl=36914>

Castro, M. (2017). *EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y CITOTOXICIDAD DE CAESALPINIA SPINOSA (MOLINA) KUNTZE “TARA” FRENTE A STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) Y STREPTOCOCCUS SANGUINIS (ATCC 10556).*



- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. In *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 61, Issue 1). [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Chekhlov, A., Uryasev, S., & Zabarankin, M. (2005). Drawdown measure in portfolio optimization. *International Journal of Theoretical and Applied Finance*, 8(1), 13–58. <https://doi.org/10.1142/S0219024905002767>
- Churqui, J. (2020). *BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE CEPAS DE Escherichia coli Y Staphylococcus aureus DE QUESOS FRESCOS EXPENDIDOS EN TRES MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO – 2017*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Cisternas, D. (2011). El uso de probióticos en algunas enfermedades gastrointestinales. *Medwave*, 11(06). <https://doi.org/10.5867/medwave.2011.06.5051>
- Coria José, Carrión Salvador, Gómez Demóstenes, & Treviño Angélica. (2001). *Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda*.
- Coronel, D. (2015).  *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE THEOBROMA CACAO L. DE LA VARIEDAD “CHUNCHO” OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ*.
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la

sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55.  
<https://doi.org/10.22490/24629448.1717>

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (2000). Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), 694–701.  
<https://doi.org/10.1093/AJCN>

Curtis, S., & Cummins, S. (2007). Ecological studies. In *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli* (Vol. 44, Issue 5, pp. 333–354). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-70812-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-0-387-70812-6_16)

Dalla Pria, A., & Bower, M. (2018). AIDS-related malignant disease. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 46, Issue 6, pp. 365–369). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.03.002>

Díaz Ruiz, G., & Rodarte, C. W. (2003). *Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados*.

Durkschein, F., Petritsch, W., & Hammer, H. F. (2016). Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 7, pp. 2179–2194). Baishideng Publishing Group Co., Limited.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i7.2179>

Escudero Bruna. (2014). *Caracterización físico-química y microbiología de las principales bebidas fermentadas tradicionales de la provincia de Bolívar - Ecuador*.

Farthing, M., & Ballinger, A. (2001). *Drug Therapy for Gastrointestinal Disease*.  
<https://books.google.com.ec/books?id=tqWbDwAAQBAJ&pg=PT203&dq=antibiotic>

s+disease+gastrointestinal&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwil4ZT6pd7oAhWBdN8KHaHVBqsQ6AEIczAH#v=onepage&q=antibiotics disease gastrointestinal&f=false

Feng, Y., Chen, C.-J., Su, L.-H., Hu, S., Yu, J., & Chiu, C.-H. (2008). Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 23–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00086.x>

Flint, J. A., Van Duynhoven, Y. T., Angulo, F. J., DeLong, S. M., Braun, P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G. K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H., & Braam, P. (2005). Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease, and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review . *Clinical Infectious Diseases*, 41(5), 698–704. <https://doi.org/10.1086/432064>

Fula, A. (2010). *DESARROLLO DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON ADICIÓN DE COCCIÓN DE MAÍZ*.

García, G., Quintero, R., & López, M. (1993). *Bioteología Alimentaria* (L. Noriega (ed.)).

Garrido, A., Olmo, R., Castel, C., & Teijón, C. (2004). *Bioquímica metabólica - Conceptos y Tests*. <https://doi.org/10.1049/ic.2012.0029>

Gddoa Al-sahlany, S. T., Altemimi, A. B., Abd Al-Manhel, A. J., Niamah, A. K., Lakhssassi, N., & Ibrahim, S. A. (2020). Purification of Bioactive Peptide with Antimicrobial Properties Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 9(3), 1–11.

<https://doi.org/10.3390/foods9030324>

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173.

<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (Vol. 9781444333831, pp. 45–54). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch4>

Glices, P., & Veloz, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico.*

Goldfarb, D. M., Steenhoff, A. P., Pernica, J. M., Chong, S., Luinstra, K., Mokomane, M., Mazhani, L., Quaye, I., Goercke, I., Mahony, J., & Smieja, M. (2014). Evaluation of anatomically designed flocked rectal swabs for molecular detection of enteric pathogens in children admitted to hospital with severe gastroenteritis in botswana. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3922–3927. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-14>

Granadillo, I. L., & Rodríguez, G. T. (2014). *Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui The Effect of Temperature and pH on Agave cocui Juice Fermentation.* 14, 375–381.

