



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos.

Título del Proyecto de Investigación:

“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)
NACIONAL Y TRINITARIO, QUEVEDO, ECUADOR 2016”

Autora:

Lisbeth Estefanía Cajas Anchundia

Director de Proyecto de Investigación:

Ing. Christian Vallejo Torres M.Sc.

Quevedo-Los Ríos-Ecuador

2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **LISSETH ESTEFANÍA CAJAS ANCHUNDIA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Lisbeth Estefanía Cajas Anchundia

C.I.: 120719941-3

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. Christian Amable Vallejo Torres M.Sc., docente de la Facultad de Ciencia Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CERTIFICO: Que la señorita **Lisseth Estefanía Cajas Anchundia**, realizó el Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos titulado: **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) NACIONAL Y TRINITARIO, QUEVEDO, ECUADOR 2016”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Christian Amable Vallejo Torres M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

El suscrito, **Ing. Christian Vallejo Torres M.Sc.**, docente de la Facultad de Ciencias Pecuarias, certifica que el proyecto de investigación de la estudiante Cajas Anchundia Lisseth Estefanía, titulado: **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) NACIONAL Y TRINITARIO, QUEVEDO, ECUADOR 2016”**., fue ingresado al sistema URKUND y una vez analizado presento 3% de similitud, lo cual está considerado dentro de los parámetros aceptables que establecen el reglamento e instructivos de proyectos de investigación de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

URKUND	
Dokument	TESIS LISS URKUND.docx (D29755094)
Inskickat	2017-07-25 00:19 (-05:00)
Inskickad av	lissetheanc.cajas@uteq.edu.ec
Mottagare	cvallejo.uteq@analysis.orkund.com
Meddelande	TESIS LISSETH Visa hela meddelandet
	3% av det här c:a 14 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 3 st källor.

Ing. Christian Amable Vallejo Torres M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Título:

“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) NACIONAL Y TRINITARIO, QUEVEDO, ECUADOR 2016”,

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Gregorio Vásquez M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Orly Cevallos Falquez M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Jaime Vera Chang M.Sc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2017

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primeramente a Dios por proveerme de salud, fe y fortaleza a lo largo de mi preparación académica, por haberme permitido desarrollar y culminar este proyecto de investigación.

A mis padres Hugo Cajas y Lilian Anchundia, por ser quienes me guiaron y apoyaron en cada una de las etapas de mi vida.

A mis hermanas por ser mi inspiración y fuente de alegría.

A mi director de tesis Ing. Christian Vallejo Torres, quien supo brindarme su amistad, serenidad y conocimientos durante el desarrollo de mi investigación.

A mi estimado Ing. Jaime Vera Chang, por sus enseñanzas a lo largo de estos años y por su gran ayuda.

A la Ing. Ketty Cobeña, por ser una gran amiga y consejera en los momentos más duros de mi investigación, enseñándome que Dios es grande y que confiando en él todo es posible.

Al Dr. Orly Cevallos, por compartir conmigo sus conocimientos y mostrarse siempre dispuesto a brindarme su apoyo.

Al Ing. David Zapatier, por su gran ayuda en el laboratorio de Rumiología.

A mis amigos Israel Nieto, Angélica Romero, Félix Fajardo, Carolina Tipan y Thalía Mendoza, quienes de una u otra manera contribuyeron a la realización de este sueño.

A mi amiga y hermana del alma Diana Verdezoto, por ayudarme a vencer los obstáculos con disciplina y creer siempre en mí.

Con Amor y entrega.

Liss

DEDICATORIA

A Dios,

A mis Padres,

Hugo y Lilian;

A mis abuelos,

Francisco y Amalia;

A mis hermanas,

Dayana y Domenica;

A mi amiga,

Diana;

Al amor de mi vida,

Alejandro;

Con Amor y entrega.

Liss

RESUMEN

La producción y distribución de las bacterias ácido lácticas (BAL), se generan gracias a la producción a gran escala de alimentos fermentados utilizándolos por su habilidad de acidificación y preservación, por lo que este trabajo se dio con el fin de obtener la caracterización de las bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp*), que se encuentran en el mucílago de dos variedades de cacao (Nacional EET-103 y Trinitario CCN-51) con la finalidad de innovar, y contar con precursores de conservación, en productos alimenticios, mínimamente procesados y frescos. En esta investigación se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo bi-factorial AxB, con 16 tratamientos y 4 repeticiones. Para la determinación de la diferencia de los tratamientos se utilizó una prueba de análisis de la varianza de Tukey al 5% de probabilidad. En base al análisis estadístico se determinó que las bacterias ácido láctica (*Lactococcus spp*) aisladas del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y Trinitario (CCN-51) no presentaron susceptibilidad ante los antibióticos como oxitetraciclina, penicilina y enrofloxacina, solo la BAL extraída del cacao Trinitario presentaron cierta susceptibilidad al antibiótico enrofloxacina. El género de bacteria *Lactococcus spp* aislada tanto del mucílago de cacao tipo Nacional y Trinitario, mostraron sensibilidad al producto de limpieza y desinfección llamado FULLTREX, así mismo las BAL en estudio de las dos variedades de cacao presentaron resistencia a los otros dos productos de limpieza y desinfección llamados Yodo Total-12 y EASY-OFF. Las bacterias *Lactococcus spp* extraídas del cacao Nacional (EET-103), presentaron mayor capacidad de acidificación frente a los antibióticos en comparación a las bacterias *Lactococcus spp* extraídas del cacao Trinitario. Mientras que las bacterias extraídas de ambas variedades de cacao se comportaron igual en la capacidad de acidificación de la leche frente a diversos productos de limpieza y desinfección.

Palabras Claves: Susceptibilidad, Resistencia, Inóculo, Mucílago, Acidificación, Fermentación.

ABSTRACT

The production and distribution of lactic acid bacteria (LAB) are generated thanks to the large-scale food production used for their acidification and conservation ability, so this work was done in order to obtain lactic acid bacteria characterization (*Lactococcus spp*), which are found in the mucilage of two varieties of cacao (National EET-103 and Trinitario CCN-51) for the purpose of innovating and having preservation precursors in food products that are minimally processed and fresh. In this research a completely random design was applied with an AxB bi-factorial arrangement is applied with 16 treatments and 4 replicates. In order to determine the difference in treatments was used a Tukey variance analysis test at 5% probability. Based on the statistical analysis, it was determined that lactic acid bacteria (*Lactococcus spp*) isolated from cacao mucilage of National type (EET-103) and Trinitario (CCN-51) showed no susceptibility to antibiotics such as oxytetracycline, penicillin and enrofloxacin, only LAB extracted from the Trinitario cacao presented some susceptibility to the antibiotic enrofloxacin. The genus of *Lactococcus spp* bacteria isolated from National and Trinitario cacao mucilage showed sensitivity to the cleaning and disinfection product called FULLTREX as well as LAB in the study of the two cocoa varieties presented resistance to the other two cleaning and disinfection products called Total Iodinel-12 and EASY-OFF. *Lactococcus spp* bacteria extracted from National Cocoa (EET-103) showed a higher acidification capacity than other antibiotics compared to *Lactococcus spp* bacteria extracted from Trinitarian cacao, while the bacteria extracted from both varieties of cocoa behaved the same in the capacity of milk acidification in presence of various cleaning and disinfection products, maintaining a certain level of acidification over time.

Key Words: Susceptibility, Resistance, Inoculum, Mucilage, Acidification, Fermentation.

TABLA DE CONTENIDO.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS	II
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	III
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	IV
AGRADECIMIENTO	VI
DEDICATORIA.....	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
Introducción.....	1
CAPÍTULO I	
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos.....	5
1.3. Justificación.....	5
CAPÍTULO II	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	
2.1. Marco conceptual.....	8
2.2. Marco referencial.....	10
2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	10
2.2.2. Características generales.....	10
2.2.3. Importancia tecnológica de las BAL.....	11
2.2.4. Genero <i>Lactococcus spp.</i>	12
2.2.5. Cultivos iniciadores.....	12
2.2.6. Pruebas de sensibilidad.....	13
2.2.7. Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby).....	14
2.2.8. Bacterias en las que se recomienda realizar un antibiograma.....	15
2.2.9. Antimicrobianos	15

2.2.10.	Resistencia bacteriana.....	16
2.2.11.	Fuentes de contaminación de la leche.....	17
2.2.12.	Acción de los agentes de limpieza y de los desinfectantes	17
2.2.13.	Acción de los antibióticos	18

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	Localización.....	20
3.1.1.	Condiciones meteorológicas.	20
3.2.	Tipo de investigación.....	20
3.3.	Métodos de investigación.	21
3.4.	Fuentes de recopilación de información.	21
3.5.	Diseño de la investigación.	22
3.5.1.	Factores.....	22
3.5.2.	Característica del diseño experimental.	23
3.5.3.	Modelo matemático.	23
3.5.4.	Esquema de análisis de varianza.....	24
3.5.5.	Esquema del experimento.....	24
3.6.	Instrumentos de investigación.	25
3.6.1.	Análisis de Antibiograma por difusión en agar.	25
3.6.2.	Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos, productos de limpieza y desinfección.	28
3.7.	Tratamiento de los datos.	29
3.8.	Recursos humanos y materiales.....	29
3.8.1.	Recursos humanos.	29
3.8.2.	Materia prima.....	30
3.8.3.	Materiales.	30
3.8.4.	Equipos.	30
3.8.5.	Insumos.....	31
3.8.6.	Reactivos.....	31
3.8.7.	Materiales de oficina.....	31

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Resultados y discusión.....	33
4.1.1.	Antibiograma o análisis de susceptibilidad.....	33

4.1.2. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos, productos de limpieza y desinfección.	34
---	----

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.	38
5.2. Recomendaciones.	39

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍAS

6.1. Literatura citada.	41
------------------------------	----

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos	45
-------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Pág.
1. <i>Condiciones meteorológicas de la Finca Experimental "La María".</i>	20
2. <i>Factores en estudio del diseño experimental.</i>	23
3. <i>Característica diseño experimental.</i>	23
4. <i>Esquema del análisis de la varianza.</i>	24
5. <i>Esquema del experimento.</i>	25
6. <i>Escala de antibiograma escala (1-3).</i>	28
7. <i>Descripción de los tratamientos.</i>	29
8. <i>Valores promedios del antibiograma y capacidad acidificadora de la leche de la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ, 2017</i>	36

