

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



CARRERA DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

**Proyecto de investigación y desarrollo previo a la obtención del
título de:**

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A
PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SU
USO POTENCIAL COMO PROBIÓTICO**

AUTORA:

Karla Liliana Salagata Tirado

DIRECTORA:

Dra. Ana Lucia Chafla, PhD

PUYO- ECUADOR.

2017-2018

AGRADECIMIENTO

A Dios por cada día de vida y por la fortaleza para cumplir mis sueños, por la valentía y perseverancia para superar las adversidades que he tenido que enfrentar, durante el recorrido de mi camino en la UEA.

A mis padres Hilda Marina Tirado Quinto y Ernesto Leopoldo Salagata Chipamtiza, a quienes amo y les debo la vida y todo lo que hoy soy, quienes guiaron y apoyaron velando por mi bienestar, por inculcar en mi principios y valores, por sus consejos, por estar presentes en cada una de las etapas de mi vida y por darme la mejor herencia de la vida “El Estudio”. Gracias a mis padres, por siempre haber confiado ustedes son el mejor regalo que Dios me pudo dar

A mis Hermanos: Nancy, Mirian, Johana, David y a mi cuñado Luis por brindarme su confianza y apoyo incondicional. A mis sobrinos: Andrés, Jhon, Victoria, Leandro y Jheimy, por hacer de las pequeñas cosas un recuerdo valioso y llenar mi vida de alegría, de forma muy especial a Nancy del Rocío mi hermana por sus valiosos consejos y por el apoyo incondicional a toda la familia durante toda mi vida.

A mi querida directora de proyecto de Investigación Dra. Ana Lucia Chaffa Moina, por brindarme su valiosa amistad, serenidad, conocimientos y apoyo incondicional durante el desarrollo de mi investigación.

A mi estimado Msc. Luis Antonio Díaz, por brindarme su amistad y sus enseñanzas a lo largo de esta investigación y por su gran ayuda en el laboratorio de Microbiología.

Al Ing. Patricio Ruiz, Ing. Eberto Tuniesky y Ing. Edgar Chicaiza, Ing. Italo Lara, quienes de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de la investigación y por brindarme su amistad y sus enseñanzas.

A mis amigos Génesis, Daniela, Ana, Fernanda, Gabriela, Diana, Brigith, Dina, Jesica, Jhoselin, Fanny, Braulio, Anthony y Jhonny, por brindarme su valiosa amistad y creer siempre en mí, quienes de una u otra manera contribuyeron a la realización de este sueño.

Con Amor y entrega.

Karla

DEDICATORIA

A Dios,

A mis Padres,

Hilda y Ernesto;

A mis hermanos,

Nancy, Mirian, Johana, David;

A mis sobrinos,

Andrés, Jhon, Victoria, Leandro y Jheimy;

A mis amigas,

Las chiquis y Las Bbys,

Con Esfuerzo y Dedicación.

Karla

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Provincia de Pastaza, sector las Américas en dos plantas procesadoras Zona 1: (Lácteos del Oriente, Zona 2: (Panelera las Américas), con el objetivo de aislar bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales como: suero de leche, melaza y arrocillo. En tres ambientes: suelo, área externa y área interna. El crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) en los ambientes, se determinó mediante la prueba de presencia-ausencia en la que se realizó un análisis descriptivo.

Los sustratos empleados fueron: T1Z1 (Melaza 60% + agua 40 ml de agua), T2Z1 (Suero láctico 80% + 20 ml de agua), T3Z1 (Arroz pre cocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%), T4Z1 (Arroz pre cocido 100%), T5Z2 (Melaza 60% + agua 40 ml de agua), T6Z2 (Suero láctico 80% + 20 ml de agua), T7Z2 (Arroz pre cocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%), T8Z2 (Arroz pre cocido 100%). Para la determinación del mejor sustrato en el crecimiento de BAL se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 8 tratamientos y 3 repeticiones en dilución de 10^{-7} y para la comparación de las medias se realizó la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Mediante las pruebas de identificación realizado a los 24 aislamientos de BAL crecieron en cultivo selectivo Agar MRS, se aislaron 11 BAL que tuvieron características del género *Lactobacillus* en relación a su morfología de bacilos, cocos, su tinción de Gram positivos y las pruebas fisiológicas. Las BAL fueron conservadas en congelación con glicerol a una temperatura de -5°C y almacenadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Las BAL aisladas de la Zona 1 en el área interna de la planta con el sustrato T3Z1, se logró obtener 11 aislamientos positivos para el género *Lactobacillus*, que una vez identificados mediante técnicas moleculares, pueden ser empleados como potencial probióticos.

Palabras Claves: captura, suero lácteo, melaza, arrocillo, crecimiento, aislamiento.

ABSTRAC

The present investigation was carried out in the Province of Pastaza, the Americas sector in two processing plants Zone 1: (Dairy from the East, Zone 2: (Panelera las Américas), with the objective of isolating lactic acid bacteria from agroindustrial waste such as: whey, molasses and arroccillo In three environments: soil, external area and internal area The growth of lactic acid bacteria (LAB) in the environments was determined by the presence-absence test in which an analysis was performed descriptive. The substrates used were: T1Z1 (Molasses 60% + water 40 ml of water), T2Z1 (Lactic whey 80% + 20 ml of water), T3Z1 (Pre-cooked rice 50% + molasses 25% + lactic serum 25%), T4Z1 (Pre-cooked 100% rice), T5Z2 (Molasses 60% + water 40 ml of water), T6Z2 (Lactic whey 80% + 20 ml of water), T7Z2 (Pre-cooked rice 50% + molasses 25% + lactic serum 25%), T8Z2 (100% pre-cooked rice). For the determination of the best substrate in BAL growth, a Completely Randomized Design (DCA) was applied, with 8 treatments and 3 repetitions in dilution of 10^{-7} and for the comparison of the means, the Tukey test was performed ($P < 0.05$). Through the identification tests carried out on the 24 BAL isolates grown in selective MRS Agar culture, 11 BAL were isolated that had characteristics of the Lactobacillus genus in relation to their bacillus, coccus, Gram positive stain and physiological tests. The BAL were stored in freezing with glycerol at a temperature of -5°C and stored in the Microbiology Laboratory of the Amazon State University. The BAL isolated from Zone 1 in the internal area of the plant with the substrate T3Z1, it was possible to obtain 11 positive isolates for the genus Lactobacillus, which once identified by molecular techniques, can be used as potential probiotics.

Key words: capture, whey, molasses, arroccillo, growth, isolation.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.	3
1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.	3
1.1.3. SISTEMATIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2. OBJETIVOS.	4
1.2.1. OBJETIVO GENERAL.	4
1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	4
1.3. JUSTIFICACIÓN.	4
CAPÍTULO II.....	6
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.	6
2.1. MARCO CONCEPTUAL.	6
Bacterias Ácido Lácticas.....	6
Melaza.	6
Lacto suero.....	6
Arrocillo.....	6
2.2. MARCO REFERENCIAL.....	7
Bacterias Ácido Lácticas.....	7
2.2.1. Antecedentes y características generales.	7
2.2.2. Clasificación.	8
2.2.3. Importancia tecnológica	8
2.2.4. Métodos de estudio.....	8
2.2.5. Identificación de BAL mediante pruebas fisiológicas.....	9
2.2.6. Bacterias lácticas probióticas.....	9
2.2.7. Bioconservantes en alimentos	10
2.2.8. Genero Lactobacillus.....	10
2.2.9. Probióticos	11
2.3. Cultivo de microorganismos	11
2.3.1. Medios de cultivo	11
2.3.2. Tipos de Medio de Cultivo:	11
2.4. Residuos Agroindustriales	12

2.4.1. Generalidades	12
2.4.2. Melaza.	13
2.4.3. Lacto suero.	14
2.4.4. Arrocillo.....	16
CAPÍTULO III	18
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
3.1. LOCALIZACIÓN.....	18
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.	19
3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	19
3.4. FUENTES DE RECOPIACION DE INFORMACIÓN.....	19
3.5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.	20
3.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS	20
3.7. INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN.....	20
Identificación de bacterias ácido lácticas.	28
Morfología de colonias.....	28
Tinción de Gram y morfología al microscopio	29
Pruebas fisiológicas.....	29
Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37 y 45°C).	29
Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2,4 y 6.5%).	29
3.8. RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES.	30
3.8.1. Recursos Humanos	30
3.8.2. Equipos	30
3.8.3. Materiales	31
3.8.4. Insumos.....	31
3.8.5. Instalaciones	31
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. RESULTADOS.....	32
Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl en Agar MRS.	38
4.2. DISCUSIÓN.....	39
CAPITULO V.....	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
5.1. CONCLUSIONES.....	41
5.2. RECOMENDACIONES.....	41

CAPÍTULO VI	42
6.1. BIBLIOGRAFIA	42
CAPÍTULO VII.....	52
7.1. ANEXOS.	52
7.1.1 Anexo 1. Preparación de las trampas.	52
7.1.2. Anexo 2. Colocación de las trampas: Suelo, Área Externa, Área Interna en la Zona: 1 y Zona: 2.....	52
7.1.3. Anexo 3. Recolección de trampas.	53
7.1.4. Anexo 4. Preparación de soluciones de las muestras.	53
7.1.5. Anexo 5. Preparación de medio de cultivo.....	54
7.1.6. Anexo 6. Dispensar el medio de cultivo.	54
7.1.7. Anexo 7. Preparación de Diluciones a la ⁻³ y ⁻⁷	55
7.1.8. Anexo 8. Siembra de las Diluciones.....	55
7.1.9. Anexo 9. Cuantificación de bacterias ácido lácticas.	56
7.1.10. Anexo 10. Selección y siembra de bacterias ácido lácticas.	56
7.1.11. Anexo 11. Cultivo puro de bacterias ácido lácticas.....	57
7.1.12. Anexo 12. Pruebas de Identificación morfológica tinción de Gram.....	57
7.1.13. Anexo 13. Observación en el microscopio.	58
7.1.14. Anexo 14. Pruebas Bioquímicas: Crecimiento de BAL en NaCl al 2, 4 y 6.5%. 58	
7.1.15. Anexo 15. Pruebas Bioquímicas: Crecimiento de BAL a diferentes temperaturas 10, 37 y 45 °C en Agar MRS.....	59
7.1.16. Anexo 16. Banco de Cepas.	59
7.1.17. Anexo 17. Conservación del Banco de Cepas.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la Melaza.	13
Tabla 2. Composición del Suero.....	15
Tabla 3. Composición de los sueros de leche dulce y ácido.....	15
Tabla 4. Clasificación Taxonómica del arroz.	17
Tabla 5. Composición del arroz.....	17
Tabla 6. Condiciones meteorológicas de la Ciudad de Puyo.....	18
Tabla 7. Diseño experimental Crecimiento de BAL en diferentes sustratos	26
Tabla 8. Características del diseño experimental.	27
Tabla 9. Esquema del experimento.....	28
Tabla 10. Personal de Investigación.	30
Tabla 11. Equipos.	30
Tabla 12. Materiales	31
Tabla 13. Insumos.....	31
Tabla 14. Captura de bacterias ácido lácticas Zona 1: Lácteos del Oriente.	32
Tabla 15. Captura de bacterias ácido lácticas Zona 2: Panelera las Américas.	34
Tabla 16. Características Fenotípicas.	36
Tabla 17. Crecimiento a diferentes temperaturas en Agar MRS.	37
Tabla 18. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl en Agar MRS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 1.....	21
Figura 2. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 2.....	22
Figura 3. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 3.....	22
Figura 4. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 4.....	23
Figura 5. Crecimiento de bacterias ácido lácticas Dilución $\cdot 10^{-3}$ Z1.....	33
Figura 6. Crecimiento de bacterias ácido lácticas 10^{-7} Z1.....	33
Figura 8. Crecimiento de colonias en los distintos sustratos.....	35

INTRODUCCIÓN

Gaitán, (2013) menciona que las BAL son conocidas por su capacidad como microorganismos probióticos, que pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la producción extracelular de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas, una gran cantidad de las BAL más reconocidas pertenecen al género de los Lactobacillus.