Gualerzi, C. O., Brandi, L., Fabbretti, A., & Pon, C. L. (2014). *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. <https://books.google.com.ec/books?id=4TWyAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=>

antibiotics&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwjCscrbd7oAhVqU98KHdZcDHgQ6AEIJzAA#v=onepag

e&q=antibiotics&f=false

Guamán, Á. (2013). *VALIDACIÓN TÉCNICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LAS CHICHAS (JORA Y MORADA), ELABORADAS POR LA FUNDACIÓN ANDINAMARKA, CALPI-RIOBAMBA*".

Hebbelstrup Jensen, B., Adler Sørensen, C., Hebbelstrup Rye Rasmussen, S., Reijkjær Holm, D., Friis-Møller, A., Engberg, J., Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Struve, C., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., Petersen, R. F., Petersen, A. M., & Kroghfelt, K. A. (2018). Characterization of Diarrheagenic Enteroaggregative *Escherichia coli* in Danish Adults-Antibiotic Treatment Does Not Reduce Duration of Diarrhea. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 306. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00306>

Heimesaat, M. M., Escher, U., Grunau, A., Kühl, A. A., & Bereswill, S. (2019). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* accelerate intestinal, Extra-Intestinal, and systemic inflammatory responses in human Microbiota-Associated mice with subacute ileitis. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 49. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00049>

Hernandez, A. (2010). *Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva* ... (2a ed.).

<https://books.google.com.ec/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pg=PT47&dq=probioticos>

&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwiatreRIOHoAhWCZd8KHQsLCTgQ6AEIVDAF#v=onepa

ge&q=probioticos&f=false

Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial* (I. Alfaro & R. Arrieta (eds.); 1a ed.).

[https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA82&dq=probioticos](https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA82&dq=probioticos&hl=es-)  
&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwiatreRIOHoAhWCZd8KHQsLCTgQ6AEITDAE#v=onepa

ge&q=probioticos&f=false

Herrero, T. V. (2011). *LOS COLONOS STE +*.

Hidalgo, I., Martínez, A., Martínez, F. J., Puerta, I., Pujante, M. C., & Sánchez, M. J.

(2017). *Eficacia del uso de probióticos en el tratamiento de la diarrea asociada a antibioterapia en el paciente crítico | 3Ciencias* (1era ed.).

<https://www.3ciencias.com/libros/libro/eficacia-del-uso-probioticos-tratamiento-la-diarrea-asociada-antibioterapia-paciente-critico/>

Houck, K. (2017). *Efectos de la vida temprana de un entorno de doble carga: salud*

*intestinal infantil y función inmune en Galápagos, Ecuador.*

<https://doi.org/10.17615/89G1-AC78>

Huaman, N. (2011). *"PRODUCCION DE BACTERIOCINA UTILIZANDO COMO*

*SUSTRATO "CHICHA DE JORA" Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD INHIBITORIA in vitro EN BACTERIAS.*

INEC. (2017). *Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censos.*

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

[inec/Sitios/inec\\_salud/index.html](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Sitios/inec_salud/index.html)

INEC. (2019). *Registro Estadístico de Camas y Egresos Hospitalarios 2018*.

INEN. (1998). *Norma Técnica Ecuatoriana*.

Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la microbiología*. Reverte.  
<http://books.google.com/books?id=-dUEZSXaz2UC&pgis=1>

Jay, J. M. (1993). *Microbiología moderna de los alimentos* (3rd ed.). Acribia.

Jochmans, I., O'Callaghan, J. M., Ploeg, R. J., & Pirenne, J. (2017). Kidney Preservation.  
In *Kidney Transplantation, Bioengineering, and Regeneration: Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era* (Vol. 27, Issue 10, pp. 87–100). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801734-0.00007-2>

Kannan, I. (2016). *Essentials of Microbiology for Nurses* (ELSEVIER (ed.); 1st ed.).  
<https://books.google.com.ec/books?id=XImIDQAAQBAJ&pg=PA63&dq=staphylococcus+aureus+morphology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjBmOSq2dboAhUPmeAKHRR9DOAQ6AEIPDAC#v=onepage&q=staphylococcus+aureus+morphology&f=false>

Karakas-Sen, A., & Karakas, E. (2018). Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Bioscience Journal*, 985–999.  
<https://doi.org/10.14393/bj-v34n2a2018-34517>

Kareb, O., Champagne, C. P., Jean, J., Gomaa, A., & Aïder, M. (2018). Effect of electro-activated sweet whey on growth of Bifidobacterium, Lactobacillus, and Streptococcus strains under model growth conditions. *Food Research International*, 103, 316–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.060>

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria \*.