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo	Pág.
1. Preparación del medio de cultivo MRS, Medición del pH al medio de cultivo y llenado de las cajas Petri.	45
2. Preparación de los discos de sensibilidad.	46
3. Preparación del inóculo bacteriano.	47
4. Análisis de Antibiograma.	48
5. Fotografías de la medición de los halos de inhibición.	49
6. Preparación de la leche.	50
7. Medición del pH a la leche.	51
8. Gráfico del análisis de la capacidad de acidificación de las BAL (<i>Lactococcus spp</i>) en la leche frente a diversos antibióticos, productos de limpieza y desinfección.	52
9. Análisis de la varianza para la variable antibiograma en la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ. 2017.	53
10. Análisis de la varianza para la variable capacidad de acidificación de las BAL en la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ. 2017.	53

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Nacional y Trinitario, Quevedo, Ecuador 2016.
Autora:	Liseth Estefanía Cajas Anchundia
Palabras clave:	Susceptibilidad, Resistencia, Inóculo, Mucílago, Acidificación, Fermentación.
Editorial:	Quevedo, UTEQ, 2017
Resumen:	La producción y distribución de las bacterias ácido lácticas (BAL), se generan gracias a la producción a gran escala de alimentos fermentados utilizándolos por su habilidad de acidificación y preservación, por lo que este trabajo se dio con el fin de obtener la caracterización de las bacterias ácido lácticas (<i>Lactococcus spp</i>), que se encuentran en el mucílago de dos variedades de cacao (Nacional EET-103 y Trinitario CCN-51) con la finalidad de innovar, y contar con precursores de conservación, en productos alimenticios, mínimamente procesados y frescos. En esta investigación se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo bi-factorial AxB, con 16 tratamientos y 4 repeticiones. Para la determinación de la diferencia de los tratamientos se utilizó una prueba de análisis de la varianza de Tukey al 5% de probabilidad. En base al análisis estadístico se determinó que las bacterias ácido láctica (<i>Lactococcus spp</i>) aisladas del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y Trinitario (CCN-51) no presentaron susceptibilidad ante los antibióticos como oxitetraciclina, penicilina y enrofloxacin, solo la BAL extraída del cacao Trinitario presentaron cierta susceptibilidad al antibiótico enrofloxacin. El género de bacteria <i>Lactococcus spp</i> aislada tanto del mucílago de cacao tipo Nacional y Trinitario, mostraron sensibilidad al producto de limpieza y desinfección llamado FULLTREX, así mismo las BAL en estudio de las dos variedades de cacao presentaron resistencia a los otros dos productos de limpieza y desinfección llamados Yodo Total-12 y EASY-OFF. Las bacterias

Lactococcus spp extraídas del cacao Nacional (EET-103), presentaron mayor capacidad de acidificación frente a los antibióticos en comparación a las bacterias *Lactococcus spp* extraídas del cacao Trinitario. Mientras que las bacterias extraídas de ambas variedades de cacao se comportaron igual en la capacidad de acidificación de la leche frente a diversos productos de limpieza y desinfección.

The production and distribution of lactic acid bacteria (LAB) are generated thanks to the large-scale food production used for their acidification and conservation ability, so this work was done in order to obtain lactic acid bacteria characterization (*Lactococcus spp*), which are found in the mucilage of two varieties of cacao (National EET-103 and Trinitario CCN-51) for the purpose of innovating and having preservation precursors in food products that are minimally processed and fresh. In this research a completely random design was applied with an AxB bi-factorial arrangement is applied with 16 treatments and 4 replicates. In order to determine the difference in treatments was used a Tukey variance analysis test at 5% probability. Based on the statistical analysis, it was determined that lactic acid bacteria (*Lactococcus spp*) isolated from cacao mucilage of National type (EET-103) and Trinitario (CCN-51) showed no susceptibility to antibiotics such as oxytetracycline, penicillin and enrofloxacin, only LAB extracted from the Trinitario cacao presented some susceptibility to the antibiotic enrofloxacin. The genus of *Lactococcus spp* bacteria isolated from National and Trinitario cacao mucilage showed sensitivity to the cleaning and disinfection product called FULLTRENZ as well as LAB in the study of the two cocoa varieties presented resistance to the other two cleaning and disinfection products called Total Iodine-12 and EASY-OFF. *Lactococcus spp* bacteria extracted from National Cocoa (EET-103) showed a higher acidification capacity than other antibiotics compared to *Lactococcus spp* bacteria extracted from Trinitarian cacao, while the bacteria extracted from both varieties of cocoa behaved the same in the capacity of milk

	acidification in presence of various cleaning and disinfection products, maintaining a certain level of acidification over time.
Descripción:	70 hoja A4s: dimensiones, 21 x 29.7 cm + CD-ROM.
URL.:	(En blanco hasta cuando se dispongan los repositorios).

Introducción.

Las bacterias ácido lácticas se componen por un grupo de bacterias Gram positivas, habitualmente inmóviles, no esporuladas, con forma de cocos o bacilos. Son microorganismos fermentadores de carbohidratos con producción de ácido acético como producto principal (1). Capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5 °C y otras a temperaturas tan altas como 45 °C (2).

“Las bacterias ácido lácticas (BAL) están distribuidas extensamente en la naturaleza y presentes en la microflora de una variedad de alimentos; son bacterias que desempeñan un papel importante en diversos tipos de fermentación. En este grupo están incluidos los géneros *lactobacillus*, *streptococcus*, *enterococcus*, *pediococcus*, *leuconostoc*, *vagococcus*, *carnobacterium*, *tetragenococcus*, *weisella*, *aerococcus* y *oenococcus*. Por muchos siglos han servido para proporcionar una forma eficaz de preservación natural. Además determinan fuertemente el sabor, la textura y, con frecuencia, el valor nutricional de los productos alimenticios” (3) (2).

La producción y distribución de bacterias ácido lácticas se generan gracias a la producción a gran escala de alimentos fermentados utilizándolos por su habilidad de acidificación y preservación (4).

Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido la importancia de las (BAL) como microorganismos benéficos en los alimentos y en la salud, mejorando el tracto gastrointestinal de los seres humanos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades, por la estimulación del sistema inmunológico y por consiguiente, la producción de anticuerpos (5).

El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando los campesinos notaron que la leche coagulada bajo ciertas condiciones tenía sabor y aroma diferentes, desde entonces los campesinos fueron seleccionando el mejor sabor para inocular la leche al día siguiente (6) (4).

El mucílago de cacao es una sustancia viscosa que contiene la mazorca del cacao. Dicho mucílago es un medio rico para el desarrollo microbiano por la presencia de distintos azúcares, agua, pectina y sales minerales, ayudando a la fermentación del cacao (7).

Este trabajo de investigación se orienta hacia la caracterización de las bacterias ácido lácticas que se encuentran en el mucílago de cacao con el fin de que sean aplicadas en la industria alimenticia ecuatoriana.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En el sistema ganadero a menudo se realizan limpieza como forma de mantener la asepsia del lugar, sin embargo, los productos de limpieza y desinfección que se utilizan contienen compuestos como: productos de amonio cuaternarios, tratamientos ácidos y alcalinos entre otros. Creando biofilms considerados un serio problema para la industria alimentaria.

Además, las enfermedades del ganado lechero son tratadas con diferentes antibióticos y la detección de estos residuos es fundamental ya que sus acciones biológicas tienen efectos dañinos en la elaboración de productos fermentados, provocando grandes pérdidas en calidad, así como también económicas.

Diagnóstico.

El permanente uso de bacterias ácido lácticas en la agroindustria alimentaria ha permitido darle a los productos ciertas características como sabor, olor, textura y lo más importante su calidad nutricional.

Pronóstico.

La investigación de las bacterias ácido lácticas se desarrolla con el fin de perfeccionar diversos procesos y crear nuevos productos inocuos y seguros para el consumidor.

1.1.2. Formulación del problema.

¿Las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp* presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) posibilitará su uso en la industria alimentaria?

1.1.3. Sistematización del problema.

A partir del problema general de esta investigación, se mencionan otras interrogantes que forman parte de los factores a considerar para una solución, tendiendo así las siguientes:

- ¿Las BAL *Lactococcus spp* presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional tipo (EET-103), mostrarán mejores comportamientos frente a ciertos antibióticos, productos de limpieza y desinfección?

- ¿Las BAL *Lactococcus spp* presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) de origen Trinitario (CCN-51), mostrarán mejores comportamientos frente a ciertos antibióticos, productos de limpieza y desinfección?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

- Caracterizar bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51).

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Identificar la susceptibilidad de las bacterias *Lactococcus spp* aislada del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51) frente a diversos antibióticos.
- Medir la susceptibilidad de las bacterias *Lactococcus spp* aislada del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51) frente a diversos productos de limpieza y desinfección.
- Determinar la capacidad de acidificación de las bacterias *Lactococcus spp* aislada del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51) en presencia de antibióticos, productos de limpieza y desinfección.

1.3. Justificación.

En el Ecuador las bacterias ácido lácticas son utilizadas en la industria alimenticia, principalmente como cultivos iniciadores para la producción de diferentes subproductos derivados de la leche, carne, frutas y hortalizas, ya que estas bacterias producen cambios específicos en sus características organolépticas.

Por otro lado existe un gran desafío para los investigadores en encontrar cepas de bacterias ácido lácticas resistentes a ciertos antibióticos utilizados comúnmente en la ganadería e industria láctea, ya que hace 30 años no se encontraba resistencia a los antibióticos en las BAL, debido a que el uso de estos químicos era muy bajo y es que el excesivo uso de estos en la actualidad probablemente contribuiría a estas condiciones de resistencia por parte de los microorganismos que buscan cada vez hacerse mas inmunes para poder sobrevivir.