Según Díaz et al., (2014) los Lactobacillus son bacterias Gram positivas, anaeróbicas o aeróbicas facultativas, se encuentran en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal, se ubican habitualmente en lugares donde hay gran variedad de sustancias ricas en carbohidratos disponibles y son utilizadas como fermentadores de alimentos cárnicos, lácteos y vegetales, además del uso en biopreservación, para aumentar la vida útil de los productos o como potencial probiótico en la industria.

Estudios realizados con bacterias lácticas han demostrado que producen sustancias con actividad antimicrobiana denominadas bacteriocinas, y son empleadas en la industria alimenticia para neutralizar agentes contaminantes de alimentos, potencialmente patógenos para el hombre, sin modificar las propiedades del alimento (Giraldo & Medina, 2010).

En Ecuador los productos bacterianos y probióticos de uso comercial utilizados esencialmente en la alimentación animal, son importados de otros países; es por esto que actualmente se realizan estudios para el aislamiento, producción y utilización de cepas nativas de bacterias ácido lácticas (BAL) (Ossa, et al., 2010).

Según Ramírez et al., (2011) las BAL son utilizadas en la industria alimentaria, principalmente como cultivos iniciadores, para la producción de diferentes subproductos derivados de la leche, carne, frutas y hortalizas, ya que estas bacterias originan cambios específicos en sus características organolépticas.

La obtención de probióticos a partir de sustratos, como residuos agroindustriales es una tecnología, que se perfila actualmente como una alternativa real al uso de antibióticos, principalmente en la producción animal intensiva. Estos productos son aditivos zootécnicos formados por microorganismos vivos que benefician al hospedero y, por ende, influyen en sus rendimientos productivos. Entre los microorganismos más empleados para la elaboración de

estos aditivos, se encuentran los cultivos microbianos puros, fundamentalmente BAL (García et al.,2008).

Para que la producción de bacteriocinas pueda considerarse útil a nivel industrial, es fundamental que el sustrato de crecimiento, de las cepas productoras para la producción de bacteriocinas sea de grado alimentario y de bajo coste. Es cada vez más frecuente la utilización de subproductos de la industria láctea, como medio de crecimiento y producción alternativa a los medios de cultivos cotidianos, los mismos que son provistos por casas comerciales. Fundamentalmente se utiliza lactosuero, lactalbúminas, melaza y arrocillo productos de desecho en las queserías, en las paneleras y en las piladoras de arroz. Estos resultan muy económicos, por otro lado, al ser utilizados como medio de crecimiento, se reduce el problema ambiental que supone su eliminación (Muñoz, 2006).

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 (Campo et al., 2008).

La presente investigación tuvo como objetivo aislar bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su potencial uso como probiótico, con la finalidad de mitigar el uso de cepas comerciales.

CAPÍTULO I

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

(Gaitán, 2013) menciona que se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL,) que presentan espectros de inhibición específicos para algunas bacterias específicas y para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos y patógenos como *Listeria* entre otros. Debido a los métodos de manejo intensivo que se aplican en la actualidad, los animales de granja son muy susceptibles a los desbalances bacterianos entéricos. Estos conllevan a la insuficiente conversión de alimentos y a la disminución de la respuesta zootécnica, gracias a su actividad antagónica.

(Milián, Pérez, & Bocourt, 2008) aseguran que las BAL empleadas como probióticos, podrían ser una de las alternativas, para el control de la excreción de patógenos en las aves de corral, obligando al productor a utilizar probióticos comerciales que impactan en los costos de producción que cada vez se vuelven insostenibles.

Por esta razón, el presente proyecto tuvo como objetivo aislar bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su uso potencial como probiótico, con la finalidad de mitigar el uso de cepas comerciales, mediante una técnica de procesamiento en campo y laboratorio, utilizando diferentes sustratos o medios de captura, formulados de residuos agroindustriales como la melaza, suero de leche y residuos de arroz para su desarrollo.

1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Los residuos que genera la agroindustria empleados como sustratos, posibilitará la obtención de cepas de BAL autóctonas con potencial uso probiótico?

1.1.3. SISTEMATIZACIÓN DEL PROBLEMA.

- ¿La composición y concentración de los sustratos como medios de captura de las BAL permite obtener cepas selectivas?

- ¿La caracterización morfológica y bioquímica de los inóculos obtenidos, garantizan la identificación de las bacterias ácido lácticas? .

1.2. OBJETIVOS.

1.2.1. OBJETIVO GENERAL.

- Aislar bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su potencial uso como probiótico.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la metodología de captura de bacterias ácido lácticas nativas en la panelera las Américas y la industria Lácteos del Oriente.
- Identificar la composición y concentración óptima del sustrato de captura para su evaluación estadística.
- Obtener cepas de bacterias ácido lácticas para la generación de un banco de microorganismos dentro del laboratorio de microbiología de la UEA.

1.3. HIPOTESIS

Los sustratos empleados: suero, melaza y arrozillo permitirán obtener aislamientos de BAL capturadas en las zonas donde se generan los residuos agroindustriales.

1.4. USTIFICACIÓN.

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.

En el Ecuador, las bacterias que se manejan para productos probióticos, son cepas importadas de países europeos y Japón, lo que implica costos elevados para su adquisición. Las empresas comercializadoras de alimentos fermentados representan el (95%) del mercado nacional, si trabajarían con la búsqueda de cultivos bacterianos o cepas nativas para la producción de mayores densidades de cepas microbianas, que generaría un mayor impacto en el

aprovechamiento de los residuos agroindustriales, empleando en la producción bacterias ácido lácticas con fines de aplicaciones a otros alimentos (Vargas et al. 2004), ya sea para consumo humano o animal, biopreservación, probióticos, entre otros, con la correspondiente reducción de costos de producción para los consumidores, lo cual sería un gran aporte a la industria nacional en la producción de bacterias ácido lácticas.

Por tal motivo se decidió investigar, cepas de bacterias ácido lácticas nativas, con el empleo de residuos agroindustriales como: la melaza de caña, suero lácteo y arrocillo, que contienen componentes esenciales que favorecen el crecimiento de las BAL y proporcionan alternativas de relación costo-beneficio, a nivel de producción y rentabilidad.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.

2.1. MARCO CONCEPTUAL.

Bacterias Ácido Lácticas.

Las Bacterias Ácido Láctica son un grupo diverso de microorganismos Gram-positivos, no esporulados, y carentes de catalasa, encontradas dentro de las plantas, la carne y los productos lácteos, pueden producir ácido láctico como un producto de glucólisis anaeróbico, con alto rendimiento y productividad. Durante la fermentación, estas bacterias no producen sólo ácido láctico, si no también compuestos con actividad antimicrobiana conocidas como bacteriocinas, las cuales son péptidos anfipáticos catiónicos con la capacidad de deformar la membrana celular de células contaminantes (Aragón, 2015).

Melaza.

Según (Fajardo & Sarmiento, 2007), la melaza es un subproducto del proceso fabril de cristalización del jugo, una parte es empleada para la alimentación animal y otra se utiliza en la elaboración de alcohol carburante para la exportación y para la producción de lácteos. Los principales componentes de la melaza son el agua y los carbohidratos.

Lacto suero.

Según (Poveda, 2013), El lactosuero o suero de leche se define como un producto lácteo obtenido de la separación del coágulo de la leche, de la crema o de la leche semidescremada durante la fabricación del queso, mediante la acción ácida o de enzimas del tipo del cuajo (renina, enzima digestiva de los rumiantes) , que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones.

Arrocillo.

El arroccillo es una excelente fuente de energía, debido a la alta concentración de almidón, facilitando también proteínas, vitaminas y minerales, posee bajo contenidos de lípidos. Debido a la importancia del arroz en la dieta de gran parte de la población mundial, su calidad nutricional afecta directamente a la salud humana, este cereal está constituido principalmente por almidón, presentando cantidades menores de proteínas, lípidos, fibras y cenizas (Muirragui & Pilar, 2012).

2.2. MARCO REFERENCIAL.

Bacterias Ácido Lácticas.

2.2.1. Antecedentes y características generales.

En 1857 Pasteur descubrió a los microorganismos que causaban alteraciones en los alimentos, realizando estudios sobre la fermentación láctica, alcohólica y butírica. Denominándolos lacto bacterias, lo cual marco el antecedente para la aplicación de las bacterias ácido lácticas (BAL) en los procesos de elaboración de queso y derivados de la leche.

En el año 1980, Weigman estableció lo que fue el primer cultivo iniciador reconocido y más tarde en 1989 definió las BAL como aquellas bacterias que conformaban leche acida a partir del azúcar de la leche (M. Ortiz, 2006).

Hoy en día las BAL se definen como microorganismos Gram positivos, cuya característica distintiva es la producción de ácido láctico como principal producto del metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, que se caracterizan por ser no esporulados, micro aerófilos o anaerobios facultativos que carecen de complejos citocromos y catalasa sensu stricto. Las BAL además pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH bajo, debido a que cuentan con un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que contribuye con la homeostasis del pH interno y origina energía (Gaitán, 2013).

Sus colonias son medianas a pequeñas, convexas, de bordes enteros, opacas y sin pigmentación. Sus exigencias nutricionales son complejas incluyendo: carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, los cuales se encuentran en el medio Man Rogosa y Sharpe (MRS) utilizado para su crecimiento en laboratorio (García, 2016).

García, (2016) menciona que estas bacterias se caracterizan además por:

- A. Capacidad de biosíntesis débil, lo cual genera su poliauxotropía para diversos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y ácidos grasos; su metabolismo carece de la capacidad de sintetizar el núcleo hemo de las porfirinas, y no poseen citocromos, por lo cual no les es posible realizar respiraciones aeróbicas y anaeróbicas.
- B. Son bacterias anaerobias facultativas microaerófilas.

C. Obtienen su energía por fosforilación a nivel de sustrato a la vez que oxidan carbohidratos y no poseen un ciclo de Krebs funcional.

Poseen una alta tolerancia a los ácidos, así que pueden subsistir a pH menor a 5, implicando una ventaja competitiva sobre otros organismos no resistentes los cuales proliferan en medios neutros o básicos, esto debido a que las BAL pueden permitir una acidificación de su citoplasma, gastando de esta forma menos energía en la regulación del pH interno (Aragón, 2015).

2.2.2. Clasificación.

Los géneros tradicionales de las BAL, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, han sido ampliados para incluir en este grupo de bacterias los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*. Las cianobacterias son cepas que antiguamente se clasificaban como *Lactobacillus*, mientras que los otros tres géneros se clasificaban como estreptococos. Al haber sido separados los enterococos y lactococos, la especie más importante de este último grupo en los alimentos es *Streptococcus thermophilus*, también *Streptococcus diacetylactis* se clasifica como una cepa de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, que utiliza el citrato (Ortiz, 2006).

2.2.3. Importancia tecnológica

Las BAL son utilizadas en la elaboración y conservación de alimentos, a pesar de su importancia económica. Es por esto que se han convertido en un sujeto de estudio privilegiado en el mundo. Se han dedicado 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 ha creado la necesidad de obtener productos nuevos lo que explica el interés hacia este grupo de bacterias (Cajas, 2017).

2.2.4. Métodos de estudio.

En general las BAL son exigentes en sus demandas nutricionales pues requieren de carbohidratos, aminoácidos y de una variedad de factores de crecimiento.

Actualmente se utilizan diversos medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales para el aislamiento y recuento de BAL a partir de alimentos, entre los que se encuentran el agar MRS

(Man, Rogosa y Sharpe), el agar APN (Actidiona-polimixina-nitrito), el agar Lee y el Agar Chalmers.

Agar MRS, en este medio en general se tiene un buen desarrollo de BAL de productos lácteos y fuentes humanas al agrupar la acción estimulante del citrato, acetato de sodio, twen 80 y sales de Mn²⁺; pero no admite un buen desarrollo de BAL provenientes de cereales y otros vegetales (Ortiz, 2006).

2.2.5. Identificación de BAL mediante pruebas fisiológicas.

En tiempos remotos la taxonomía de las BAL se basó en gran parte en su reacción a la tinción de Gram, para llegar a una identificación fina de las cepas, se consideran además las características fisiológicas que se enlistan a continuación (Ortiz, 2006).

- Características fenotípicas como: morfología de colonias, tinción de Gram.
- Producción de ácido láctico.
- Desarrollo en el medio de cultivo MRS.
- Crecimiento a diferentes temperaturas (10,37 y 45°C).
- Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2,4 y 6.5%).