In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>

Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E.

(2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health.

In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 29, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 393–409). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.007>

Koneman, E. W., & Allen, S. (2006). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/*

*Microbiological diagnosis: Texto y Atlas en color* (W. Winn, S. Allen, W. Janda, E.

Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger, & G. Woods (eds.); 6ta ed.).

[https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA340&dq=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&hl=es-](https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA340&dq=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjti_frp9noAhXIVN8KHRKsDecQ6AEIXTAF#v=onepage&q=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&f=false)

[419&sa=X&ved=0ahUKEwjti\\_frp9noAhXIVN8KHRKsDecQ6AEIXTAF#v=onepage&q=pseudomonas aeruginosa microbiology&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA340&dq=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjti_frp9noAhXIVN8KHRKsDecQ6AEIXTAF#v=onepage&q=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&f=false)

Koolman, J., & Klaus, H. R. (2004). *Bioquímica: texto y atlas* (Médica Panamericana).

[https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=f61Mvd-](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=f61Mvd-vl60C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioquímica+Texto+y+Atlas.+&ots=oX8-jzVG0M&sig=ZdgDHukviXIbuZhHkRvO6-vsnT8#v=onepage&q=Bioquímica+Texto+y+Atlas.&f=false)

[vl60C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioquímica+Texto+y+Atlas.+&ots=oX8-](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=f61Mvd-vl60C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioquímica+Texto+y+Atlas.+&ots=oX8-jzVG0M&sig=ZdgDHukviXIbuZhHkRvO6-vsnT8#v=onepage&q=Bioquímica+Texto+y+Atlas.&f=false)

[jzVG0M&sig=ZdgDHukviXIbuZhHkRvO6-vsnT8#v=onepage&q=Bioquímica Texto y Atlas.&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=f61Mvd-vl60C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioquímica+Texto+y+Atlas.+&ots=oX8-jzVG0M&sig=ZdgDHukviXIbuZhHkRvO6-vsnT8#v=onepage&q=Bioquímica+Texto+y+Atlas.&f=false)

Larrea, H., Flórez, M., & Huapaya, J. (2007). "EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA (Vol. 7).

Liébana, J. (2002). Microbiología oral. In S. A. U. McGRAW-HILL - INTERAMERICANA



DE ESPAÑAS (Ed.), *Microbiología Oral* (Segunda Edición).

Lindgren, S., & Dobrogosz, W. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations . *Microbiology Reviews*. [Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. \(1990\). Antagonistic activities of lactic acid bacteria](https://watermark.silverchair.com/7-1-2-149.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAArswggK3Bkgqhkig9w0BBwagggKoMIICpAIBADCCAp0GCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMS0KR368AdxWBTGFXAgEQgIICbr6UoNeY2vJH-cDCJ274AUmC3wJsPNAXvu-v-PkhV5tJjUZppml9Bs_mM0RpQqlzPG4K4dLdGvtNzlkgAfeJsR6zcOzFf8-osvEwi6ssrO_XRzWgZpE7bYfwdLFW3OznMomvQ30xIRu0ku0fCm881kZypZZQoBl38CYCUSxE7pxW8uqr0daVuEQQT3ePloq7hqOQwbTRjZ8Y-MgbkWYMRvYO24s6aLbH0HZJB0e41QamPtx3BHkhPOUJAJhabtjSsHfKR38PyfXJJTGuMOb35kk_ws7klpsKKuF-RhA_EMgnjtc48RepN-CXvshZFAuOjIWDn4axNivvsqXZjtPSVrnJ1x7sQUu_MZjVg9U8uHhgFhhSVBm0B0ZZaKhs2u1ygFaWcAm79TXgv6uaoiBj0IMao_EqQuL0KmtPrxZxpV5BLs_CXg9PRcwTyX0G4F_X6LYtAbA7IUQUQeQbQ8oPsy5bINiYMJn0fWsGJoE6m8TX90IV6fBhnBqvN0sGg7kpFWjKcugfZt-bNnj-zBfVmTL8Q0kYnOdUYiksIMw_3kniv3DMZj5CtRklspoBwH_MpcoQEmPOvojzTe1f5QavnYbAAOz5eLCoWjR0INrv5nrBWNScoFY1GRN_sXNegiC1FslqNbnw-AIM3Nc_krRjQKPJBskArsnpfhJ4hrWpM2JwwbyBzX7yYecb_it8lunsQwZewzbUkpAjY8jwr8YG5oiW9Xr-Po82C3neoqzove24DuMDLDU7h8olPjrBwE29Y9pFFUbYh15iojselJxt8zyxqWavRocxtwTTJn-pjV2njH05UiJrVRIS5jdkU</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