La siguiente investigación se enfoca a la caracterización de las bacterias ácido lácticas del género *Lactococcus spp* para medir su susceptibilidad frente a ciertos antibióticos, productos de limpieza y desinfección más utilizados en la industria ganadera, para el posible uso de estas BAL en la industria alimenticia ecuatoriana con la finalidad de innovar, y contar con precursores de conservación, en productos alimenticios, mínimamente procesados y frescos.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

Mucílago.

El mucílago de cacao es una sustancia viscosa, generalmente hialina, que contiene la mazorca del cacao. Dicho mucílago es un medio rico para el desarrollo microbiano por la presencia de distintos azúcares, agua, pectina y sales minerales, ayudando a la fermentación del cacao y donde las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico, ácido acético y manitol. Gran parte del mucílago escapa en forma de exudado (7).

Bacterias ácido lácticas.

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son microorganismos que poseen diversas aplicaciones utilizándose de forma empírica desde hace varios siglos en la fermentación de alimentos como leche, vegetales, productos cárnicos y panadería (8).

Susceptibilidad de bacterias.

La susceptibilidad es la falta de resistencia de las bacterias hacia ciertos antibióticos utilizados para inhibir o eliminar su crecimiento.

Caracterizar.

La caracterización se basa en establecer las cualidades o atributos de algo o alguien de tal forma que se pueda diferenciar de los demás (9).

Antibiótico.

Proveniente de una sustancia química la cual es capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida (9).

Producto de limpieza y desinfección.

Los productos de limpieza y desinfección son aquellos que atreves de sus componentes químicos sirven para el lavado y esterilizado de superficies e utensilios tanto de hogares, empresas e industrias de procesamiento, de esta ultima se necesita una mayor asepsia para la elaboración de productos alimenticios.

Industria Agroalimentaria.

Es aquella que se ha convertido en un eslabón fundamental en la transformación de los alimentos, llevándolos desde el campo a las industrias y al consumidor (10).

Cepas.

Es en microbiología, población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica (11).

Fermentaciones Lácticas.

Es la producción de sabor, aroma y textura de los lácteos mediante la fermentación de la glucosa derivada de la hidrólisis de la lactosa y la fermentación del ácido cítrico que está en una proporción del 0.2 % en la leche.

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las bacterias ácido lácticas fueron descubiertas por el profesor Louis Pasteur en el año de 1857 tras realizar investigaciones del por qué se descomponía y acidificaba el vino, lo cual lo llevo a que esto sucedía por el ácido láctico, producto de la fermentación de ciertos microorganismos. El término “*Bacterium acidi*” se debe a Welgmann que lo propuso para definir las como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche (12).

Este tipo de bacterias han sido utilizadas desde el comienzo de la humanidad y desde entonces han sido usadas en la fabricación y conservación de una variedad de alimentos además de proveerles a desarrollar aroma y sabor. La aplicación de las BAL no implica un riesgo para la salud al contrario ayudan a la salud del consumidor (13).

Las BAL tienen en común la elaboración de ácido láctico como producto primordial mayoritario del catabolismo de los azúcares, son microorganismos Gran Positivos. Debido a su limitada capacidad biosintética, son muy exigentes nutricionalmente por lo que requieren para su crecimiento aminoácidos, purinas, vitaminas y pirimidinas (14).

“Este grupo comprende bacterias de los géneros *lactococcus*, *vagococcus*, *leuconostoc*, *pediococcus*, *aerococcus*, *tetragenococcus*, *streptococcus*, *enterococcus*, *lactobacillus*, *weissella* y *carnobacterium*. Aunque filogenéticamente alejados de las BAL, otros tipos de bacterias como son los géneros *micrococcus*, *brevibacterium*, *propionibacterium* y *bifidobacterium* también participan en la elaboración de alimentos fermentados. Por sus propiedades están estos microorganismos entre “seguros” o GRAS (Generally Recognized As Safe), lo que implica que pueden utilizarse para la elaboración de productos alimentarios” (13).

2.2.2. Características generales.

La clasificación de las bacterias ácido lácticas se basa en la morfológica, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (15).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gran positivos generalmente inmóviles no esporulados de catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente mediante la fermentación de los azúcares produciendo ácido láctico como producto único de su metabolismo, no poseen de sistema de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y consiguen su energía por fosforilación a nivel de sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tiene un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (16).

Casi todas las BAL son mesofilicas, sin embargo algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5 °C y otras a 45 °C. Tolerando bien concentraciones muy altas de ácidos y valores de pH más bajos que otro tipo de bacterias, por lo que pueden desplazarse del hábitat que colonizan (17).

El hábitat de estos microorganismos son muy variados pudiéndoles encontrar en:

- Flora normal de la superficie de materia vegetal (frutas y verduras).
- Alimentos fermentados y ricos en azúcares.
- Leche y derivados.
- Cárnicos.
- Mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, tracto naso-faríngeo, gastrointestinal y vagina.

2.2.3. Importancia tecnológica de las BAL.

Las BAL son utilizadas en la elaboración y conservación de alimentos, a pesar de su importancia económica, no fueron el principal tema de investigación de los microbiólogos ni del sector industrial. A pesar de esto hace algún tiempo se han convertido en un sujeto de estudio privilegiado en el mundo. Le han sido dedicados total o en parte algunas obras, como también revisiones de temas específicos de su campo. La constante evolución de la industria alimentaria y en particular la utilización de nuevas materias primas han creado la necesidad de crear productos nuevos lo que explica el interés hacia este grupo de bacterias (18).

2.2.4. Genero *Lactococcus* spp.

El género *Lactococcus* spp es un tipo de bacteria ácido láctica, es la mayor especie de cinco incluidas como miembros del grupo N del género *Streptococcus* y especies relacionadas. Estas tienen una forma típicamente esférica u ovoide, de 0.5 a 1.2 μm por 0.5 a 1.5 μm , y se agrupan en pares o en cadenas cortas. Este tipo de bacterias no forman esporas y no poseen movimiento. Los *Lactococcus* son hasta ahora únicamente utilizados en la leche (19).

2.2.5. Cultivos iniciadores.

La aplicación científica de los cultivos bacterianos iniciadores tiene aproximadamente un siglo. La industria láctea empezó con el uso de estos y aún se mantiene a la vanguardia en la tecnología de cultivos iniciadores. Los progresos logrados en este campo han permitido sustituir procesos fortuitos o espontáneos de fermentación de alimentos por el uso de cultivos iniciadores y esto puede observarse en la tecnología de carnes, producción de pastas o masas ácidas, elaboración de vinos y fermentación de jugos y vegetales (20).

Sin embargo, aun algunos procesos de importancia en la industria alimentaria se efectúan por fermentación espontánea, por ejemplo en la producción de vinagre, fermentación de encurtidos, etcétera.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos importantes en la preparación de cultivos iniciadores aplicados en la industria alimentaria, estudios más recientes permiten tener un mejor conocimiento sobre la fisiología, genética y ecología de estos microorganismos. Los cultivos iniciadores son preparaciones que contienen microorganismos vivos y que se aplican con la intención de aprovechar su metabolismo. La mayor parte de los cultivos iniciadores se usan en la producción de alimentos ya que este tipo de alimentos fermentados son aceptados por sus características y propiedades como seguridad higiénica y vida de anaquel (20).

Actualmente los cultivos iniciadores tienen acceso a nuevos campos de aplicación como:

- Terapia de humanos, animales y plantas
- Protección de plantas

- Tratamiento de aguas residuales
- Tratamiento de suelos

Las bacterias presentan mayor eficiencia y multiplicidad que las levaduras y los hongos. De alto grado de crecimiento y metabolismo de lo cual resulta una rápida conservación de sustratos, lo que produce una amplia variación en la calidad sensorial. Además de ser activas dentro de un amplio intervalo de temperatura y condiciones de óxido-reducción, lo cual capacita a las bacterias para realizar procesos no solo en condiciones de crecimiento termofílico, mesofílico y psicofílico, sino también a desarrollarse en la superficie de sustrato y en partes donde el oxígeno es deficiente, es decir, son facultativas (20).

2.2.6.Pruebas de sensibilidad.

Este tipo de pruebas antimicrobianas se utilizan a nivel de laboratorio para medir la susceptibilidad o resistencia de ciertos microorganismos para controlar las contaminaciones en los procesos alimenticios.

La razón fundamental de una prueba de sensibilidad es la de realizar una predicción a través de una siembra microbiológica de la bacteria en estudio en difusión de agar, para observar la respuesta de la misma frente a diversos antibióticos y productos de limpieza, y desinfección, evaluando el diámetro de los halos de inhibición.

Para efectuar las pruebas de sensibilidad, se cuenta con los siguientes métodos (21).

- a) Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)
- b) Dilución en agar
- c) Macrodilución en caldo
- d) Microdilución en caldo
- e) Epsilon test (E test)
- f) Métodos automatizados
- g) Pruebas especiales.

2.2.7. Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)

El método de difusión en agar, es de tipo cualitativo y sus resultados se pueden explicar únicamente con condiciones de sensible, intermedio y resistente, perfilada para bacterias de crecimiento rápido (22).

El inóculo que se utiliza en dicha técnica debe ser llevado a una concentración igual al del estándar 0.5 de McFarlane, la cual se debe aplicar sobre la superficie de la caja de Petri contenida de agar Mueller-Hinton, el cual debe contener un pH entre 7.2 y 7.4 medido a temperatura ambiente antes de esterilizar. La siembra de la bacteria se debe hacer en forma de rayado sobre la superficie del medio solidificado de tal manera que se logre un crecimiento uniforme y mayoritario. Después de unos 15 min como máximo de la siembra se procede a colocar los discos (23).

Luego las cajas sembradas se incuban dependiendo del tipo de microorganismo sea de manera aerobia o anaerobia por el periodo de tiempo incubación determinado para cada bacteria. Para la lectura de los halos se debe considerar el diámetro de este en el caso de observarse 0 mm, se debe reportar el diámetro del disco solamente (23).

Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en guías publicadas cada cierto tiempo, por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), así el microorganismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico utilizado en la investigación (24) (23).