2.2.6. Bacterias lácticas probióticas.

Ramírez et al., (2011) mencionaron que un probiótico se refiere a aquellos cultivos puros, o la mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que aplicados al hombre y los animales aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la micro flora nativa. La flora intestinal humana de los animales juega un papel muy importante en su estado de salud y la presencia de enfermedades. En ambos casos los probióticos se utilizan para mejorar la salud intestinal y para estimular el sistema inmunológico, en el mundo se reconocen más de 20 especies, diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros.

La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las BAL y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados predominando los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, (Ramírez et al., 2011).

2.2.7. Bioconservantes en alimentos

Arteaga, (2011) menciona que las BAL, aparte de causar cambios organolépticos favorables son capaces de formar un efecto antagonista frente a patógenos al competir por la fuente de nutrientes y producir metabolitos, tales como: ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reutenina y sustancia tipo bacteriocina.

Las bacteriocinas, por otra parte, expresan características que benefician su función como bioconservantes tales como las mencionadas a continuación por Arteaga, (2011):

- Ser producidas por bacterias clasificadas como GRAS (Generally Recognized as Safe), como las de los géneros Carnobacterium, Lactobacillus entre otras.
- Son degradadas por enzimas proteolíticas a nivel del tracto gastrointestinal.
- No son activas biológicamente frente a células eucarióticas.
- Presentan un amplio espectro y elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos, además de actuar de forma sinérgica con otros sistemas de conservación.
- La mayoría de estos microorganismos resisten tratamientos de conservación como: la pasteurización, la liofilización y la acidificación.
- Presentan un amplio espectro y elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos, además de actuar de forma sinérgica con otros sistemas de conservación.
- La mayoría de estos microorganismos resisten tratamientos de conservación como: la pasteurización, la liofilización y la acidificación (P. Arteaga, 2011).

2.2.8. Genero Lactobacillus.

El género Lactobacillus (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes citados por Bergey, (1992); lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos Suárez de (Basnec y Bianchini, 1993). Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no mótiles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica.

Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente

2.2.9. Probióticos

(Ossa, Vanegas, & Badillo, 2010) menciona que los probióticos tienen incomparables efectos en el ser humano, transforman la micro flora intestinal, influyen directa e indirectamente en el estado de la salud, a través de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, colaboran con la degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulan la respuesta inmune y dan protección frente a microorganismos entero patógenos.

2.3. Cultivo de microorganismos

Se han desarrollado algunas técnicas para el cultivo de microorganismos, el cultivo batch y el cultivo por lote alimentado, han sido parte del arte de la fermentación desde la antigüedad y aún son usados en la mayoría de las fermentaciones industriales. Mientras que las técnicas de cultivo continuo son relativamente nuevas y han demostrado un gran valor como herramientas para estudios de laboratorio (P. Arteaga, 2011).

2.3.1. Medios de cultivo

Arteaga, (2011) define al medio de cultivo como una mezcla equilibrada de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno y azufre, y factores de crecimiento) que en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos.

Debido a que los microorganismos demandan condiciones nutricionales donde se deben hallar presentes macronutrientes, además de vitaminas y suplementos o los denominados factores de crecimiento, cuando el medio donde se desarrollará el microorganismo se encuentra establecido y con sus concentraciones y composición química conocida, se trata de un medio de cultivo definido, existiendo también los denominados medios complejos, que están constituidos por una gran variedad de componentes.

2.3.2. Tipos de Medio de Cultivo:

Actualmente se utilizan varios medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales, para el aislamiento y recuento de BAL a partir de alimentos, entre los que se encuentran el agar MRS

(Man-Rogosa-Sharpe), el agar APN (Actidiona-polimixina.nitrito), el agar Lee y el agar de Chalmers (Ortiz, 2006).

El medio de cultivo MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (1960) como un medio de enriquecimiento, cultivo y aislamiento de *Lactobacillus* y otras bacterias ácidas lácticos desde diferentes tipos de muestras, tanto clínicas como provenientes de alimento (Muñoz, 2006).

Para las fermentaciones industriales se utilizan medios de cultivos, los cuales son formulados con productos de desecho de diversas industrias para así optimizar y bajar costos de producción. Es el caso del uso de melaza, es un subproducto del proceso de extracción de azúcar desde la remolacha, presentando un bajo costo. Nutricionalmente la melaza presenta un alto contenido de azúcares, como la sacarosa que se encuentra presente, además posee otros componentes, como minerales, tiamina, ácido fólico y biotina, que se podrían utilizar como una buena fuente de carbono para microorganismos con metabolismo fermentativo. Otras fuentes de carbono son: desechos de almidón de maíz y de papa, lactosuero, n-alcanos, desechos de licor de sulfito, aguas residuales de origen doméstico, desechos de la celulosa y leguminosas ricas en carbohidratos (Arteaga, 2011).

2.4. Residuos Agroindustriales

2.4.1. Generalidades

Espinosa *et al.*,(2002) manifiestan que anualmente millones de toneladas de cereales y frutos son dañados por el clima, durante su transporte, durante su almacenaje o bien durante su procesado.

Los residuos agroindustriales pueden ser de origen animal o vegetal, y se pueden dividir en siete grupos: (I) cereales, (II) raíces y tubérculos, (III) plantas oleaginosas, frutas y verduras, (V) productos cárnicos, (VI) pescados y mariscos y (VII) productos lácteos (Sánchez & Tromps, 2014).

Las aplicaciones que se le ha dado a este tipo de residuos se pueden clasificar en cuatro grupos: (I) pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos bioactivos e ingredientes alimenticios (fibras dietéticas, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas); (II) producción de enzimas, antibióticos, hongos

comestibles, ácidos orgánicos y biocombustibles; (III) producción de alimento para animales y producción de composta (Ballesta, 2017).

Dentro de estas aplicaciones, las enzimas representan una herramienta muy útil para el pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos con alto valor agregado (Casas, Sandoval, & Coral, 2014).

Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su constitución, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. Respecto a esto último, es de esperar que después del aprovechamiento de un residuo se genere un siguiente residuo más agotado que podría tener otra aplicación, o bien, convertirse en un desecho. En la búsqueda de oportunidades de aprovechamiento de residuos este aspecto deberá ser considerado, con un enfoque de responsabilidad ambiental (Saval, 2012)..

2.4.2. Melaza.

Ossa et al., (2010) manifiestan que la melaza es un producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa, glucosa y fructosa procedente de la caña de azúcar; además, contienen sustancias no fermentables y melanoidinas (a base de nitrógeno), derivados a partir de la condensación del azúcar y amino compuestos.

Aguilar et al., (2015) mencionan que no todo el jugo de la caña es convertido en azúcar, sino que una parte de ella queda en forma de miel o también llamada melaza; este es un líquido denso y viscoso de color oscuro y se utiliza generalmente para alimentos concentrados para animales y como suplemento alimenticio para el hombre. Los componentes de la melaza ver la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la Melaza.

Composición de la Melaza	
Proteínas	3 %
Sacarosa	60 – 63%
Azúcares reductores	3 – 5%
Grasas	0.4%

Cenizas	9%
Agua	16%

Fuente: (AGROINDUSTRIAL SCIENCE 2015) .

Según datos del 2008, del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador, el área de cultivo de caña en el país fue de 110 000 hectáreas. De esa cifra, indica un estudio de la Universidad Técnica del Norte, el 4% se destina para la producción de melaza.

El Ingenio Monterrey, ubicado en Catamayo (Loja). De las cerca de 2 200 hectáreas de caña cultivada, esta destina el 22% a la elaboración de melaza CINCAE.

Aplicaciones:

- Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo (Aguilar et al., 2015).
- Eficacia y costo del trampeo para capturar *Rhynchophorus palmarum* usando caña de azúcar y melaza aislada (Montes et al., 2014).
- Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado, obtención de ácido láctico (Garcés et al., 2004).
- Producción de ácido láctico por vía biotecnológica (García et al., 2017).
- Producción de ácido láctico a partir de melaza pre tratada utilizando *Lactobacillus delbrueckii* (Martínez et al., 1988).

2.4.3. Lacto suero.

El suero de leche líquido es un subproducto que durante varios años ha sido apreciado como un desecho, actualmente es utilizado por sus múltiples nutrientes y propiedades funcionales. Este subproducto está compuesto por agua, lactosa, proteínas, minerales (calcio, fósforo, magnesio) y grasa. Los componentes del suero lácteo se muestran en la Tabla 2.

Las proteínas son de gran interés en diversas áreas, el espectro de beneficios confirmados y el potencial que presenta la proteína del suero para la salud, cubre todo el ciclo de la vida, desde la nutrición infantil hasta productos para ancianos (Hernández & Vélez, 2014).

Tabla 2. Composición del Suero.

Componentes	Porcentaje (%p/p)
Ceniza	4,6+/-0,02
Grasa	4,1+/-0,40
Carbohidratos	8,6+/-0,56
Humedad	6,8+/-0,03
Proteína	75,86+/-1,23

Fuente: (Acevedo *et al.*,2015).

La composición nutricional del lactosuero puede modificar considerablemente, dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran los tipos de lactosuero (Poveda, 2013). Los tipos más comunes de suero de leche son el dulce y el ácido.

Los componentes del suero lácteo dulce y ácido se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de los sueros de leche dulce y ácido.

Componente (g/L)	Suero de leche dulce	Suero de leche ácido
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Grasa	0.0-5.0	0.0-5.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fósforo	0.4-0.7	0.5-0.8
Potasio	1.4-1.7	1.4-1.6
Cloruros	2.0-2.2	2.0-2.2

Fuente: (M. Hernández & Vélez, 2014)

La composición nutricional del lactosuero puede modificar considerablemente dependiendo

El suero dulce se obtiene de la elaboración del queso mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan haciendo que estas se desestabilicen y precipiten, todo esto bajo condiciones específicas de temperatura,

aproximadamente 15-50°C, con un pH levemente ácido.

El lactosuero se constituye el principal residuo de la industria láctea, pues solo una parte de este es usado para alimentación animal o es procesado, el resto es tratado como un desecho; de manera que, aproximadamente, 47 % de las 115 millones de toneladas de lactosuero, producido a nivel mundial, se desecha sin tratamiento previo al ambiente, en ríos, lagos o en el suelo, lo que además de ocasionar un gran daño, también representa una pérdida significativa de recursos (Guerrero *et al.*, 2012).

Aplicaciones:

- Eficacia y costo del trapeo para capturar *Rhynchophorus palmarum* usando caña de azúcar y melaza aislada. como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (Hernández *et al.*, 2014).
- Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo (Urribarrí *et al.*, 2004).

2.4.4. Arrocillo.

El arroz es una excelente fuente de energía, debido a la alta concentración de almidón, proporcionando también proteínas, vitaminas y minerales, posee bajo contenido de lípidos. Por tanto, debido a la importancia del arroz en la dieta de gran parte de la población mundial, su calidad nutricional afecta directamente a la salud humana, ver tabla 4. Este cereal es constituido principalmente por almidón, presentando cantidades menores de proteínas, lípidos, fibras y cenizas. Entre tanto, la composición del grano y de sus fracciones está sujeta a diferencias varietales, variaciones ambientales, de manejo, de procesamiento y de almacenamiento, produciendo granos con características nutricionales diferentes (Muirragui & Pilar, 2012)

Tabla 4.Clasificación Taxonómica del arroz.

Clasificación	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Monocotiledones
Orden	Cyperales
Familia	Pnacea
Género	Oryza
Especie	Sativa

Fuente: (Jiménez, 2017).

La soberanía alimentaria mantiene que mientras un producto sea de aporte nutricional su Es importante recalcar que, durante el proceso del pilado de arroz, se generan pérdidas que re es el arrocillo con el 9%, mientras que el 26% restante corresponde a la cáscara, al polvillo e impurezas (Jiménez, 2017).

Los hidratos de carbono son el principal componente del arroz, con un 79,90 %, es un polímero conformado por amilosa y amilopectina, cuya relación es determinante en las propiedades funcionales ver tabla 5 (Jiménez, 2017). presentan el 35% de la producción cosechada. De estas, el principal subproducto generado

Tabla 5.Composición del arroz

Componente	Grano de arroz
Calorías (kcal)	364,00
Proteína (g)	7,10
Grasa (g)	0,70
Hidratos de carbono (g)	79,90
Minerales (g)	0,60
Fibra dietética (g)	1,30
Humedad (g)	12,00

Fuente: (Jiménez, 2017).

