

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Líder en Ciencia y Tecnología

**Curva Cinética de Crecimiento de Microorganismos Ácido Lácticos
Aislados durante la Fermentación de Caparazón de Camarón**

Trabajo Monográfico presentado por:

Br. Anielka Leonor Valle Luquez
Br. Sandy Melissa Natareno Alvarado

Para optar por el título de:

Ingeniero Químico

Tutor: MPhil. Martha Benavente Silva

Managua, Nicaragua, agosto 2020

DEDICATORIA

A Dios, familia y amigos.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirnos obtener esta victoria, por ser el manantial de vida. Por su infinita bondad y amor, logramos sobrellevar limitantes y encontrar soluciones ante los inconvenientes propios del proceso investigativo.

A nuestros padres y familiares, por sus consejos y soporte incondicional durante nuestras vidas.

Un reconocimiento especial a nuestra tutora MPhil. Martha Benavente Silva por su paciente orientación que permitió el desarrollo de este proyecto.

A nuestro asesor técnico Lic. Alejandro Hernández por su valiosa colaboración.

A la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VRID), por el apoyo y financiamiento a nuestro proyecto de Investigación.

A todos ellos nuestro profundo agradecimiento por ser parte de este proyecto que finalmente ha concluido y nos permite coronar nuestra carrera.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

El trabajo de Diploma titulado "***Cinética de crecimiento de microorganismos ácido-lácticos aislados durante la fermentación de caparazón de camarón***", presentado por las Bachilleres **Anielka Leonor Valle Luquez y Sandy Melissa Natareno Alvarado**, es un importante aporte al estudio de bacterias ácido-lácticas nativas aisladas de desechos industriales pesqueros y su aplicación en procesos biotecnológicos.

Los desechos industriales de las empresas camaroneras y lácteas permiten recuperar materiales de origen biológico, tales como las cepas o metabolitos microbianos *Lactobacillus brevis* 3 y *Lactobacillus Buchneri*. Estas cepas pueden tener diferentes aplicaciones, principalmente en la industria alimentarias, para la fermentación de alimentos para obtener yogurt, quesos, encurtidos, etc.

En el desarrollo de este estudio, las Bachilleres **Anielka Leonor Valle Luquez y Sandy Melissa Natareno Alvarado** demostraron buena organización, una gran capacidad de trabajo, responsabilidad, independencia y destreza en la resolución de problemas de carácter práctico, logrando con ello obtener excelentes resultados.

Como catedrático guía considero que este trabajo cumple con la calidad científica requerida, por lo que solicito a los honorables miembros del tribunal examinador evaluar el gran esfuerzo desarrollado y otorgar a las Bachilleres **Anielka Leonor Valle Luquez y Sandy Melissa Natareno Alvarado** el título de Ingeniero Químico.

RESUMEN

En la presente investigación se llevó a cabo el estudio del efecto de un precursor (extracto de levadura) y uso de dos cepas con características conocidas e identificadas en un medio de cultivo estéril, en la cinética de crecimiento poblacional de las bacterias durante la fermentación ácido láctica con desechos de cabeza de camarón de agua dulce, de la especie *Penaeus vannamei* de la familia Penaeidae, usando suero lácteo y azúcar morena como sustrato.

Las cepas que se utilizaron fueron aisladas de un proceso fermentativo, el cual se llevó a cabo en un biorreactor inicial de 1 L, a temperatura ambiente y sin precursor, por un lapso de 15 días. La carga del reactor fue de 150 g de desechos de caparazón de camarón en base húmeda y 575 mL de suero láctico enriquecido con 57.5 g de azúcar morena.

De igual manera se procedió para el estudio del efecto del precursor extracto de levadura (4 g/L) y uso de dos cepas nativas aisladas (10% de inóculo adicionado) según lo indicado por el diseño experimental, para un total de 12 experimentos de fermentación ácido láctica. El proceso fermentativo fue monitoreado cada 12 horas a través del pH, el porcentaje de acidez total titulable (%ATT) y conteo UFC/ml.

La caracterización de las cepas aisladas en medio agar MRS indicó que las cepas son bacterias anaerobias facultativas fisiológicamente uniformes, cocobacilos, de pared Gram-positiva, oxidasa negativa, sin motilidad y catalasa negativa. Por su parte, la identificación, a través del sistema miniaturizado API 50 CHL, mostró que las cepas aisladas son las cepas *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y *Lactobacillus Buchneri* (cepa B), con un porcentaje de identificación mayor que el 97%.

Los principales resultados del proceso fermentativo mostraron que, en todos los experimentos de fermentación ácido-láctica, hubo una disminución del pH y un aumento en el %ATT producto de la formación de ácido láctico.