in food and feed fermentations. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 87).  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04885.x>

Liu, G. Y. (2009). Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. In *Pediatric Research* (Vol. 65, Issue SUPPL. 5, p. 71R). NIH Public Access.  
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819dc44d>

Lopez, M. E. (2018). *VARIABILIDAD DEL MANEJO DE GASTROENTERITIS AGUDA EN ADULTOS, POR MÉDICOS DEL SERVICIO DE EMERGENCIA DEL HOSPITAL ENRIQUE GARCÉS.* .

MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3ra ed.).  
[https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&dq=identificación+de+bacterias&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi6uZje\\_uPoAhWFdt8KHQ1TAuYQ6AEIJzAA#v=onepage&q=identificación de bacterias&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&dq=identificación+de+bacterias&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi6uZje_uPoAhWFdt8KHQ1TAuYQ6AEIJzAA#v=onepage&q=identificación de bacterias&f=false)

Manning, S. . (2010). *Escherichia Coli Infections* (World Health Organization (ed.); 2da ed.).  
<https://books.google.com.ec/books?id=abOOioRJ9uC&printsec=frontcover&dq=escherichia+coli&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjVnLb7jNfoAhUKmuAKHeCiAGYQ6AEINTAB#v=onepage&q=escherichia coli&f=false>

Martín del Campo M, C. I., Gómez H, H. E., & Alaníz de la O, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos

frescos. . *E-Gnosis*, 1–17. <https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf>

Medina, G. M. (2003). Bebidas alcohólicas. In *Nutrición y bromatología: Vol. Primera*.

Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014).

Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir.

*ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 6(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.160>

Montoro, M. (2019). *Enfermedades Gastrointestinales E Infecciones Asociadas* (1era ed.).

[https://books.google.com.ec/books?id=WI3UDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=enfermedades+gastrointestinales&hl=es-](https://books.google.com.ec/books?id=WI3UDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=enfermedades+gastrointestinales&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiGgqyEydnoAhVrk-AKHRC7AflQ6AEIKjAA#v=onepage&q=enfermedades%20gastrointestinales&f=true)

[419&sa=X&ved=0ahUKEwiGgqyEydnoAhVrk-](https://books.google.com.ec/books?id=WI3UDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=enfermedades+gastrointestinales&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiGgqyEydnoAhVrk-AKHRC7AflQ6AEIKjAA#v=onepage&q=enfermedades%20gastrointestinales&f=true)

[AKHRC7AflQ6AEIKjAA#v=onepage&q=enfermedades gastrointestinales&f=true](https://books.google.com.ec/books?id=WI3UDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=enfermedades+gastrointestinales&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiGgqyEydnoAhVrk-AKHRC7AflQ6AEIKjAA#v=onepage&q=enfermedades%20gastrointestinales&f=true)

Montville, T. J., Matthews, K. R., & Kniel, K. E. (2003). *Food microbiology : an introduction* (Tercera). ASM Press.

Motta, A. D. S., & Gomes, M. D. S. M. (2015). TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA: THE IMPORTANCE OF THESE MICROORGANISMS FOR FOOD. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(3), 172. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i3.403>

Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7179514>

Müller, L. E. (1964). *Manual de laboratorio de fisiología vegetal* (SIC. Turrialba (ed.)).

[https://books.google.com.ec/books/about/Manual\\_de\\_laboratorio\\_de\\_fisiología\\_veg.html?id=bmZXAAAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/Manual_de_laboratorio_de_fisiología_veg.html?id=bmZXAAAAMAAJ&redir_esc=y)

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2007). *Microbiología Médica* (5ta ed.).