Aplicaciones:

- Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii* (Hernández, 2017).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1. LOCALIZACIÓN.

La investigación se realizó en dos fases:

- I. **Fase de Campo:** se realiza la captura de bacterias ácido lácteas en dos zonas, Zona 1: Lácteos del Oriente, Zona 2: Panelera las Américas, ubicadas en el Sector las Américas, Provincia de Pastaza.

Tabla 6. Condiciones meteorológicas de la Ciudad de Puyo.

Datos meteorológicos	Valores promedio
Humedad Relativa (%)	69 a 89%
Temperatura promedio (°C)	16°C a 25°C
Precipitación (mm)	159 mm a 296 mm
Viento	14 km/h - E
Zona ecológica	Bosque semi húmedo tropical

Fuente: (INAMHI) Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, (2018).

- II. **Fase de Laboratorio:**

Se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica (UEA) ubicada en el km 2 ½ vía Napo (paso lateral), en la ciudad del Puyo, cantón Pastaza, provincia de Pastaza.

Para la recolección de BAL se realizó:

Preparación de trampas con los residuos agroindustriales como sustratos.

- Metodología de captura de BAL.
- Preparación de medio de cultivo.
- Incubación de microorganismos.
- Selección de BAL.
- Aislamiento de BAL.
- Pruebas de identificación morfológica microscópica y macroscópica.
- Pruebas fisiológicas.

- Banco de BAL.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

En la presente investigación se aplicó un estudio de carácter cuantitativo, en función al crecimiento de BAL en los distintos sustratos de captura en el campo, identificados mediante una prueba de presencia-ausencia en tres ambientes: suelo, área externa, área interna para determinar el mejor ambiente de crecimiento.

Se realizó un análisis descriptivo en las características fenotípicas, el crecimiento de BAL a diferentes Temperaturas y a diferentes concentraciones de NaCl.

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

Además, se utilizó un diseño experimental, en el cual se comprobó el crecimiento microbiano en los distintos sustratos y determinar el sustrato de mayor crecimiento.

3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.

Se utilizó los siguientes métodos para la investigación:

A. 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 el aislamiento de las bacterias ácido lácticas presentes en Lácteos del Oriente, y la Panelera Las Américas.

B. Métodos estadísticos.

A los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de varianza y a las medias se les aplicó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el empleo del paquete estadístico InfoStat.

3.4. FUENTES DE RECOPIACION DE INFORMACIÓN.

En la presente investigación de aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en Lácteos del Oriente y la Panelera las Américas, se realizó las siguientes fuentes:

A. Fuentes primarias

- Pre-ensayo
- Trabajo de campo

B. Fuentes secundarias

- Libros
- Artículos científicos
- Sitios web
- Tesis
- Páginas web

3.5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

Se realizó estadística descriptiva a la variable captura en distintos ambientes, en diferentes diluciones, en las dos zonas de estudio, en función al crecimiento de BAL en los distintos sustratos de captura en el campo, identificados mediante una prueba de presencia-ausencia en tres ambientes: suelo, área externa, área interna para determinar el mejor ambiente de crecimiento. También en las características fenotípicas, el crecimiento de BAL a diferentes Temperaturas y a diferentes concentraciones de NaCl.

Se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con 8 tratamientos y 3 repeticiones a la variable crecimiento de colonias en los distintos sustratos.

3.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Se realizó un registro en EXCEL de los datos obtenidos en el análisis descriptivo. A los resultados del crecimiento de colonias en los distintos sustratos, se realizó un análisis de varianza y para la comparación de las medias se realizó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). mediante el paquete informático InfoStat.

3.7. INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN.

ETAPA 1:

- **Determinar el ambiente en la captura de BAL en las zonas de referencia.**

La presente investigación en dos zonas que generan residuos agroindustriales como suero de leche y melaza Zona 1: (Lácteos del Oriente y Zona 2: Panelera las Américas). Se aplicó la metodología de Campo et al., (2014) en la que se realizó la preparación del sustrato, que consistió en la pre cocción de 1 kg de arroz sin sal durante 3 minutos, hasta obtener una consistencia semi blanda; se repartió en 24 tarrinas desechables, se cubrieron las tarrinas con lienzo y se aseguraron con ligas. En la investigación se utilizó esta metodología agregando sustratos como: suero lácteo y melaza.

Para el desarrollo de los objetivos propuestos se prepararon trampas empleando residuos agroindustriales como sustratos, detallados a continuación:

Figura 1. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 1.

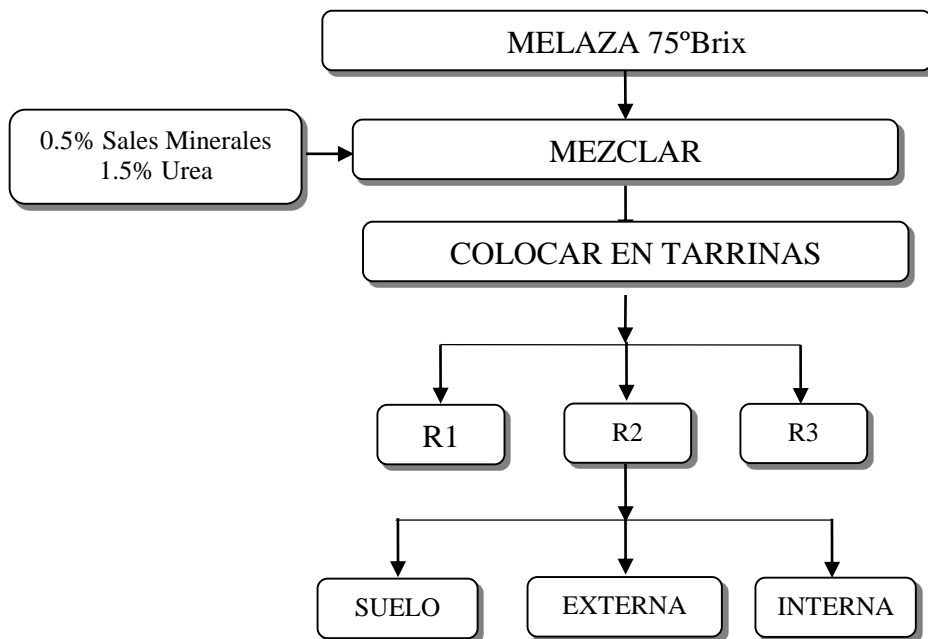


Figura 2. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 2.

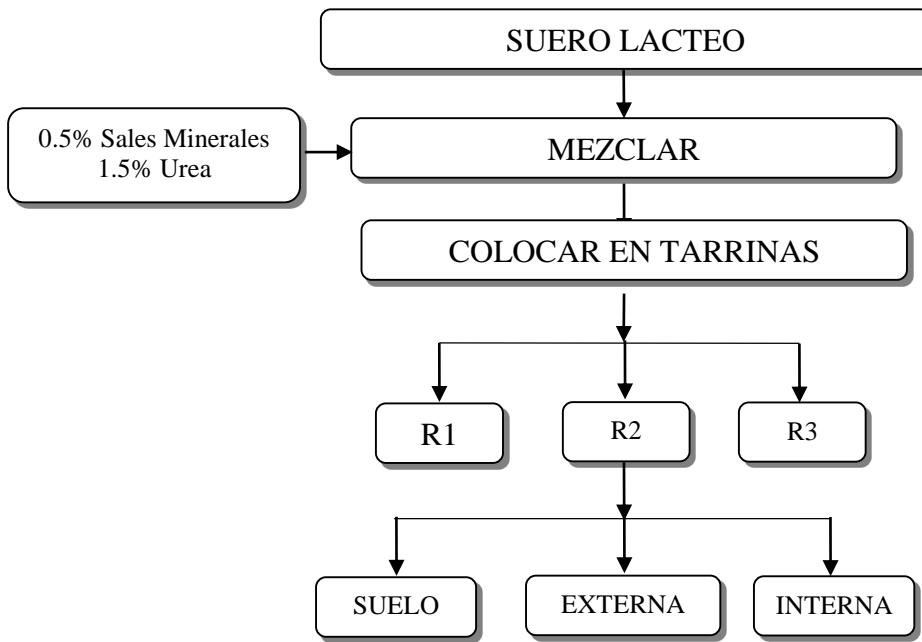


Figura 3. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 3.

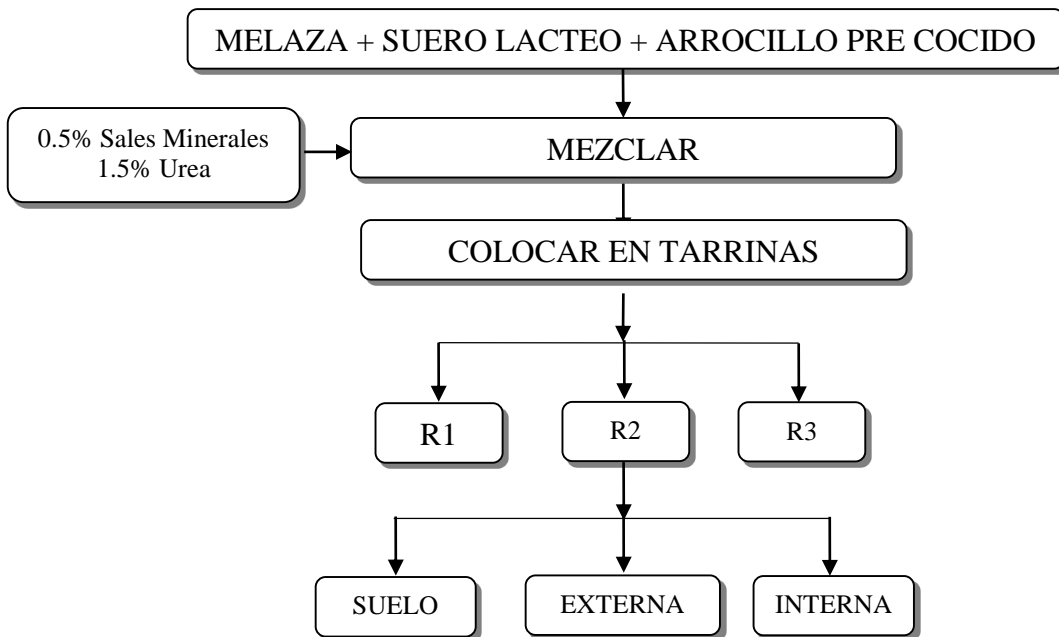
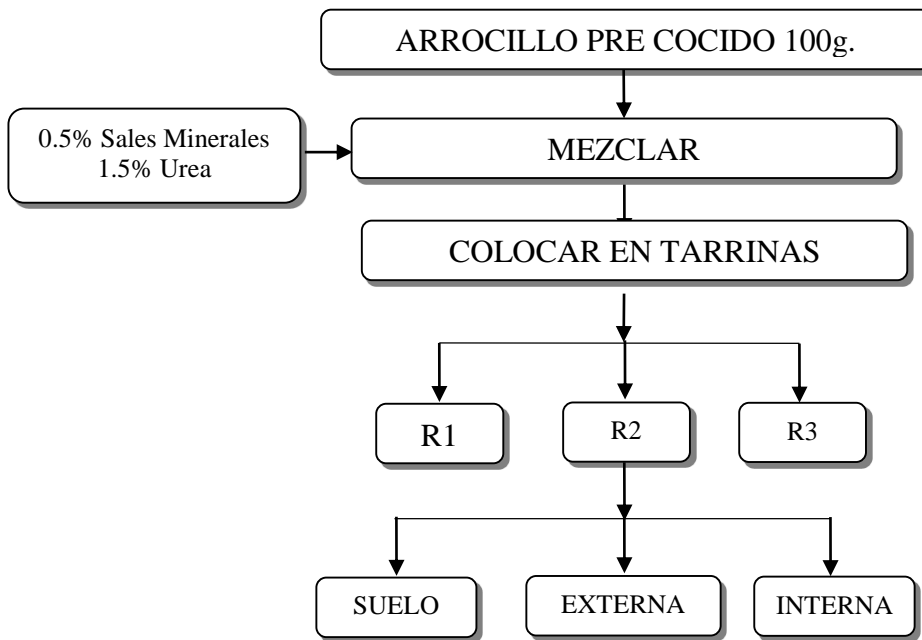


Figura 4. Diagrama de bloques elaboración de Trampa 4.