“Cada antibiótico tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula del antibiótico y su polaridad; de esta manera, un antibiótico con un peso molecular bajo como la penicilina, tendrá mucha capacidad para migrar, por lo tanto su halo, en el caso de una cepa sensible tendrá un diámetro muy amplio. En el caso de la vancomicina, que tiene una molécula muy grande y muy hidrofóbica, su halo de inhibición será muy pequeño. De esta manera, no se puede afirmar, que para una cepa determinada, ésta es más sensible a la penicilina que a la vancomicina, sólo porque el primero tenga un halo de inhibición mucho mayor” (22).

2.2.8. Bacterias en las que se recomienda realizar un antibiograma.

- Para realizar un antibiograma, debe trabajarse con cepas puras (aisladas) e identificadas apropiadamente.
- Este tipo de análisis debe ejecutarse con cepas bacterianas que se hallen en la fase de crecimiento exponencial.
- Las bacterias que se deben utilizar deben corresponder a ser anaeróbicas o anaeróbico – facultativas.
- Asimismo estas cepas debe ser de crecimiento rápido y aislamiento sencillo, salvo algunas excepciones.
- Durante todo el análisis debe ejecutarse un estricto control de calidad interno.

2.2.9. Antimicrobianos

Los antimicrobianos son moléculas naturales, sintéticas o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. En la actualidad ya no se utilizan moléculas de origen natural, por lo cual no se establece más la diferenciación con quimioterápicos, termino usado para referirse a las moléculas de origen sintético y sus derivados.

Antibióticos:

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos (25).

Los antibióticos se clasifican en:

- Naturales: se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, etc.).

- Sintéticos: se obtienen totalmente por síntesis química.
- Semisintéticos: se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.

2.2.10. Resistencia bacteriana.

Se puede definir la resistencia bacteriana como la disminución de la sensibilidad de un germen a la acción nociva de un agente quimioterápico determinado. En un principio se creía que la resistencia se debía a una modificación en la bacteria, posterior al contacto con un determinado antibiótico, algo así como en la reacción alérgica en que los síntomas se presentan recién cuando el sujeto sufre una segunda exposición al alérgeno. Hoy se sabe que hay muchos mecanismos en juego, pero el más importante, es la modificación de la información genética de las bacterias. Esto puede llevar a que algunas pierdan la pared celular y se transformen en resistentes a antibióticos que destruyen la pared; otras, modifican su metabolismo o su síntesis proteica al alterar sus sistemas enzimáticos, lo que anula la acción del antibiótico; o producen enzimas que alteran la molécula antibiótica como es el caso de las betalactamasas (25).

Resistencia natural

La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico. Algunos ejemplos de esto podemos mencionar a la resistencia que presenta *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas por un proceso natural de expulsión del antibiótico y a la colistina, debido a la presencia de un lipopolisacárido que disminuye la afinidad de los antibióticos polipeptídicos a su sitio blanco; *Klebsiella pneumoniae* que por su producción natural de betalactamasas es resistente a las penicilinas (ampicilina y amoxicilina) y también podemos mencionar a los bacilos Gram negativos aeróbios resistentes a la clindamicina debido a que no cuentan con un sitio blanco para este antibiótico. (25)

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos. En

referencia a la mutación de un gen implicado en el mecanismo de acción de un antibiótico, podemos mencionar el ejemplo de la resistencia a las quinolonas por modificación de la DNA girasa en las enterobacterias, o las mutaciones generadas en los genes que codifican a las porinas que trae como consecuencia el bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo (25).

2.2.11. Fuentes de contaminación de la leche

La calidad de la leche puede determinarse por la existencia de diversos tipos de contaminantes. Estos se pueden dividir en dos grupos:

Contaminantes químicos

Los que más frecuentemente son posibles de hallar en la leche derivan del medio que rodean a la leche en el camino desde la ordeña a su proceso industrial. Es posible encontrar insecticidas (DDT, aldrin, dieldrin, heptacloruro fenol), herbicidas, fungicidas, sustancias higienizantes (cloro, feroxido de hidrogeno, sustancias amoniacaes, etc.) y algunos antibióticos (penicilinas, estreptomicinas, clorotetraciclinos, etc.) (26).

Contaminantes biológicos

Existe la posibilidad de que la leche se encuentre afectada de un gran número de agentes microbianos desde el momento de su producción, dependiendo en gran medida de las prácticas de higiene y sanidad observadas en el manipuleo durante la producción, transporte, proceso y venta (26).

2.2.12. Acción de los agentes de limpieza y de los desinfectantes

Los agentes de limpieza que llegan a la leche como contaminantes, afectan el desarrollo microbiano. Los productos más usados en la industria láctea son la soda cáustica y el fosfato trisódico, ácido fosfórico y ácido nítrico.

Los desinfectantes en cambio son bactericidas, matan los microorganismos. Los más utilizados en la industria y en los tambos son los productos a base de iodo o cloro (iodados o clorados). Es muy importante lavar y desinfectar bien todos los equipos y utensilios de la planta que están en contacto con la leche pero luego, debido a que su acción es tan fuerte,

se debe tener la precaución de enjuagar con abundante agua limpia, para quitar todos los restos de los mismos, evitando así que entren en contacto con la leche (26).

2.2.13. Acción de los antibióticos

Los antibióticos son remedios que se utilizan para curar al hombre y a los animales de las enfermedades infecciosas; actúan matando los microorganismos; para cada tipo de microorganismo hay un antibiótico específico. Los microorganismos lácticos, son muy sensibles a los antibióticos y ante la presencia de éstos en general mueren. Esto es lo que ocurre en las leches de vacas mastíticas (que son tratadas con antibióticos), a punto tal que una pequeña cantidad de leche mastítica puede dificultar la elaboración y dañar el producto final. Por ello, cuando se trata una vaca con antibióticos, es importante dejar pasar 3 a 5 días antes de utilizar la producción de ese animal para la elaboración, de este modo hay seguridad de que se eliminaron la mayoría de restos del medicamento (26).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Rumiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Finca Experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el Km 7.5 vía Quevedo – El Empalme, entrada al cantón Mocache, Provincia de Los Ríos. La ubicación geográfica es de 01° 05' 20" de latitud sur y 79° 27' 21" de latitud oeste y a una altura de 110 metros sobre el nivel del mar.

3.1.1. Condiciones meteorológicas.

La Finca Experimental “La María” presenta las siguientes condiciones meteorológicas y otras características especificadas en la Tabla 1.

Tabla 1. *Condiciones meteorológicas de la Finca Experimental "La María".*

Datos meteorológicos	Valores promedio
Humedad Relativa (%)	85.84
Temperatura (°C)	25.47
Precipitación (mm/anual)	2223.85
Heliofanía (horas luz/año)	898.66
Zona ecológica	Bosque semi húmedo tropical

Fuente: Estación Meteorológicas del INAMHI ubicada en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP (27)

Elaborado por: Autora

3.2. Tipo de investigación.

El tipo de investigación aplicado para este trabajo es de carácter cuantitativo, ya que se determinó las condiciones de susceptibilidad bacteriana a ciertos antibióticos, productos de limpieza y desinfección, lo que nos revela que la bacteria identificada es sensible, intermedia o resistente a determinados compuestos.

La investigación a la vez es de carácter cualitativo porque a través de los resultados obtenidos se realizó un análisis visual para determinar el diámetro del halo encontrado en el análisis microbiológico.

La investigación es descriptiva – experimental porque se enfocó en determinar los métodos más adecuados que ayudarán a resolver la problemática de la investigación.

También es una investigación de tipo experimental por que se efectuaron los análisis respectivos en el laboratorio de rumiología en el área de microbiología pertinente con la finalidad de obtener resultados que den respuesta a los objetivos planteados.

Además, para la siguiente investigación se utilizó un diseño experimental, en el cual se comprobaron los efectos de los distintos tratamientos a utilizar para determinar la cepa de BAL (*Lactococcus spp*) más resistente a los antibióticos, productos de limpieza y desinfección establecidos.

3.3. Métodos de investigación.

Se utilizaron los siguientes métodos para la investigación:

Método inductivo – deductivo.

La aplicación de este tipo de investigación, ayudó a encontrar una solución al problema que se planteó, disponiendo de tecnologías adecuadas para la caracterización de las bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51).

Métodos estadísticos.

Con la ayuda de un software libre, se cuantificó, se tabuló y ordenó los datos que se obtuvieron mediante análisis, los mismos que permitieron interpretar los resultados obtenidos.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

En la presente investigación de caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51), se utilizó las siguientes fuentes:

Fuentes primarias.

- Pre-ensayo.
- Trabajo de campo.

Fuentes secundarias.

- Libros.
- Artículos científicos.
- Revisión bibliográfica
- Sitios web.
- Tesis.
- Páginas web.

3.5. Diseño de la investigación.

El estudio se realizó con un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo bifactorial AxB, con dos factores de estudio, factor A: bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp*) extraídas del mucilago de cacao (Nacional y Trinitario) y factor B: aplicación de antibióticos, productos de limpieza y desinfección (sin antibiótico, antibiótico oxitetraciclina, antibiótico penicilina, antibiótico enrofloxacina, sin producto de limpieza y desinfección, producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12, producto de limpieza y desinfección FULLTREX y producto de limpieza y desinfección EASY-OFF), resultando 16 tratamientos y 4 repeticiones. Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5.1. Factores.

El planteamiento de los factores y niveles en estudio de la presente investigación se redacta en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores en estudio del diseño experimental.

Factores	Código	Niveles
Factor A (B.A.L extraídas del mucilago de cacao Nacional y Trinitario)	a ₁	BAL EET-103
	a ₂	BAL CCN-51
	b ₁	Sin antibiótico
	b ₂	Antibiótico oxitetraciclina
Factor B Antibióticos, productos de limpieza y desinfección (Sin antibiótico, antibiótico oxitetraciclina, antibiótico penicilina, antibiótico enrofloxacina, sin producto de limpieza y desinfección, producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12, producto de limpieza y desinfección FULLTREX y producto de limpieza y desinfección EASY-OFF)	b ₃	Antibiótico penicilina
	b ₄	Antibiótico enrofloxacina
	b ₅	Sin producto de limpieza y desinfección
	b ₆	Producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12
	b ₇	Producto de limpieza y desinfección FULLTREX
	b ₈	Producto de limpieza y desinfección EASY-OFF

Elaborado por: Autora

3.5.2. Característica del diseño experimental.

Para llevar a cabo esta investigación se realizó lo siguiente especificado en la Tabla 3.