<https://books.google.com.ec/books?id=ib7AiOFZE-0C&pg=PA7&dq=identificación+de+bacterias&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwit4Jqr1uXoAhVDc98KHei1DKg4ChDoAQg0MAI#v=onepage&q=identificación de bacterias&f=true>

NIH. (n.d.). Probiotics: What You Need To Know. 2019. Retrieved February 6, 2020, from

<https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm>

Olmos, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Procedimientos de Microbiología Clínica*.

OMS. (2015, December 3). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>

Ortega, L., Luís, A., Vilardy, S., & Saavedra, L. (2008). ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA (COLIFORMES TOTALES Y FECALES). In *Colombia* (Vol. 13, Issue 3).

Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics:

mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43–52.  
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00043-6)

Palomer R., L. (2006). Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. In *Revista Chilena de Pediatría* (Vol. 77, Issue 1, pp. 56–60). Sociedad Chilena de Pediatría.  
<https://doi.org/10.4067/s0370-41062006000100009>

Pascual, A. M., & Calderón, P. V. (2000). *Microbiología Alimentaria Metodología Analítica de Alimentos y Bebidas*. (Segunda).

Pastrana, Y. I., Durango, A. M., De Paula, C. D., & Acevedo, D. (2015). Caracterización Físicoquímica, Bromatológica y Microbiológica de Bebidas Autóctonas de Córdoba, Colombia. *Información Tecnológica*, 26. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000400008>

Pazmiño, D. (2013). Diversidad microbiana asociada a los procesos de fermentación de la chicha de arroz en la provincia de Bolívar. *Enfoque UTE*, 5(3), 1.  
<https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v5n3.40>

Pazmiño, D., Escudero, M., & Grijalva, N. (2014). Diversidad microbiana asociada a la chicha de arroz: una bebida tradicional de Bolívar - Ecuador. *Enfoque UTE*, 5(3), 1.  
<https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v5n3.40>

Pescuma, M., Hébert, E. M., Bru, E., De Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2012). Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. *Journal of Dairy Research*, 79(2), 201–208.  
<https://doi.org/10.1017/S0022029912000040>

- Pogreba-Brown, K., Austhof, E., Armstrong, A., Schaefer, K., Villa Zapata, L., McClelland, D. J., Batz, M. B., Kuecken, M., Riddle, M., Porter, C. K., & Bazaco, M. C. (2020). Chronic Gastrointestinal and Joint-Related Sequelae Associated with Common Foodborne Illnesses: A Scoping Review. In *Foodborne Pathogens and Disease* (Vol. 17, Issue 2, pp. 67–86). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2692>
- Pomasqui Benavides, J. K. (2013). Parámetros Optimos en la Fermentación Alcohólica para Industrializar la Chicha de Jora en la Procesadora de Alimentos y Bebidas Kutacachi Sara Mama. *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 172. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2576>
- Pulido, G. (2013). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS PRESENTES EN QUESO QUE SE ELABORAN Y COMERCIALIZAN EN LA PROVINCIA DE HUAROCHIRI, DEPARTAMENTO DE LIMA.*
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra . *Información Tecnológica*, 27(6), 115–128. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>
- Ramírez José, Rosas Petra, Velázquez Martha, Ulloa Armando, & Arce Francisco. (2007). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.*
- Ramon-Pardo, P., Sati, H., & Galas, M. (2018). “One health” approach in the actions to address antimicrobial resistance from a Latin American standpoint. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 103–109.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3605>

Ramos, A., Sánchez, M., & Nader, F. (2013). *Probióticos y salud*.

<https://books.google.com.ec/books?id=euuODwAAQBAJ&pg=PR8&dq=probioticos&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiatreRIOHoAhWCZd8KHQsLCTgQ6AEILzAB#v=onepage&q=probioticos&f=false>

Rivera, L. (2014). *CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS ELABORADAS EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA-ECUADOR*.

Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2001). *ENTEROPATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA*.

Rodrigues, L. C., Rocha, J., De Oliveira Janoski, A. W., Santos, A. F., & Rojas Terrazas, L. F. (2018). Análisis microbiológico de la chicha en municipio de Colcapirhua - Bochabamba / Bo. *Revista Científica de Salud UNITEPC*, 5(2), 8–15. <https://doi.org/10.36716/unitepc.v5i2.38>

Rodríguez, J., & García, P. (2017). Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. *Sociedad Química Del Perú*, 83. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2017000400004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400004)

Rodríguez, J. M. (2006). *Microorganismos y salud: Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas* (1era ed.).