Los sustratos son los mismos para la zona 1 y 2 a continuación, se detallan y codifican los sustratos:

T1Z1 (Melaza 60% + agua 40 ml de agua)

T2Z1 (Suero láctico 80% + 20 ml de agua)

T3Z1 (Arroz pre cocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%)

T4Z1 (Arroz pre cocido 100%).

T5Z1 (Melaza 60% + agua 40 ml de agua)

T6Z1 (Suero láctico 80% + 20 ml de agua)

T7Z1 (Arroz pre cocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%)

T8Z1 (Arroz pre cocido 100%).

Tabla 7. Captura de microorganismos en tres ambientes

Zonas	Código	Ambiente
	Sustrato	
	T1Z1	
Lácteos del	T2Z1	Suelo
Oriente (Z1)	T3Z1	Área
	T4Z1	Externa
		Área
		Interna
	T5 Z2	
Panelera las	T6Z2	Suelo
Américas (Z2)	T7Z2	Área
	T8Z2	Externa
		Área
		Interna

Fuente: (Salagata ,2018).

Recolección de muestras.

Las trampas con los sustratos se colocaron en tres ambientes: suelo (30 cm de profundidad); área externa (3 m a la redonda) y área interna (planta de procesamiento), con tres réplicas, durante 5 días. Las muestras recolectadas se trasladaron al laboratorio.

Preparación de medio de cultivo

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 15min, verificándose con una prueba de solidificación si el medio está listo para esterilizar en el autoclave durante 15 min a 121 °C. A continuación, se llevó a la cámara de flujo laminar, dejar enfriar por 10 minutos y esterilizar con luz UV por 10 minutos, se dispense 20 ml del medio en placas Petri.

Procesamiento de muestras y siembra inicial.

El procesamiento de las muestras de los sustratos se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología. Se emplearon diluciones de 10⁻³ y 10⁻⁷ , se realizó la siembra en Agar MRS, con el fin de realizar la prueba para determinar si los microorganismos están presentes en una

muestra, aplicando la metodología de Carrillo & Lozano, (2008) presencia-ausencia del crecimiento de microorganismos.

ETAPA II:

- Captura de BAL en el ambiente de mayor crecimiento.

La captura de BAL se realizó en el ambiente interno, aplicando la metodología de Campo *et al.*, (2014). Se prepararon las trampas con los sustratos detalladas anteriormente.

Las trampas fueron colocadas en el área interna (planta de procesamiento), con tres réplicas, durante 5 días; posteriormente fueron trasladadas al laboratorio para determinar el mejor sustrato para la captura de BAL.

Preparación de solución.

En el laboratorio se pesó 10g de cada una de las trampas y se tomaron 90 ml de agua destilada en un Erlenmeyer a continuación, se colocó la muestra en el agitador magnético por un tiempo de 5 minutos hasta homogenizar la muestra.

Preparación de medio de cultivo

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, verificándose con una prueba de solidificación si el medio está listo para esterilizar en el autoclave durante 15 min a 121 °C.

A continuación, se llevó a la cámara de flujo laminar, dejar enfriar por 10 minutos y esterilizar con luz UV por 10 minutos, se dispense 20 ml del medio en placas Petri.

Preparación del inóculo bacteriano

Se realizó diluciones seriadas en base 10 hasta 10⁻⁷ aplicando la metodología de Rodríguez, (2011), tomando como referencia los resultados del muestreo inicial realizado previamente. Cada muestra en estudio se suspendió en una dilución de 10⁻⁷ en agua destilada estéril en tubos de ensayo. Con esta concentración se logró un crecimiento necesario para llevar a cabo el aislamiento de BAL.

Inoculación de las placas de Agar

Con una micro pipeta se tomó 1 mL 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, se rotularon las placas Petri y se procedió a incubar a 27 °C durante 48 h.

Tabla 7. Diseño experimental Crecimiento de BAL en diferentes sustratos

Factor	Repeticiones	Interacción
T1 Z1	R1	T1R1C7
	R2	T1R2C7
	R3	T1R3C7
T2 Z1	R1	T2R1C7
	R2	T2R2C7
	R3	T2R3C7
T3 Z1	R1	T3R1C7
	R2	T3R2C7
	R3	T3R3C7
T4 Z1	R1	T4R1C7
	R2	T4R2C7
	R3	T4R3C7
T5 Z2	R1	T5R1C7
	R2	T5R2C7
	R3	T5R3C7
T6 Z2	R1	T6R1C7

	R2	T6R2C7
	R3	T6R3C7
T7 Z2	R1	T7R1C7
	R2	T7R2C7
	R3	T7R3C7
T8 Z2	R1	T8R1C7
	R2	T8R2C7
	R3	T8R3C7

Elaborado por: (Salagata ,2018).

Característica del diseño experimental.

Para llevar a cabo esta investigación se realizó lo siguiente especificado en la Tabla 9.

Tabla 8.Características del diseño experimental.

Variable independiente	1
Número de tratamientos	8
Numero de repeticiones	3
Unidades experimentales	24

Elaborado por: (Salagata, 2018).

Modelo Estadístico

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

En donde:

- Y_{ij} Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental
- μ Efecto de la media general
- t_i Efecto del i-esimo tratamiento
- ϵ_{ij} Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

Esquema del experimento.

A continuación, se plantea el esquema del experimento con los tratamientos, réplicas y unidades experimentales, se detalla en la Tabla 10.

Tabla 9.Esquema del experimento.

Tratamientos	Replicas	Unidades experimentales	Subtotal
T1Z1	3	1	3
T2Z1	3	1	3
T3Z1	3	1	3
T4Z1	3	1	3
T5Z2	3	1	3
T6Z2	3	1	3
T7Z2	3	1	3
T8Z2	3	1	3
		Total	24

Elaborado por: (Salagata, 2018).

ETAPA III:

- **Aislamiento de BAL.**

Al observar el crecimiento de BAL en las placas Petri de Agar MRS, se seleccionan las placas Petri con crecimiento de BAL, se procedió al aislamiento, aplicando la técnica de Fiallos, (2017). A partir de cada una de las BAL se realizó la resiembra en tubos con Agar MRS distribuido en forma de picos de flauta, que se incubaron a 27 °C durante 48 h, a fin de obtener cultivos puros o monoclonales para los ensayos posteriores.

Identificación de bacterias ácido lácticas.

En la identificación de BAL se aplicó la metodología de Ortiz, (2006), en la que se realizó la tinción de Gram y se observan las características morfológicas tanto macroscópicas o coloniales que se utilizan a partir del aislamiento.

Morfología de colonias.

Se observó la forma, el color, la opacidad y la consistencia de las colonias que crecieron en agar MRS luego de 48 h de incubación a 27°C.

Tinción de Gram y morfología al microscopio

Se aplicó la metodología de Ortiz, (2006), se extendió la colonia en el centro de un portaobjeto de vidrio y se fijó con calor, se tiñe con la solución cristal-violeta (por un minuto), se cubre con Lugol (se dejó reaccionar 30 segundos) y se enjuagó con agua. Posteriormente se realizó una decoloración con alcohol/acetona (durante 15 segundos), se enjuagó nuevamente con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. La tinción de Gram dependerá del espesor, la estructura física y la permeabilidad de la pared bacteriana. Las bacterias Gram (+) se tiñen de color púrpura en cambio las bacterias Gram se tiñen de rosado. La morfología y coloración se observaron en un microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100X.

Pruebas fisiológicas

Para llegar a una identificación fina de las BAL se consideran las características fisiológicas que se detallan a continuación (Ortiz, 2006):

Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37 y 45°C).

Se procede a preparar medio de cultivo MRS: en la cámara de flujo laminar se dispensa el medio de cultivo en las cajas Petri y se siembran las once BAL, por cada temperatura con un total de 33 cajas Petri, estas se colocaron a diferentes temperaturas en diferentes incubadoras por un tiempo de 24 horas.

Mantilla & Portacio, (2012) mencionan que la sobrevivencia y resistencia a estas temperaturas se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC).

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2,4 y 6.5%).

Se procede a preparar medio de cultivo MRS, se dispensa en las cajas Petri, a continuación, se siembran las once BAL seleccionadas, la prueba se realiza a diferentes concentraciones de 2, 4 y 6.5% (incubación a 27 °C durante 24 horas), se realiza 1 por cada concentración resultando 33 cajas Petri, (Rondón *et al.*, 2008) menciona que al finalizar el tiempo se determina el crecimiento a altas concentraciones de NaCl mediante la cuantificación de (UFC).

- Conservación del Banco de BAL.

En la conservación de BAL se aplicó la metodología de Rodríguez, (2003), en la que especifica que en los medios suelen incluirse, además, agentes crioprotectores como el glicerol hasta que cubra la muestra del tubo de ensayo, las BAL se conservaron a una temperatura de -5°C.

3.8. RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES.

3.8.1. Recursos Humanos

Tabla 10. Personal de Investigación.

PERSONAL DE INVESTIGACIÓN	
RECURSOS HUMANOS	Dra. Ana Chafla (Directora del proyecto)
	Ing. Luis Díaz (Técnico de laboratorio de Microbiología)
	Dr. Manuel Pérez (Consultor de la investigación)
	Dr. Amaury Pérez (Consultor de la investigación)

Elaborado por: (Salagata, 2018).

3.8.2. Equipos

Tabla 11. Equipos.

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave	1
Agitador magnético	1
Balanza analítica	2
Computadora	1
Cámara de flujo laminar	1
Estufa	1
Esterilizador	1
Incubadora	1
Microscopio	1
Congelador	1

Elaborado por: (Salagata, 2018).

3.8.3. Materiales

Tabla 12. Materiales

MATERIALES	CANTIDAD
Aluminio	1
Cajas Petri	70
Dispensador	
Erlenmeyer	16
Fosforera	1
Lienzo	80
Ligas	80
Matraz	3
Mechero	1
Marcador	2
Pala de mano	1
Porta y cubre objetos	20
Tarrinas de plástico	75
Vidrio reloj	3
Vaso de precipitación	2

Fuente: (Salagata, 2018).

3.8.4. Insumos

Tabla 13. Insumos

INSUMOS	CANTIDAD
Alcohol	1 L
Agua destilada	1 L
Cristal violeta	2 g
Lugol	1g
Melaza	1 L
Medio de cultivo	50 g
Residuos de arroz pre cocido	1 Kg
Suero lácteo	1 L
Sales minerales	20 g
Safranina	1 g
Urea	50 g

Elaborado por: (Salagata, 2018).

3.8.5. Instalaciones

- Industrias Lácteos del Oriente y Panelera Las Américas.
- Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS.

- **Determinación de la metodología de captura de bacterias ácido lácticas nativas en la Panelera las Américas y Lácteos del Oriente.**

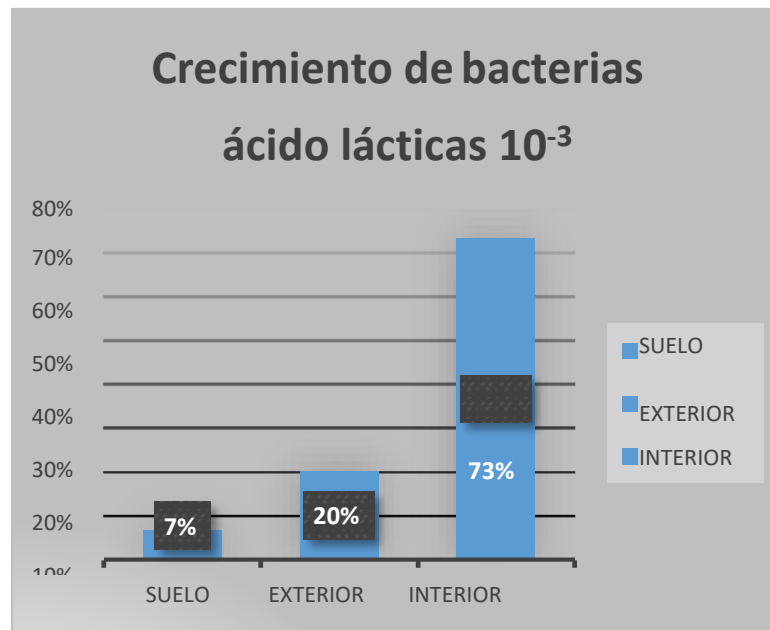
Se determinó con la técnica presencia-ausencia el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en cada zona. En la tabla 15 se observa el crecimiento bacteriano en los tres ambientes. Para la zona 1: (Lácteos del Oriente) a una dilución 10⁻³, se encontró 15 BAL que crecieron en cultivo selectivo Agar MRS que corresponde al 100%. En el suelo se determinó 1 BAL (7%); en el área externa con 3 BAL (20%) y en el área interna 11 BAL que corresponde al 73% ver figura 5.