Tabla 3. Característica diseño experimental.

Numero de tratamientos :	16
Numero de repeticiones :	4
Unidades experimentales :	64

Elaborado por: Autora

3.5.3. Modelo matemático.

Las fuentes de variación para este ensayo se elaboraron con un modelo de experimentación simple cuyo esquema es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + A*\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

y_{ijk} = El total de una observación.

μ = Valor de la media general de la población.

A_i = Efecto “i-esimo” del factor A.

β_j = Efecto “j-esimo” del factor B.

$A*\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción del factor A por el factor B.

ϵ_{ijk} = Efecto del error experimental.

3.5.4. Esquema de análisis de varianza.

En la siguiente Tabla 4, se muestra el esquema del análisis de la varianza.

Tabla 4. *Esquema del análisis de la varianza.*

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	
Tratamiento	$(a * b - 1)$	15
Factor A	$(a - 1)$	1
Factor B	$(b - 1)$	7
Interacción A*B	$(a - 1) (b - 1)$	7
Error experimental	$(a * b) (r - 1)$	48
Total	$a * b * r - 1$	63

Elaborado por: Autora

3.5.5. Esquema del experimento.

A continuación, se plantea el esquema del experimento con los tratamientos, réplicas y unidades experimentales, se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Esquema del experimento.

Tratamientos	Códigos	Replicas	Unidades experimentales	Subtotal
T ₁	a ₁ b ₁	4	1	4
T ₂	a ₁ b ₂	4	1	4
T ₃	a ₁ b ₃	4	1	4
T ₄	a ₁ b ₄	4	1	4
T ₅	a ₂ b ₁	4	1	4
T ₆	a ₂ b ₂	4	1	4
T ₇	a ₂ b ₃	4	1	4
T ₈	a ₂ b ₄	4	1	4
T ₉	a ₁ b ₅	4	1	4
T ₁₀	a ₁ b ₆	4	1	4
T ₁₁	a ₁ b ₇	4	1	4
T ₁₂	a ₁ b ₈	4	1	4
T ₁₃	a ₂ b ₅	4	1	4
T ₁₄	a ₂ b ₆	4	1	4
T ₁₅	a ₂ b ₇	4	1	4
T ₁₆	a ₂ b ₈	4	1	4
Total				64

Elaborado por: Autora.

3.6. Instrumentos de investigación.

En la caracterización de bacterias ácido lácticas se realizó las siguientes mediciones:

3.6.1. Análisis de Antibiograma por difusión en agar.

Se utilizó el método de difusión en agar con algunas modificaciones para medir la susceptibilidad o resistencia microbiana en disco de la bacteria ácido láctica *Lactococcus spp* frente a diversos tratamientos antimicrobianos (antibióticos, productos de limpieza y desinfección).

3.6.1.1. Preparación del medio de cultivo MRS.

Para su preparación se agregó 70 g del medio MRS (Man Rogosa y Sharpe) en 1 L de agua destilada, mezclándose con un agitador magnético sobre una plancha de calentamiento hasta que llegue a punto de ebullición durante un lapso de 15 a 20 min, verificándose con una prueba de solidificación si el medio está listo para esterilizar en el autoclave durante 30 min a 121 °C.

Realizado el proceso de esterilización se debe retirar del autoclave el medio y atemperar dentro de la cabina de flujo a 50 °C, posteriormente se debe colocar el medio de cultivo en las cajas Petri, aproximadamente 25 mL por caja y dejar que se solidifique a temperatura ambiente por 5 horas.

3.6.1.2. Preparación de discos

Los discos para el antibiograma fueron realizados con papel filtro con una medida de 6 mm, los cuales se esterilizaron dentro del autoclave en cajas Petri por 30 min a 1 ¼ atmosfera y luego se secaron dentro de la cabina de seguridad previamente con luz UV.

Una vez secos, se colocaron en orden sobre otras cajas Petri esterilizadas en la cual se les vertió el antibiótico, producto de limpieza y desinfección respectivo (sin antibiótico 0 µg/mL, antibiótico oxitetraciclina 30 µg/mL, antibiótico penicilina 10 µg/mL, antibiótico enrofloxacin 5 µg/mL, sin producto de limpieza y desinfección 0 µg/mL, producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12 15 mg/L, producto de limpieza y desinfección FULLTREX 50 mg/L y producto de limpieza y desinfección EASY-OFF 10 mg/L). De esta forma luego de una hora se retiraron los discos de las cajas Petri quitándoles el exceso de humedad y traspasándolos a otra caja Petri estéril, dejándolos secar dentro de la cámara de seguridad por un día.

La conservación de los discos es crítica ya que de ella depende la confiabilidad de los resultados. Se debe, por lo tanto, tener particular cuidado al respecto siguiendo las indicaciones siguientes: Los recipientes individuales que contienen los discos deben mantenerse refrigerados de 4 - 5 °C o almacenados a -20 °C hasta que sean utilizados (28).

3.6.1.3. Preparación del inóculo bacteriano

Cada cepa en estudio se suspendió 20 UFC en agua de peptona estéril en tubos de ensayos ajustándose a una concentración de 0.5 de la escala de McFarland. Con esta concentración se logró un crecimiento semiconfluyente necesario para llevar a cabo un antibiograma. El inóculo se utilizó enseguida para evitar una disminución de la viabilidad de las bacterias en estudio.

3.6.1.4. Inoculación de las placas de agar

Con una micropipeta se tomó 500 cc del inóculo del tubo de ensayo y se sembró en la caja Petri esparciéndolo con un asa de cayado para siembra.

Se inoculó la superficie del agar, rotando la caja Petri 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo, de esta forma se obtienen zonas de inhibición uniformemente circulares.

Las cajas se dejan abiertas dentro de la cabina de seguridad por 2 minutos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido por el medio de cultivo.

3.6.1.5. Colocación de los discos con antibióticos, productos de limpieza y desinfección.

Los discos con la carga de antibióticos y productos de limpieza fueron aplicados dentro de la fase de inoculación. Donde se utilizó tres discos por caja Petri en posición triangular.

Los discos a utilizarse se tomaron con pinzas estériles y una vez ubicados sobre el medio de cultivo se ejerció una ligera presión con la finalidad de evitar que se muevan o se desprendan.

3.6.1.6. Incubación de las cajas.

Las cajas inoculadas y con los discos ya aplicados se incubaron invertidas a 37 °C por el término de 48 horas. La incubación de las cajas debe de ser 15 min después de la colocación de los discos.

3.6.1.7. Lectura de los halos de inhibición e interpretación de los resultados.

Después de 48 horas de incubación cada caja Petri fue examinada visualmente, donde se midió con una regla el diámetro de las zonas de inhibición (no se observó crecimiento), incluyendo el disco.

Se consideró 3 condiciones de interpretación:

Sensible (S): esta categoría implica que el género de bacteria ácido láctica en estudio es susceptible a ciertos antibióticos o productos de limpieza y desinfección por tal motivo las BAL son imposibilitadas de seguir con su crecimiento poblacional.

Intermedia (I): esta categoría incluye cepas cuya Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a un determinado antibiótico puede ser alcanzada en los tejidos de la BAL. Esta categoría sugiere que en mayores concentraciones de antibióticos o productos de limpieza y desinfección la bacteria se inhibe (28).

Resistente (R): las cepas resistentes no son inhibidas por las dosis de antibióticos, productos de limpieza y desinfección habitual de uso, a continuación se muestra la escala de evaluación del antibiograma como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 6. *Escala de antibiograma (1:3), para la categorización (resistente, intermedio y sensible) de la susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.**

Valor escalar	Categoría	Ponderación
1	Resistente	≤ 11 mm
2	Intermedio	12 – 15 mm
3	Sensible	≥ 16

Elaborado por: Autora.

3.6.1.8. Análisis de los resultados

Los valores de los diámetros fueron expresados en mm para cada tratamiento, se calculó el valor dependiendo de la escala de la tabla 6 y se los analizó a través de un software libre.

3.6.2. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos, productos de limpieza y desinfección.

Para esta medición se tomó 150 mL de leche descremada UHT “Mi Ranchito”, donde se diluyo 20 UFC de BAL (*Lactococcus spp.*) en 1 mL de agua destilada estéril, esta disolución se le agrego a la leche y por último se adicionó los antibióticos, productos de limpieza y desinfección respectivamente, se incubaron 37 °C y se midió el descenso del pH durante 0 y 8 horas.

pH.

Se lo determino por el método potenciométrico, con un equipo multiparametrico HANNA HI9280, (INEN, 381: 1985-12), colocando 50 mL de la muestra en un vaso de precipitación, sumergiendo el electrodo del equipo multiparametrico en la muestra y

esperando que los datos sean digitalizados en la pantalla del equipo hasta que se estabilicen.

3.7. Tratamiento de los datos.

De la combinación de los factores y niveles mencionados en la Tabla 2 se obtuvieron los siguientes tratamientos descritos en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Descripción
T ₁	BAL extraída del EET-103 sin antibiótico
T ₂	BAL extraída del EET-103 con antibiótico Oxitetraciclina
T ₃	BAL extraída del EET-103 con antibiótico Penicilina
T ₄	BAL extraída del EET-103 con antibiótico Enrofloxacina
T ₅	BAL extraída del CCN-51 sin antibiótico
T ₆	BAL extraída del CCN-51 con antibiótico Oxitetraciclina
T ₇	BAL extraída del CCN-51 con antibiótico Penicilina
T ₈	BAL extraída del CCN-51 con antibiótico Enrofloxacina
T ₉	BAL extraída del EET-103 sin producto de limpieza y desinfección
T ₁₀	BAL extraída del EET-103 con producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12
T ₁₁	BAL extraída del EET-103 con producto de limpieza y desinfección FULLTREX
T ₁₂	BAL extraída del EET-103 con producto de limpieza y desinfección EASY-OFF
T ₁₃	BAL extraída del CCN-51 sin producto de limpieza y desinfección
T ₁₄	BAL extraída del CCN-51 con producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12
T ₁₅	BAL extraída del CCN-51 con producto de limpieza y desinfección FULLTREX
T ₁₆	BAL extraída del CCN-51 con producto de limpieza y desinfección EASY-OFF

Elaborado por: Autora

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

El recurso humano que contribuyó para la realización del presente proyecto de investigación se nombra a continuación:

- Director del proyecto de investigación Ing. Christian Vallejo Torres M.Sc.