<https://books.google.com.ec/books?id=3pMLXCh7FNUC&pg=PA141&dq=probioticos&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiatreRIOHoAhWCZd8KHQsLCTgQ6AEIJzAA#v=onepage&q=probioticos&f=false>

Rojas, B. (2013). *Control de Calidad y Evaluación Nutricional de las Chichas (Jora y Morada) Elaboradas en la Fundación Andinamarca Calpi - Riobamba* .

Salazar, L. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de theobroma cacao I. De la variedad "chuncho" obtenida en cuzco, Perú.*

Samadpour, M. (2001). *Molecular Typing of Pseudomonas Aeruginosa in Distribution Systems.* Mansour Samadpour.  
<https://books.google.com.ec/books?id=CsyAy9zEwq4C&pg=PA1&dq=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjs1ILuu9noAhWHnOAKHUcRBh44FBD0AQhPMAQ#v=onepage&q=pseudomonas+aeruginosa+microbiology&f=false>

Sánchez-Pérez, M., Muñoz-Mejía, C., Quiroz-Velásquez, C., Mayek-Pérez, N., & Hernández-Mendoza, J. (2010). CAMBIOS FÍSICO-QUÍMICOS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ. In *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Vol. 1).

Sánchez, J., Ortiz, M. C., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. Citric acid production from whey by fermentation using *Aspergillus* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 43–54.



- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Salud Animal*, 36. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2014000200008&script=sci\\_arttext&tIng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2014000200008&script=sci_arttext&tIng=en)
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabró, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 28, Issue 4, pp. 405–440). <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: Worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8(5–6), 311–317. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(97)00050-9)
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. In *Lancet* (Vol. 358, Issue 9276, pp. 135–138). Elsevier Limited. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Tórtora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Panamericana. <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/201603220240063025/Details>
- Toure, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., & Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria*

monocytogenes. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1058–1069.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02085.x>

Trávez, J. (2014). *Biodiversidad microbiana asociada a los procesos fermentativos de la bebida chaguarmishqui*. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL.

Vandevenne, C., & Ribes, M. (2002). *Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. uno*.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 900–912.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.900-912.2004>

Vasanthakumari, R. (2007). *Textbook of Microbiology*.  
[https://books.google.com.ec/books?id=HX\\_vyjBbAkkC&pg=PT198&dq=staphylococcus+aureus+morphology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjBmOSq2dboAhUPmeAKHRR9DOAQ6AEIJzAA#v=onepage&q=staphylococcus aureus morphology&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=HX_vyjBbAkkC&pg=PT198&dq=staphylococcus+aureus+morphology&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjBmOSq2dboAhUPmeAKHRR9DOAQ6AEIJzAA#v=onepage&q=staphylococcus aureus morphology&f=false)

Vázquez, S., Crosa, M., Rey, F., & Lopretti, M. (2009). Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2. *Innotec*, 4 ene-dic, 10–14.

Villegas Ubidia, D. A., & Alfredo, D. (2005). *Renovación de la cocina ecuatoriana mediante la cocina fusión*.

Vilnitzky, M. (2018). Por un seguro con alma humana. *Alternativas Económicas*, 57, 54.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=6393026>

Vincent Vela, M. C., Álvarez Blanco, S., & Zaragoza Carbonell, J. L. (2006). *Química industrial orgánica*. Universidad Politécnica de Valencia.

Von Klitzing, E., Ekmekci, I., Kühl, A. A., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2018).

Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* aggravates inflammatory responses in murine chronic colitis. *Scientific Reports*, 8(1), 6685. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25034-2>

Wang, Y., Xie, J., Li, Y., Dong, S., Liu, H., Chen, J., Wang, Y., Zhao, S., Zhang, Y., &

Zhang, H. (2016). Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang reduces pro-inflammatory cytokine production and hepatic inflammation in a rat model of acute liver failure. *European Journal of Nutrition*, 55(2), 821–831. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0904-3>

Ward, O. P. (1991). *Bioteología de la fermentación: principios, procesos y productos*.

Acribia.

Yildirim, Z., Winters, D. K., & Johnson, M. G. (1999). Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454.

*Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 45–54. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x>

Zuo, T., Kamm, M. A., Colombel, J. F., & Ng, S. C. (2018). Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. In *Nature Reviews*

*Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 15, Issue 7, pp. 440–452). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0003-z>