Tabla 14. Captura de bacterias ácido lácticas Zona 1: Lácteos del Oriente.

LACTEOS DEL ORIENTE													
DILUCIÓN	REPETICIÓN	SUELO				ÁREA EXTERNA				ÁREA INTERNA			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
-7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1

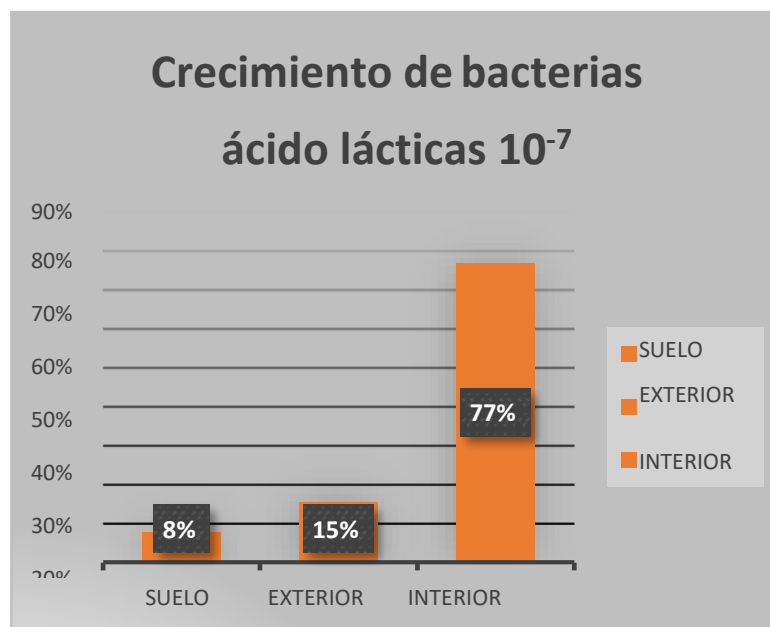
Elaborado por: (Salagata, 2018).

Figura 5. Crecimiento de bacterias ácido lácticas Dilución 10^{-3} Z1.



Con respecto al crecimiento de BAL en la dilución 10^{-7} , las BAL que crecieron en el medio selectivo se evidencia en la Figura 6.

Figura 6. Crecimiento de bacterias ácido lácticas 10^{-7} Z1.



En la Zona 2 dilución 10^{-3} que corresponde a la Panelera las Américas se evidenció un crecimiento total de 13 BAL. En el suelo se encontró 1 BAL que representa el (8%); para el área

externa se determinó 3 BAL que representa el (23%) y para el área interna 9 BAL correspondientes al (69%) ver tabla18, figura 7.

Tabla 15.Captura de bacterias ácido lácticas Zona 2: Panelera las Américas.

PANELERA LAS AMÉRICAS													
DILUCIÓN	REPETICIONES	SUELO				ÁREA EXTERIOR				ÁREA INTERIOR			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
	3	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
-7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0

Elaborado por: (Salagata, 2018).

Estudios Similares determinaron la presencia de BAL en diferentes ambientes (González et al., 2015), determinó la presencia del género *Lactobacillus* al realizar el aislamiento de microorganismos autóctonos en diferentes ambientes de suelos donde se cultiva y se almacena caña de azúcar.

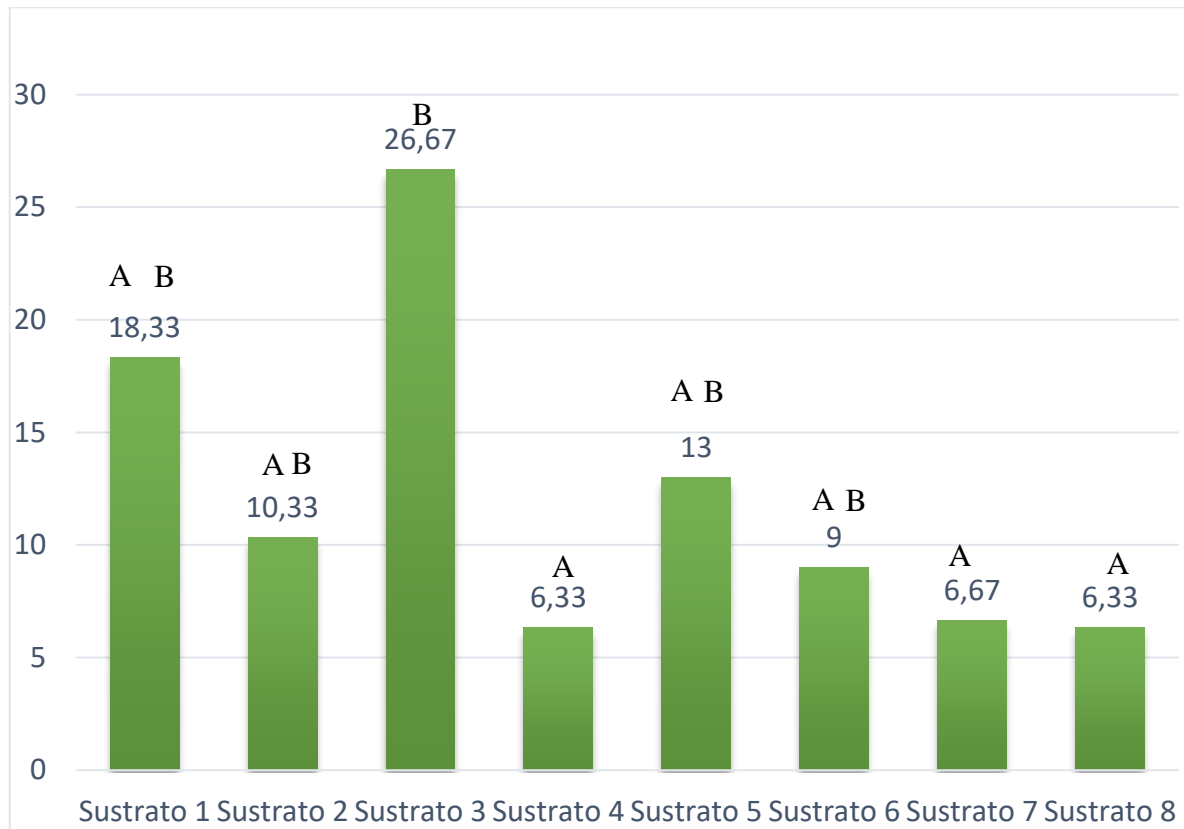
Sossa et al., (2009), menciona que al realizar el aislamiento e identificación de *Lactobacillus* contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica determinaron en los tanques de fermentación un recuento de BAL de 10⁶ UFC/mL .

En un estudio realizado por Mark Wilcox, (2014), comprobó la propagación de *Lactobacillus* en un 48%, en baños públicos a una distancia de dos metros, tras simular contaminación con BAL en las manos de los usuarios al utilizar el secador de manos.

- Determinación de la composición y concentración óptima del sustrato de captura.

El mejor sustrato resulto el sustrato 3 T3Z1, presento mayor crecimiento microbiano, con una dilución 10⁻⁷ del (área interna), Al comparar las medias de sustratos con la prueba de Tukey se determina que existe diferencia significativa de (P< 0,0087) con los sustratos: sustratos T4Z1, T7Z2 y T8Z2 a diferencia de los sustratos T6Z2, T2Z1, T5Z2, T2Z1, T3Z1 comparten significancia ver figura 9.

Figura 7. Crecimiento de colonias en los distintos sustratos.



Un estudio realizado por Narayanan *et al.*, (2004) determinaron que las BAL seleccionan, como sustrato de fácil asimilación la lactosa para su proliferación, sin embargo, sustratos de sacarosa fueron poco empleados en la producción de ácido láctico.

García *et al.*, (2017) manifestaron que para la producción de ácido láctico por vía tecnología emplean materias primas baratas, entre estos sustratos se encuentran los celulósicos, amiláceos, el lactosuero y la melaza. La presente investigación el sustrato T3Z1 contiene (Arroz pre cocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%) sustratos similares a los empleados por los autores Campo *et al.*, (2014), Ossa *et al.*, (2010), Ortiz, (2006).

- **Obtención de cepas para la generación de un banco de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico.**

Para la obtención del banco de BAL, se partió de la captura de BAL en el ambiente interno de las plantas procesadoras Zona 1 Lácteos del Oriente y la Z 2 Panelera las Américas, donde se

obtuvieron 24 BAL que crecieron en el medio selectivo Agar MRS a las que se les realizaron las pruebas de identificación fenotípica, detallada en la tabla 22, ver anexo 13.

Tabla 16.Características Fenotípicas.

Nº muestra	Morfología de Colonias	Gram	Morfología a microscopio
11LAC	Colonias medianas, blancas	+	Cocos
12LAC	Colonias pequeñas, opacas	+	Cocos
13LAC	No visible	-	-
21LAC	Colonias grandes, traslúcidas	+	Cocos
22LAC	No visible	-	-
23LAC	No visible	-	-
31LAC	Colonias pequeñas, lechosas	+	bacilos cortos
32LAC	Colonias pequeñas	+	Cocos
33LAC	No visible	-	-
41LAC	Colonias medianas, blancas	+	bacilos cortos
42LAC	Colonias pequeñas, opacas	+	Cocos
43LAC	No visible	-	-
51PAN	Colonias medianas, blancas	+	Cocos
52PAN	No visible	-	-
53PAN	No visible	-	-
61PAN	Colonias medianas, blancas	-	-
62PAN	Colonias medianas, blancas	+	Cocos
63PAN	No visible	-	-
71PAN	Colonias medianas, opaca	+	Cocos
72PAN	No visibles	-	-
73PAN	No visible	-	-
81PAN	No visible	-	-
82PAN	No visible	-	-
83PAN	No visible	-	-

Elaborado por: (Salagata, 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron 11 cepas que fueron Gram (+), las mismas se observaron al microscopio y mostraron dos morfologías diferentes: bacilos y cocos,

características fenotípicas propias del género *Lactobacillus*, establecidas en la bibliografía citada por Henick, (1988) y Buchanan & Gibbons, (1975). Los resultados en la identificación fenotípica en la presente investigación, son similares a los obtenidos en los trabajos de Garcia, (2016), García, (2013) y Rondón et al., (2008).

Crecimiento a diferentes Temperaturas 10, 37 y 45°C en Agar MRS.

Casi todas las colonias crecieron a 10, 37 y 45°C en placa Petri de cultivo MRS, demostrando la viabilidad de las mismas, con la excepción de las BAL 42 LA y 61,62 PA que no crecieron a 10°C en placa, la BAL 32, 42 LA que no crecieron a 37°C en placa. A 45°C mostraron crecimiento casi todas las BAL a excepción de la 42 LA. Estos datos se encuentran detallados en la tabla 23, ver anexo 15.

Crecimiento a diferentes Temperaturas 10, 37 y 45°C en Agar MRS.

Casi todas las colonias crecieron a 10, 37 y 45°C en caldo y en placa, demostrando la viabilidad de las mismas, con la excepción de la colonia 5,6 y 11 que no creció a 10°C en placa, la colonia 4 y 11 que no creció a 37°C en placa. A 45°C hubo crecimiento en todas las cepas menos en la 11. Estos datos se encuentran detallados en la tabla 23 y se puede observar el crecimiento de las colonias a 10,37 y 45°C ver anexo 15.

Tabla 17.Crecimiento a diferentes temperaturas en Agar MRS.