- Autora del proyecto de investigación Srta. Lisseth Estefanía Cajas Anchundia.

3.8.2. Materia prima.

- BAL (*Lactococcus spp*) aisladas del mucílago de cacao Nacional (EET-103).
- BAL (*Lactococcus spp*) aisladas del mucílago de cacao Trinitario (CCN-51).

3.8.3. Materiales.

- Cajas Petri.
- Tubos de ensayo
- Micro pipeta.
- Vasos de precipitación.
- Papel aluminio.
- Algodón.
- Gasa.
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 5000 mL.
- Escalimetro o regla.
- Guantes de látex.
- Mascarillas.
- Cofias.

3.8.4. Equipos.

- Ph metro.
- Incubadora.
- Contador de colonias.
- Cabina de seguridad.
- Agitador eléctrico.

- Autoclave.
- Plancha de calentamiento.

3.8.5. Insumos.

- Leche pasteurizada descremada UHT.
- Agua destilada.
- Productos de limpieza (FULLTREX, EASY-OFF y Yodo Total-12)
- Antibióticos (oxitetraciclina, penicilina y enrofloxacina)
- Cloro.
- Alcohol.

3.8.6. Reactivos.

- Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe).
- Peptona.

3.8.7. Materiales de oficina.

- Lapiceros.
- Lápiz.
- Marcadores.
- Computadora.
- Calculadora.
- Impresora.
- Hojas.
- Pen drive.
- Carpetas.
- Teléfono celular.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Antibiógrama o análisis de susceptibilidad.

a) Efecto principal del factor A (variedades de cacao).

De acuerdo al ADEVA realizado (Tabla 8), en la variable antibiógrama, se observa que existió diferencia estadística, donde las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp* extraídas del mucílago de cacao Nacional presentan mayor resistencia según la escala (Tabla 6) que las BAL *Lactococcus spp* extraídas del mucílago de cacao Trinitario, con una media de 1.29 para este factor.

b) Efecto principal del factor B (antibióticos, productos de limpieza y desinfección).

En base al análisis de la varianza (Tabla 8), en la variable antibiógrama, se observa que existió diferencia estadística entre los antibióticos, productos de limpieza y desinfección. Encontrándose que el producto de limpieza y desinfección FULLTREX provoca mayor inhibición hacia las bacterias en estudio, mientras que los demás antibióticos y productos utilizados muestran poca inhibición hacia las bacterias según la escala (Tabla 6), presentando una media de 1.29.

c) Interacción entre tratamientos.

Según la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad (Tabla 8), en la variable antibiógrama, se puede observar que existió diferencia estadística entre los tratamientos, siendo así que para el T₁₁ (BAL extraída del cacao Nacional con producto de limpieza y desinfección FULLTREX) y T₁₅ (BAL extraída del cacao Trinitario con producto de limpieza y desinfección FULLTREX) se produjo mayor inhibición, dando como resultado que los *Lactococcus spp* presentaron sensibilidad a dicho producto. Por otro lado en el T₈ (BAL extraída del CCN-51 con antibiótico enrofloxacina) se observa poca inhibición, dando como resultado que los *Lactococcus spp* presentaron poca resistencia y para el resto de tratamientos no se observa inhibición alguna dando como resultado que los *Lactococcus spp* presentaron resistencia. Según la comparación de los datos con la escala de la Tabla 6, presentando una media de 1.29 para esta interacción y con un coeficiente de variación de 9.64 en los resultados generales.

En comparación a un estudio realizado por Alvarado et al. (29), quien expone que ciertas bacterias son susceptibles o sensibles a ciertos productos que posean elementos de amonio cuaternarios, sustancias alcalinas entre otros. Siendo esto similar a los resultados encontrados en la presente investigación.

Con lo que respecta al antibiótico Enrofloxacin en comparación con lo descrito por Valero-Leal et al. (30), en su publicación científica, donde expresa que 3 de 35 cepas investigadas presentan resistencia y las demás presentaron cierta susceptibilidad al antibiótico enrofloxacin con lo que concuerda en cierta forma a la investigación.

Asimismo Valero-Leal et al. (30), explica en su investigación que el mayor porcentaje de resistencia se presentó frente a la penicilina con un 12.4 % y 1.2 % frente a la oxitetraciclina lo que concuerda en el ensayo de esta investigación.

Además, Alvarado et al. (29), menciona en su publicación científica, que las cepas aisladas que utilizó en su experimento fueron tolerables a ciertas concentraciones de productos de limpieza, lo que se halla de acuerdo a la presente investigación donde se mostró de igual manera que las BAL (*Lactococcus spp*) presentan resistencia a los productos de limpieza y desinfección con componentes de yodo e hidróxido de sodio (Yodo total-12 y EASY-OFF respectivamente) utilizados en el ensayo.

4.1.2. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos, productos de limpieza y desinfección.

a) Efecto principal del factor A (variedades de cacao).

En base al análisis de la varianza (Tabla 8), para la variable pH, se puede observar que existió significancia entre el origen de extracción de las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp*. Donde las BAL en estudio extraídas del mucílago de cacao Nacional presentan mayor capacidad de acidificación que las BAL *Lactococcus spp* extraídas del mucílago de cacao Trinitario, con una media de pH 0.43.

b) Efecto principal del factor B (antibióticos, productos de limpieza y desinfección).

Según la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad (Tabla 8), en la variable pH, se puede observar que existió significancia entre los antibióticos, productos de limpieza y desinfección en estudio. Encontrándose que mayor capacidad de acidificación presenta el

componente 5 (sin producto de limpieza y desinfección), el cual fue introducido a la investigación como tipo testigo para tener como referencia del verdadero valor de descenso del pH de las BAL puras. Mientras el componente 4 (antibiótico enrofloxacin) presenta la menor capacidad de acidificación, presentando este factor una media de 0.43.

c) Interacción entre tratamientos.

De acuerdo al ADEVA efectuado (Tabla8), en la variable pH, se puede observar que existió significancia entre los tratamientos, donde la mayor capacidad de acidificación se observó en los T₁ (0.87), T₉ (0.84) y T₁₃ (0.79), siendo que estos eran considerados como tipo testigo ya que no cuentan con ningún agente antimicrobiano. Por otro lado los T₆ (0.15) y T₈ (0.15) presentaron menor capacidad de acidificación debido a la inhibición de los antibióticos hacia las BAL y para los demás tratamientos en estudio se presentó valores intermedios de los mencionados para la variable en estudio, donde hubo una leve inhibición acidificándose muy poco la leche, presentando la interacción de los tratamientos una media de 0.43 y un coeficiente de variación de 8.02 en los resultados generales.

Haciendo una comparación con lo mencionado por Olivera (31), que presenta valores de diferencia pH entre 1.03 y 0.30 en lapsos de tiempo de 0 a 6 horas para las bacterias del genero *Lactococcus*, con lo que concuerda en cierto modo con la investigación.

Por otro lado, comparando con Alvarado et al. (29), quien expone que la penicilina produce una mayor inhibición impidiendo la acidificación de la leche con lo que difiere a la presente investigación ya que a pesar que se produjo cierta inhibición el pH disminuyó un 0.39 para el T₃ y un 0.25 para el T₇.

Tabla 8. Valores promedios del análisis de antibiograma y la capacidad de acidificación, de la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ, 2017.

Factor A: BAL (<i>Lactococcus spp</i>) extraídas de variedades de mucílago	Antibiograma	Δ pH
1. Cacao Nacional (EET-103)	1.25 b	0.47 b
2. Cacao Trinitario (CCN – 51)	1.34 a	0.40 a
Promedio	1.29	0.43
E.E	0.02	0.01
Factor B: Antibióticos, productos de limpieza y desinfección		
1. Sin Antibiótico	1.00 c	0.78 d
2. Antibiótico Oxitetraclina	1.00 c	0.20 a
3. Antibiótico Penicilina	1.00 c	0.32 b
4. Antibiótico Enrofloxacina	1.38 b	0.16 a
5. Sin producto de limpieza y desinfección	1.00 c	0.81 d
6. Producto de limpieza y desinfección Yodo Total-12	1.00 c	0.42 c
7. Producto de limpieza y desinfección FULLTRES	3.00 a	0.39 c
8. Producto de limpieza y desinfección EASY-OFF	1.00 c	0.42 c
Promedio	1.29	0.43
E.E	0.04	0.01
Interacción A*B		
T ₁ BAL del Nacional sin antibiótico	1.00 c	0.87 f
T ₂ BAL del Nacional + antibiótico Oxitetraclina	1.00 c	0.25 b
T ₃ BAL del Nacional + antibiótico Penicilina	1.00 c	0.39 c
T ₄ BAL del Nacional + antibiótico Enrofloxacina	1.00 c	0.17 ab
T ₅ BAL del Trinitario sin antibiótico	1.00 c	0.69 e
T ₆ BAL del Trinitario + antibiótico Oxitetraclina	1.00 c	0.15 a
T ₇ BAL del Trinitario + antibiótico Penicilina	1.00 c	0.25 b
T ₈ BAL del Trinitario + antibiótico Enrofloxacina	1.75 b	0.15 a
T ₉ BAL del Nacional sin producto de limpieza y desinfección	1.00 c	0.84 f
T ₁₀ BAL del Nacional + producto de L y D Yodo Total-12	1.00 c	0.42 cd
T ₁₁ BAL del Nacional + producto de L y D FULLTRES	3.00 a	0.37 c
T ₁₂ BAL del Nacional + producto de L y D EASY-OFF	1.00 c	0.48 d
T ₁₃ BAL del Trinitario sin producto de limpieza y desinfección	1.00 c	0.79 f
T ₁₄ BAL del Trinitario + producto de L y D Yodo Total-12	1.00 c	0.42 cd
T ₁₅ BAL del Trinitario + producto de L y D FULLTRES	3.00 a	0.42 cd
T ₁₆ BAL del Trinitario + producto de L y D EASY-OFF	1.00 c	0.36 c
Promedio	1.29	0.43
E.E	0.06	0.02
C.V. (%)	9.64	8.02

Medias con una letra en común son significativamente diferentes según la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Δ = Diferencia de pH ente las 0 y 8 horas en la capacidad acidificadora de la leche de las bacterias *Lactococcus spp* frente a diversos antibióticos, productos de limpieza y desinfección.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Las bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp*) aisladas del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y Trinitario (CCN-51) no presentaron susceptibilidad ante los antibióticos como Oxitetraciclina, Penicilina y Enrofloxacina, solo las BAL extraídas del cacao Trinitario presentaron cierta susceptibilidad al antibiótico enrofloxacina.