N° muestra	Temperatura		
	10°C	37°C	45°C
11LAC	1 UFC	120 UFC	32 UFC
12LAC	10 UFC	40 UFC	6 UFC
21LAC	2 UFC	160 UFC	8 UFC
31LAC	1 UFC	64 UFC	132 UFC
32LAC	1 UFC	-	8 UFC
41LAC	1 UFC	1UFC	37 UFC
42LAC	-	-	-
51PAN	7 UFC	160 UFC	88 UFC
61PAN	-	36 UFC	224 UFC
62PAN	-	96 UFC	144 UFC
71PAN	1 UFC	40 UFC	64 UFC

Elaborado por: (Salagata, 2018).

La temperatura es un parámetro significativo que afecta el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos, con variaciones entre los diferentes géneros. En la presente investigación las cepas 1,2,3,7,8,9,10 demostraron estabilidad y su crecimiento no fue afectado por la variación

de temperatura, parámetro considerado para bacterias con características probióticas de acuerdo con (L. Ramírez, Montoya, & Zea, 2013).

En la presente investigación se demostró que el crecimiento en la mayoría de las cepas fue a 37 y 45°C, sin embargo, a 10°C se desarrollaron las cepas 1,2,3,7,8,9,10. Los valores obtenidos difieren con los trabajos de Rondón et al., 2008, que no observaron crecimiento a temperatura de 45°C, mientras que similares resultados fueron reportados por de Mantilla y Burgos Portacio, 2012, que observaron crecimiento a una temperatura de 43°C.

Crecimiento a diferentes Concentraciones de NaCl en Agar MRS.

La temperatura es un parámetro significativo que afecta el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos, con variaciones entre los diferentes géneros. En la presente investigación las BAL 11,12,21,31,41 LAC y 51,71 PAN demostraron estabilidad y su crecimiento no fue afectado por la variación de temperatura (37, 45°C y 10°C), parámetros considerado para bacterias con características probióticas mencionado por Ramírez *et al.*,(2013).

Los valores obtenidos en la presente investigación, difieren con los trabajos de Rondón *et al.*, (2008), que no observaron crecimiento a temperatura de 45°C, sin embargo, los resultados son similares a los reportados por Mantilla *et al.*, (2012), que observaron crecimiento a una temperatura de 43°C.

Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl en Agar MRS.

Las BAL mostraron crecimiento en las concentraciones de NaCl al 2,4 y 6.5 %, característica propia del género *Lactobacillus* que crece en altas concentraciones de NaCl, a excepción de la BAL 32 LAC que no presentó crecimiento al 2%. Las BAL 12 y 42 LAC no evidenciaron crecimiento a 6.5%. Estos datos se detallan en la tabla 24, ver anexo 14.

Tabla 18. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl en Agar MRS.

N° muestra	Concentraciones		
	2%	4%	6.5%
11LAC	80 UFC	576 UFC	760 UFC
12LAC	7 UFC	3 UFC	-
21LAC	19 UFC	9 UFC	42 UFC
31LAC	312 UFC	64 UFC	14 UFC
32LAC	-	100 UFC	57 UFC
41LAC	10 UFC	2 UFC	16 UFC
42LAC	-	3 UFC	-
51PAN	31 UFC	37 UFC	55 UFC
61PAN	328 UFC	400 UFC	288 UFC
62PAN	240 UFC	352 UFC	296 UFC
71PAN	360 UFC	120 UFC	360 UFC

En la presente investigación los resultados encontrados difieren con los trabajos de Arteaga *et al.*, (2017), Mantilla & Portacio, (2012), que obtuvieron crecimiento muy bajo al 7 % de NaCl; sin embargo, observaron crecimientos al 10% de NaCl. Las 11 BAL seleccionadas se sometieron a un proceso de conservación que consistió en añadir glicerol en los tubos de ensayo hasta cubrir el medio y conservar el banco BAL en congelación a una temperatura de -5°C de acuerdo a Rodríguez, (2003) son conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica.

4.2. DISCUSIÓN.

La melaza de caña por ser un subproducto de la industria azucarera, contiene impurezas en su composición y frecuentemente se contamina con bacterias ácido lácticas. Se ha demostrado que las melazas, a pesar de su bajo contenido en nitrógeno y fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, como hongos y bacterias Ortiz *et al.*, (2008).

En la presente investigación se utilizó la metodología de varios autores, Ossa *et al.*, (2010) utilizando melaza de caña como sustrato iniciador que contiene componentes esenciales que favorecen el crecimiento de BAL, (Campo *et al.*, 2014), utiliza el arrozillo pre-cocido como carbohidratos, (Díaz *et al.*, 2014) empleando suero lácteo como sustrato en la elaboración de las trampas para la captura de BAL.

El crecimiento de los aislados a altas temperaturas, además de tener valor taxonómico, demostró la capacidad de estos microorganismos para crecer en condiciones extremas. Las

bacterias que presentan estas características manifiestan mayor capacidad de crecimiento y pueden proliferar en el tracto gastrointestinal, donde la temperatura es superior a los 37 °C (Arteaga *et al.*, 2017).

La identificación de BAL se hizo con una combinación de las pruebas morfológicas y fisiológicas; en relación a su morfología de bacilos, cocos, su tinción de Gram positivos, las BAL seleccionadas fueron identificadas en el género *Lactobacillus* y las bacterias pertenecientes a este género, han sido las más utilizadas hasta el momento para la obtención de biopreparados con propiedades probióticas, ya sea de forma individual o en combinación con otros microorganismos y/o metabolitos (Rondón *et al.*, 2008).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. CONCLUSIONES.

- Se determinó la metodología para la captura de BAL, de acuerdo al mayor crecimiento en el ambiente interno de las plantas de procesamiento Zona 1: (Lácteos del Oriente y Zona 2: Panelera las Américas).
- Se determinó que el mejor tratamiento es T3Z1, contiene como sustratos (Arroz precocido 50% + melaza 25% + suero láctico 25%), ubicado en Lácteos del Oriente el que presento mayor crecimiento de BAL.
- Mediante las pruebas de identificación realizado a las 24 BAL que crecieron en medio de cultivo selectivo Agar MRS, 11 BAL tuvieron características del género *Lactobacillus* en relación a su morfología de bacilos, cocos, su tinción de Gram positivos y las pruebas fisiológicas, las BAL fueron conservadas con glicerol en congelación a una temperatura de -5°C, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica.
-

5.2.RECOMENDACIONES.

- Realizar pruebas moleculares a las cepas de BAL para identificar la especie.
- Utilizar nuevas fuentes de residuos agroindustriales como sustrato para la obtención de BAL
- Realizar estudios del efecto probiótico de las BAL autóctonas obtenidas en la presente investigación en la producción animal.

CAPÍTULO VI

6.1. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, D., Jaimes, J. D. C., & Espitia, C. R. (2015). Efecto de la adición de lactosuero al queso costeño amasado. *Revista Cielo, Información tecnológica, Vol 26(2)*, 11-16.
- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Linares, G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Revista Agroindustrial Science, 5(1)*, 37-47.
- Aragón, J. (2015). Evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno en fermentación láctica. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.
- Arteaga, F., López, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milián, G., Barrios, V., & Bocourt, R. (2017). Selección e identificación de aislados de *Bacillus* spp. del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Pastos y Forrajes, 40(1)*, 55-64.
- Arteaga, P. (2011). Diseño de un Medio de Cultivo Alternativo para la Cepa Láctica BAL-C Productora de una Sustancia Tipo Bacteriocina (STB) Inhibitoria de *Listeria monocytogenes*.
- Ballesta, R. (2017). Introducción a la contaminación de suelos: Mundi-Prensa Libros. Madrid-España.
- Buchanan, R., & Gibbons, N. (1975). Gram-positive, asporogenous, rod-shaped bacteria. *Bergeys Manual of Determinative bacteriology*.
- Cajas, A. (2017). Caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) nacional y trinitario, Quevedo. Quevedo: UTEQ.
- Campo, A., Acosta, R., Morales, S., & Prado, F. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (mm) en la producción de acelga en la meseta de popayán. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12(1)*, 79-87.

- Campo, M., Cástulo, I., & Gómez, H. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*, 6.
- Casas, L., Sandoval, L., & Coral, G. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales.
- Carrillo, E & Lozano A, Lavidación del método de detección de Coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromcult. *Microbiología Industrial*. Universidad de Javeriana. Bogotá DC.
- Díaz, B., Iglesias, A., & Valiño, E. (2014). Consorcios microbianos con actividad acidoláctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes. *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 17-26.
- Espinosa, R. M., Wang, R., & Carrillo, J. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 17(2), 77-83. *Producción de Saccharomyces cerevisiae*. Microbiología Industrial. Bogotá DC.
- Fernández, L., & Sosa, M. (2000). *Lactobacillus spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*: Editorial Universitaria.
- Fiallos, J. (2017). *Determinación de la correlación entre métodos visuales ópticos y difusión en placa en el crecimiento de Escherichia coli*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Gaitán, D. (2013). *Aislamiento y evaluación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente*. Universidad Javeriana: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/11814>.
- Garcés, A., Berrio, L., Ruíz, S., Serna, J., & Builes, A. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista lasallista de investigación*, 1(1).
- García, A. (2016). Aislamiento, caracterización y determinación del potencial probiótico de

- bacterias lácticas de pollos. Facultad de Ciencias Veterinarias. RIDAA, UNICEM.
- García, G., Arrázola, G., & Durango, A. (2017). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Revista Temas: Agrarios*.
- García, J. (2013). Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. *Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería*. Pachuca de Soto.
- García, Y., Elías, A., Albelo, N., Herrera, F., Núñez, O., & Dieppa, O. (2008). Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2).
- Giraldo, D., & Medina, O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 193-209.
- González, M., Pérez, S., Wong, A., Bello, R., & Yañez, G. (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista argentina de microbiología*, 47(3), 229-235.
- Henick, K. (1988). Yeast and bacterial control in winemaking *Wine analysis* (pp. 276-316): Springer.
- Hernández, J. (2017). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Mutis*, 4(1), 33-39.
- Hernández, M., & Vélez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22.
- Huertas, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *REVISTA*, 8(1), 93-105. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*.
- Jakymec, M., Morán, H., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2001). Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica*, 11(1).

- Jiménez, E. (2017). *Estudio del efecto de la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de arrochillo en la producción de pan*. Quito, 2017.
- Mantilla, C., & Portacio, Á. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 31-40.
- Martínez, Y., Quiróz, M., Ledezma, A., & Jaramillo, J. (1988). Producción de ácido láctico a partir de melaza pretratada utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. *Rev. latinoam. microbiol*, 30(2), 209-214.
- Milián, G., Pérez, M., & Bocourt, R. (2008). Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2).
- Muirragui, A., & Pilar, A. (2012). *Determinación de la influencia del tiempo de cosecha sobre el rendimiento de granos enteros en el pilado y la calidad fisiológica de las semillas de arroz*. Quevedo. Quevedo: UTEQ.
- Muñoz, A. (2006). Optimización de la producción de la enterocina AS-48 y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos. *Granada, España. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. 304p*.
- Muñoz, D., Matta, A., & Guarín, M. (2014). Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustible y biorefinería. *Revista Scielo Colombia*, 12(2).
- Ortiz, Á., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., . . . Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 138-148.
- Ortiz, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. UAEH Biblioteca Digital.
- Ossa, J., Vanegas, M., & Badillo, Á. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 97-104.

- Peñuela, M., Vargas, G., Torres, A., & Ríos, R. (2016). Evaluación de medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico, con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad de Ingeniería*(24), 35-39.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403.
- Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., González, J., & Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Centro de Investigación de Alimentos*, 2(7). Nayarit.
- Ramírez, L., Montoya, O., & Zea, J. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. *Producción+ Limpia*, 8(1).
- Rodríguez, L. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Jirona.
- Rodríguez, J. (2005). Aislamiento e identificación de microorganismos con presuntivo potencial probiótico a partir de heces de animales de producción industrial. Universidad de Javeriana. Bogotá, D.C.
- Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., & Ranilla, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 56-35.
- Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., . . . Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *CYTA-Journal of Food*, 6(1), 56-63.
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 36, 124-129.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro.

BioTecnología, 16(2), 14-46.

Sossa, D., González, L., & Vanegas, M. (2009). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2), 163-172.

Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica*, 14(4).

Vera, Y., Vargas, J., & Peñaranda, M. (2015). Evaluación de ensilajes a partir de residuos de post-cosecha de arroz tratados con bacterias ácido lácticas. *Alimentos Hoy*, 23(36), 62-74.

CAPÍTULO VII

7.1. ANEXOS.

7.1.1 Anexo 1. Preparación de las trampas.



7.1.2. Anexo 2. Colocación de las trampas: Suelo, Área Externa, Área Interna en la Zona: 1y Zona: 2.



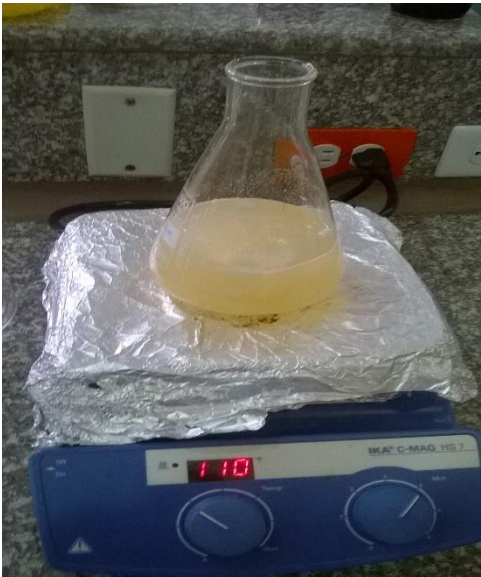
7.1.3. Anexo 3. Recolección de trampas.



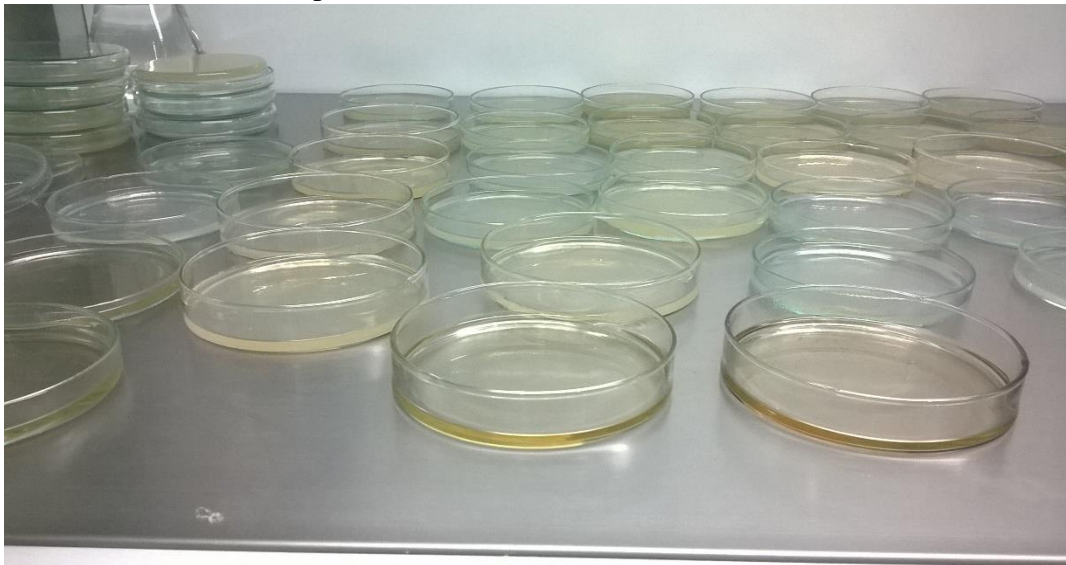
7.1.4. Anexo 4. Preparación de soluciones de las muestras.



7.1.5. Anexo 5. Preparación de medio de cultivo.



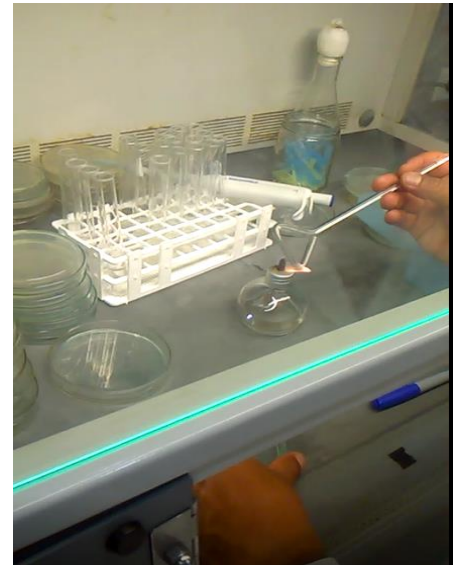
7.1.6. Anexo 6. Dispensar el medio de cultivo.



7.1.7. **Anexo 7.** Preparación de Diluciones a la $^{-3}$ y $^{-7}$.



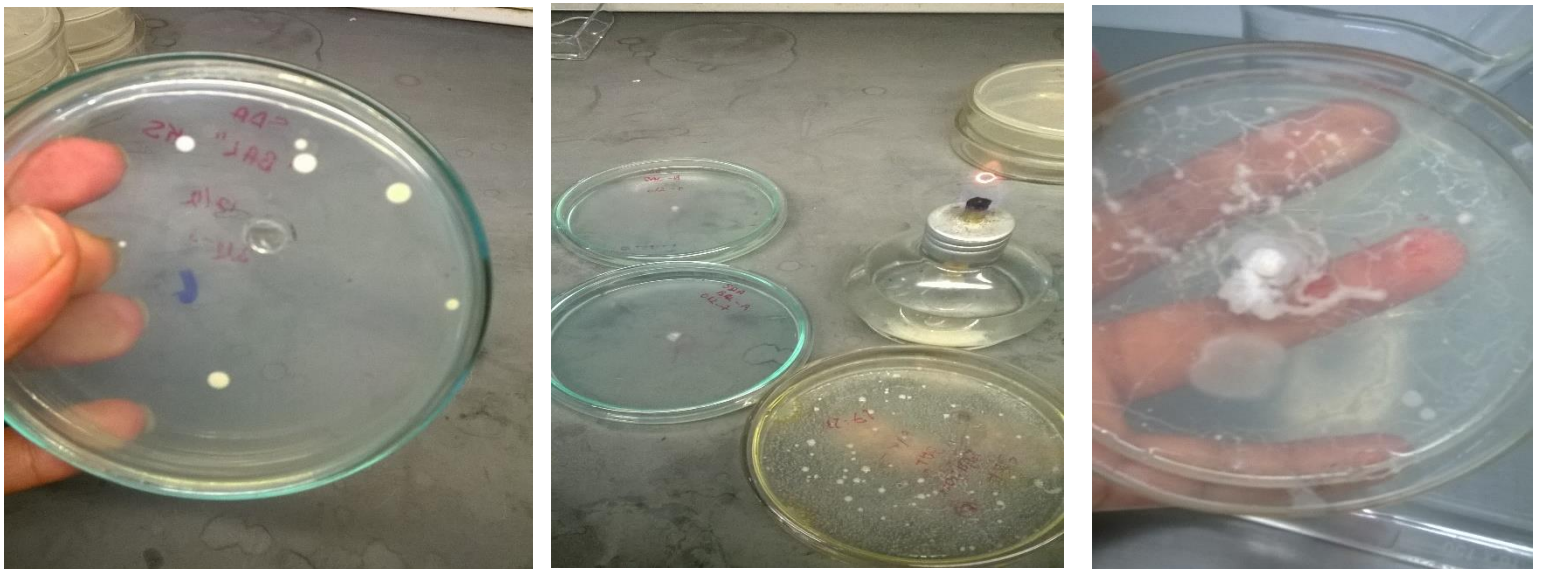
7.1.8. **Anexo 8.** Siembra de las Diluciones.



7.1.9. Anexo 9. Cuantificación de bacterias ácido lácticas.



7.1.10. Anexo 10. Selección y siembra de bacterias ácido lácticas.



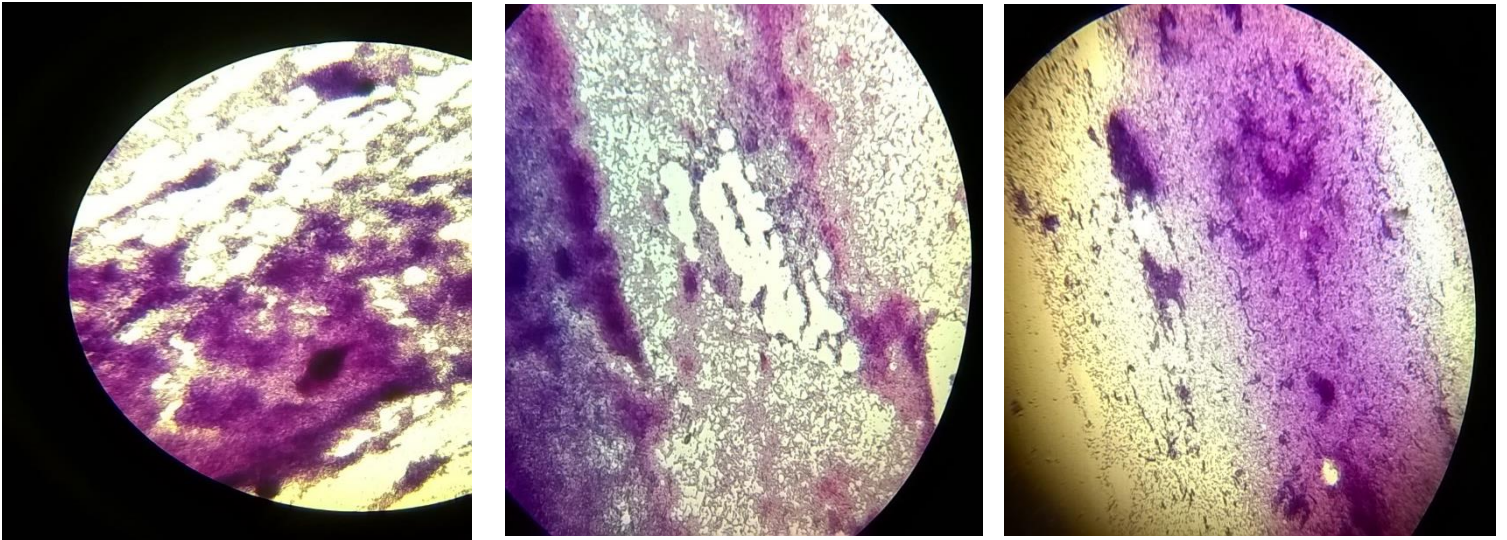
7.1.11. Anexo 11. Cultivo puro de bacterias ácido lácticas.



7.1.12. Anexo 12. Pruebas de Identificación morfológica tinción de Gram.



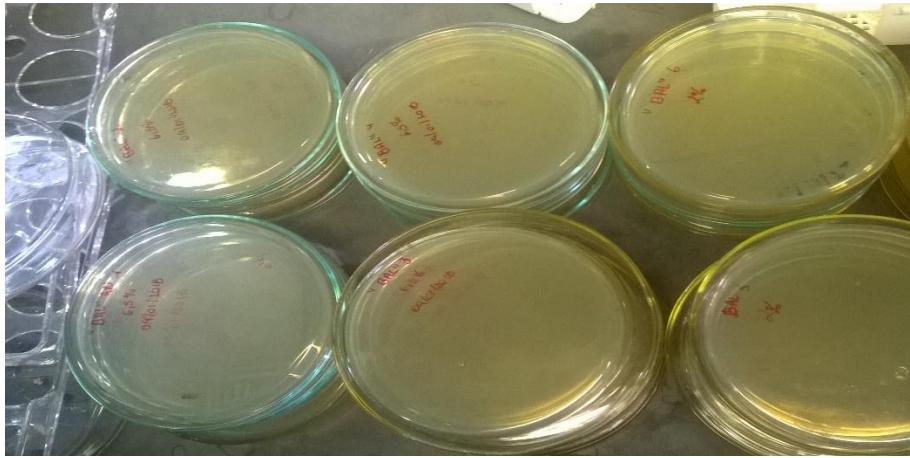
7.1.13. Anexo 13. Observación en el microscopio.



7.1.14. Anexo 14. Pruebas Bioquímicas: Crecimiento de BAL en NaCl al 2, 4 y 6.5%.



7.1.15. **Anexo 15.** Pruebas Bioquímicas: Crecimiento de BAL a diferentes temperaturas 10, 37 y 45 °C en Agar MRS.



7.1.16. **Anexo 16.** Banco de Cepas.



7.1.17. Anexo 17. Conservación del Banco de Cepas.