El género de bacteria *Lactococcus spp* aislada tanto del mucílago de cacao tipo Nacional (EET-103) y de origen Trinitario (CCN-51), mostraron sensibilidad al producto de limpieza y desinfección llamado FULLTREX, así mismo cada género de *Lactococcus spp* de las dos variedades de cacao presentó resistencia a los otros dos productos de limpieza y desinfección llamados Yodo Total-12 y EASY-OFF.

Las bacterias *Lactococcus spp* extraídas del mucílago de cacao Nacional (EET-103), presentaron mayor capacidad de acidificación frente a los antibióticos en comparación a las bacterias *Lactococcus spp* extraídas del mucílago del cacao Trinitario. Mientras que las bacterias extraídas del mucílago de ambas variedades de cacao se comportaron igual en la capacidad de acidificación de la leche frente a diversos productos de limpieza y desinfección, manteniendo cierto nivel de acidificación a través del tiempo.

5.2. Recomendaciones.

Realizar antibiogramas con agar MRS, para las bacterias ácido lácticas, debido a que estos microorganismos son de crecimiento lento, además requieren de condiciones y medios especiales para crecer, por lo que el uso agar Mueller Hinton no es recomendable.

Elaborar productos fermentados a partir del tipo de bacteria en estudio, para medir la viabilidad de éste como cultivo iniciador.

Determinar la concentración mínima inhibidora (CMI) de diversos antibióticos, productos de limpieza y desinfección hacia las bacterias *Lactococcus spp* provenientes del mucílago de cacao.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIAS

6.1. Literatura citada.

1. Holzapfel Sy. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology. 1997 Abril 29; 36(1): p. 1-29.
2. García J. Identificación de Bacterias Ácido Lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de grado. Pachuca de Soto: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería; 2007.
3. Aarnikunnas J. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Tesis Doctoral. Finlandia: University of Helsinki, Department of Basic Veterinary Sciences; 2006.
4. Parra R. Bacterias Acido Lacticas: Papel Funcional En Los Alimentos. Scielo. 2010 Junio 16; 8(1): p. 94.
5. Martín del Campo M ea. Bacterias Ácido Lácticas Con Capacidad Antagónica Y Actividad Bacteriocinogénica Aisladas De Quesos Frescos. e-Gnosis. 2008 Enero 11; 6(5): p. 1-17.
6. Bedolla S, Dueñas C, Esquivel I, Favela T, Ortiz J. Introducción a la Tecnología de los Alimentos. 2nd ed. Noriega , editor. Mexico D.F.: Limusa; 2004.
7. Goya M. Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación. Tesis de Grado. Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Escuela de Ingeniería en Alimentos ; 2013.
8. Chukeatirote E. Potential use of probiotics. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2003 Diciembre 25; 25(2): p. 275-282.
9. Real Academia Española. [Online].; 2017 [cited 2017 Mayo 01. Available from: <http://dle.rae.es/?id=7OpEEFy>.
10. Fao. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. [Online].; 1997 [cited 2017 Enero 17. Available from: <http://www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s12.htm>.
11. Madigan MT, Martinko JM., Dunlap PV, Clark DP. Brock. Biología de los microorganismos. Duodécima ed.: Pearson; 2009.
12. Fernandez. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Primera ed. Querétaro; 2000.
13. Gilliland. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. Revista. , FEMS Microbiol.

14. Dellaglio, Roissart, Torriani, Curk, Janssens. Características generales des bactéries lactiques. Lorica;; 1994.
15. García MY. Susceptibilidad de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Frente a Diversos Antibióticos. Tesis. Pachuca de Soto : Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas; 2007.
16. Madígan, Martinko, Parker. Biología de los Microorganismos. Decima ed. Madrid: Prentice Hall; 2004.
17. Jay. Microbiología de los alimentos. cuarta ed. Zaragoza: Acríbia ; 2000.
18. Bouix Ly. Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial Zaragoza: Acribia; 2000.
19. Caballero E. XVI Verano de la Investigación Científica Tabasco UJAd, editor. Juárez; 2006.
20. ATEM/AAPPA. Introducción a la Tecnología de Alimentos. Segunda ed. Limusa E, editor.: Limusa; 2004.
21. Jorgensen J, Sahm D. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Considerations. 6th ed. Murray P, Baron E, Pfaller M, editors. Washington D.C.: American Society of Microbiology; 1995.
22. Woods G, Washington J. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Microbiology. Sexta ed. Murray P, Baron E, Pfaller M, editors. Washington D.C.: American Society of Microbiology; 1995.
23. Herrera M. Pruebas de sensibilidad antimicrobianas. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños. 1999 Enero; XXXIV: p. 11.
24. Doern G. Susceptibility tests of fastidious bacteria Murray P. BE, PMea, editor. Washington D. C.; 1995.
25. Estrella L. “Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método automatizado y su relación con el método de difusión en disco en muestras de urocultivo en el Hospital Regional Docente Ambato en el período octubre 2015 – febrero 2016”. Tesis de Grado. Ambato: Universidad Técnica de Ambato , Laboratorio Clínico; 2016.
26. Torres N, Pistones C, Montero C. edutecne.utn. [Online]. Bahía Blanca; 2009 [cited 2017 07 27. Available from: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf.

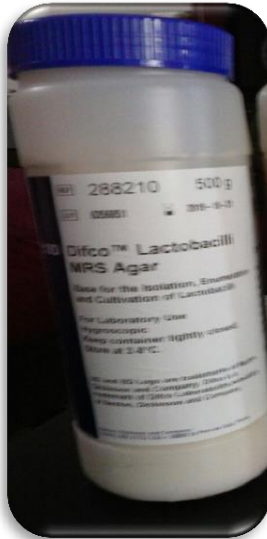
27. INAMHI. Estación Meteorológica del INAMHI ubicada en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP. 2013. Se presentan las condiciones meteorológicas de la ubicación donde se realizó la investigación.
28. Francisco , Reynaldi. Evaluación de antibióticos para el control de loque americana en colmenas de abejas melíferas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata , Facultad de Ciencias Naturales y Museo ; 2006.
29. Alvarado C, Chacón Z, Otoniel J, Guerrero B, López G. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. FCV. 2007 Junio; XVII(3): p. 301-308.
30. Valero-Leal K, Olivares Y, Perozo A, Valbuena E, Boscán L, Colina G, et al. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. SCielo. 2010 Julio; XX(4).
31. Olivera J. Caracterización Tecnológica de Cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Salto-Uruguay : Universidad de la Republica , Unidad de Tecnología de Alimentos ; 2011.

CAPÍTULO VII

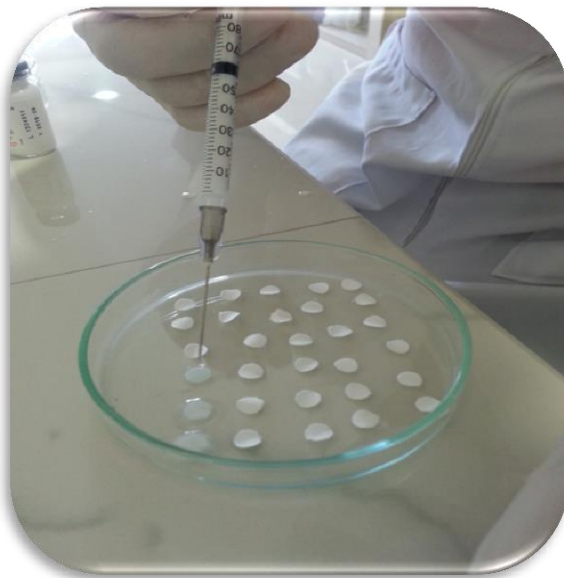
ANEXOS

7.1. Anexos

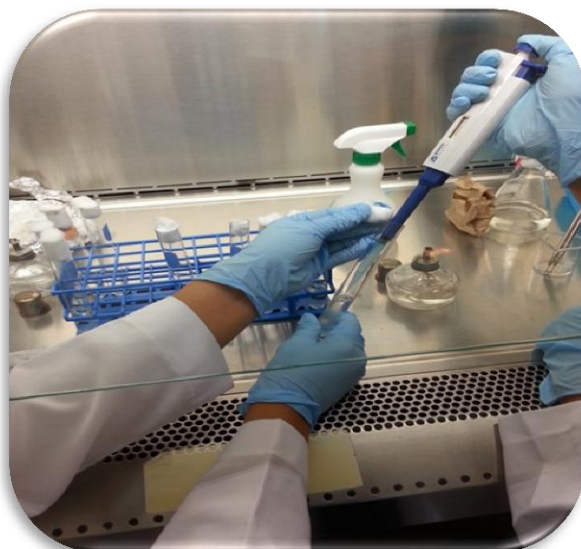
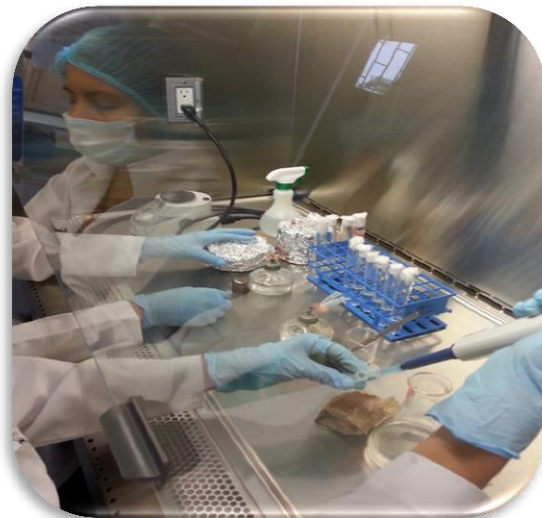
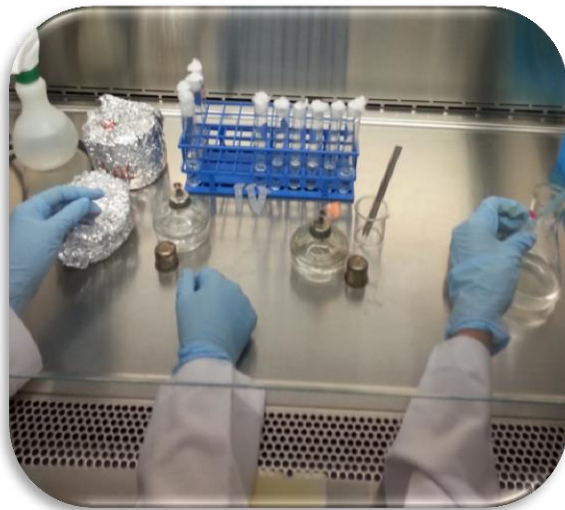
Anexo 1. Preparación del medio de cultivo MRS, Medición del pH al medio de cultivo y llenado de las cajas Petri.



Anexo 2. Preparación de los discos de sensibilidad.



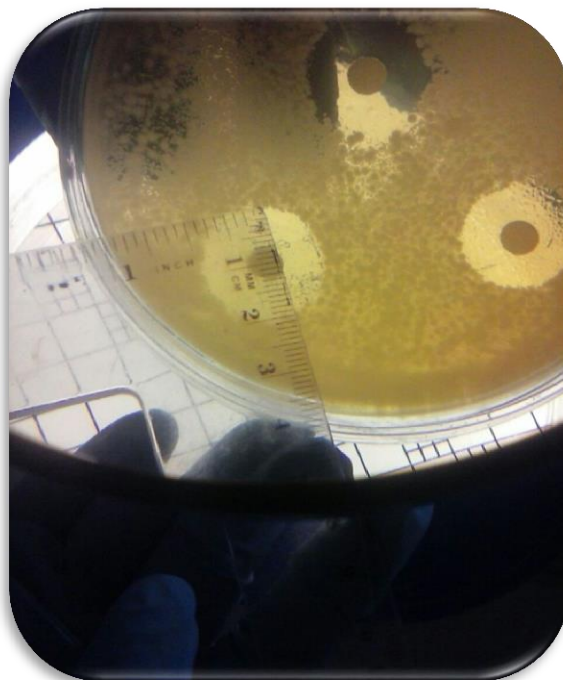
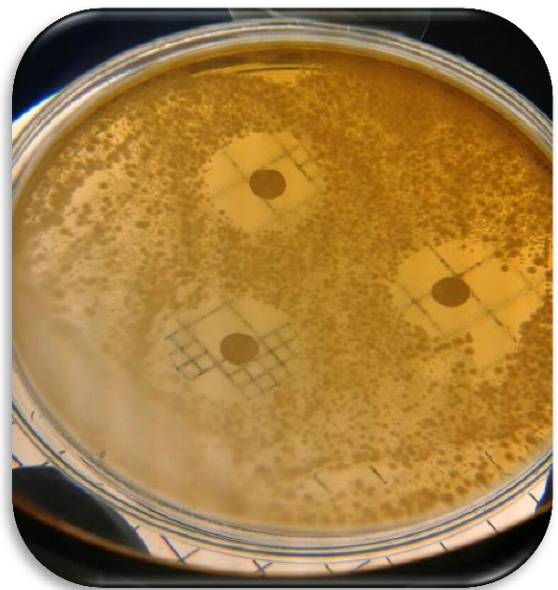
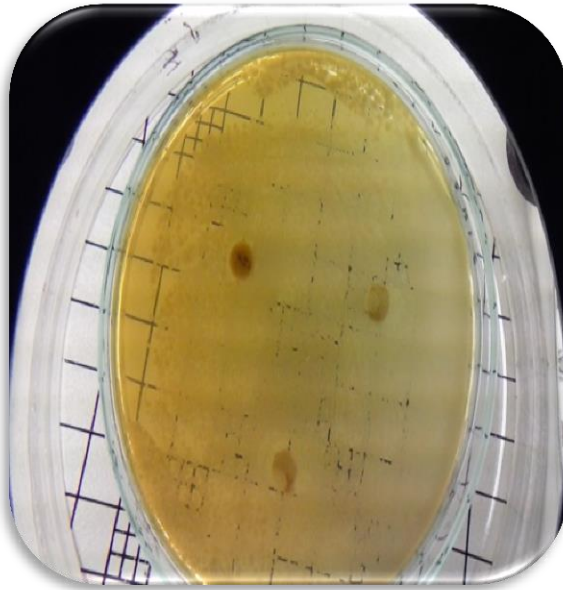
Anexo 3. Preparación del inóculo bacteriano.



Anexo 4. Análisis de Antibiógrama.



Anexo 5. Fotografías de la medición de los halos de inhibición.



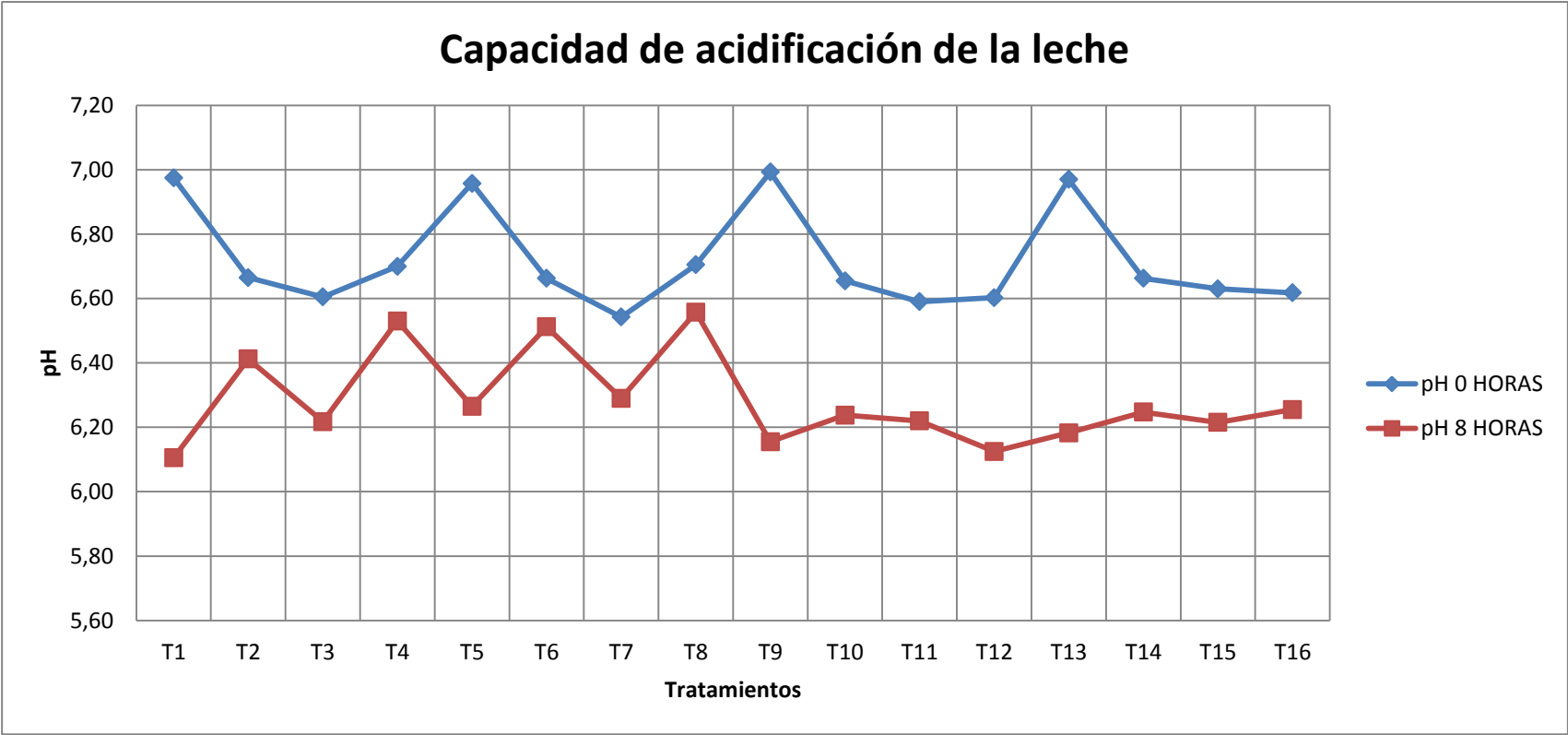
Anexo 6. Preparación de la leche.



Anexo 7. Medición del pH a la leche.



Anexo 8. Gráfico del análisis de la capacidad de acidificación de las BAL (*Lactococcus spp*) en la leche frente a diversos antibióticos, productos de limpieza y desinfección.



Anexo 9. Análisis de la varianza para la variable antibiograma en la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ. 2017.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Factor A	0.14	1	0.14	9.00	0.0043	**
Factor B	27.48	7	3.93	251.29	<0.0001	**
Factor A*Factor B	0.98	7	0.14	9.00	<0.0001	**
Error	0.75	48	0.02			
Total	29.36	63				
Tukey 5 %						
C.V. 9.64 %						
n.s.= no significativo, *=significativo y **=muy significativo						

Anexo 10. Análisis de la varianza para la variable capacidad de acidificación de las BAL en la caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario. FCP – UTEQ. 2017.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Factor A	0.08	1	0.08	63.62	<0.0001	**
Factor B	3.27	7	0.47	379.22	<0.0001	**
Factor A*Factor B	0.08	7	0.01	9.11	<0.0001	**
Error	0.06	48	1.2E-03			
Total	3.49	63				
Tukey 5 %						
C.V. 8.02 %						
n.s.= no significativo, *=significativo y **=muy significativo						