La evaluación del efecto del uso de extracto de levadura como precursor de la cinética de crecimiento, reveló que la cepa A no presenta una variación notoria en su cinética de crecimiento y por su parte, en los biorreactores con la cepa B hubo una disminución en su población microbiana. Este comportamiento indica que el extracto de levadura no es un buen precursor para ambas cepas, ya que no acelera la cinética de crecimiento bacteriano.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTO	2
OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA.....	3
RESUMEN	4
TABLA DE CONTENIDO	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1 Crustáceos.....	14
3.1.1 Composición de los desechos de crustáceos	14
3.1.2 Los crustáceos en Nicaragua	15
3.2 La quitina en los crustáceos.....	16
3.3 Métodos de obtención de la quitina.....	16
3.3.1 Método de extracción químico	16
3.3.2 Método biotecnológico de extracción.....	17
3.4 Fermentación	18
3.4.1 Tipos de fermentación	19
3.4.2 Fermentación ácido láctica	20
3.4.3 Factores que influyen en la fermentación.....	21
3.4.3.1 Temperatura.....	22
3.4.3.2 pH	22
3.4.3.3 Suplementos en un proceso microbiológico.....	23
3.5 Bacteria ácido láctica (BAL)	24
3.5.1 Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH	24
3.6 Crecimiento bacteriano.....	24
3.6.1 Curva de crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo.....	25
3.6.1.1 Fase de latencia.....	26
3.6.1.2 Fase exponencial.....	26
3.6.1.3 Fase estacionaria.....	27
3.6.1.4. Fase de muerte	27
3.6.2 Construcción de la curva cinética de crecimiento bacteriano.....	27

3.6.2.1	Cinética de crecimiento	28
3.6.2.2	Velocidad específica de crecimiento (μ)	28
3.6.2.3	Tiempo de duplicación celular	29
3.7	Unidad formadora de colonia (UFC).....	29
3.8	Cultivo o siembra microbiana	29
3.8.1	Características del cultivo.....	30
3.9	Medios de cultivo	30
3.9.1	Tipos básicos de medios de cultivo	31
3.10	Pruebas bioquímicas primarias.....	32
3.11	Métodos microbiológicos tradicionales.....	32
4	METODOLOGÍA.....	34
4.1	Materia prima	34
4.1.1	Desechos de camarón (Cefalotórax):.....	34
4.1.2	Suero lácteo	34
4.1.3	Azúcar morena.....	35
4.2	Reactivos, materiales y equipos de laboratorio	35
4.2.1	Reactivos	35
4.2.2	Cristalería y materiales de laboratorio.....	35
4.2.3	Equipos	36
4.3	Procedimiento.....	36
4.3.1	Aislamiento y caracterización de cepas nativas	36
4.3.1.1	Preparación de los desechos de camarón.....	36
4.3.1.2	Determinación del porcentaje de humedad	37
4.3.1.3	Montaje del biorreactor	37
4.3.1.4	Determinación de la concentración de bacterias	38
4.3.1.5	Aislamiento de las cepas.....	38
4.3.1.6	Caracterización de las bacterias.....	40
4.3.2	Identificación de microorganismos específicos.....	40
4.3.3	Cinética de crecimiento de microorganismos específicos.....	41
4.3.4	Diseño Experimental	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1	Caracterización e identificación de cepas nativas	46
5.2	Cinética de crecimiento de microorganismos específicos.....	50
5.2.1	Efecto del precursor Extracto de levadura.....	50
5.2.2	Tipo de cepa: <i>Lactobacillus brevis</i> 3 (A) y <i>Lactobacillus Buchneri</i> (B).....	55
6.	CONCLUSIONES	60
7.	RECOMENDACIONES.....	61
8.	Referencias Bibliográficas.....	62
	Anexos.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Descripción	Página
3.1	Composición de base seca de desperdicio de Caparazón de Crustáceos	15
3.2	Tipos de fermentación, según microorganismo, sustratos y condiciones.	19
4.1	Descripción de los biorreactores para la preparación de los inóculos.	41
4.2	Factores y niveles de diseño experimental factorial	45
5.1	Descripción de las características e identificación de las cepas obtenidas del segundo aislamiento de colonias nativas del reactor inicial de fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón y suero lácteo	47
5.2	Descripción de las características e identificación de las cepas obtenidas del segundo aislamiento de colonias nativas del reactor inicial de fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón y suero lácteo	49
5.3	Microorganismos específicos aislados de la fermentación ácido-láctica de desechos de cabezas de camarón de agua dulce, de la especie <i>Penaeus vannamei</i> de la familia Penaeidae, suero lácteo y azúcar morena.	50
A.1	Descripción de los equipos utilizados	68
A.2	Cruce de variables independientes del diseño experimental.	70
A.3	Resultados del Experimento 1 del diseño experimental (Cepa B, SP1).	71
A.4	Resultados del Experimento 2 del diseño experimental (Cepa A, SP1).	72

A.5	Resultados del Experimento experimental (Cepa B, SP1).	3	del	diseño	73
A.6	Resultados del Experimento experimental (Cepa A, CP2).	4	del	diseño	74
A.7	Resultados del Experimento experimental (Cepa B, SP1).	5	del	diseño	75
A.8	Resultados del Experimento experimental (Cepa B, CP2).	6	del	diseño	76
A.9	Resultados del Experimento experimental (Cepa A, CP2).	7	del	diseño	77
A.10	Resultados del Experimento experimental (Cepa B, CP2).	8	del	diseño	78
A.11	Resultados del Experimento experimental (Cepa A, SP1).	9	del	diseño	79
A.12	Resultados del Experimento experimental (Cepa A, SP1).	10	del	diseño	80
A.13	Resultados del Experimento experimental (Cepa A, CP2).	11	del	diseño	81
A.14	Resultados del Experimento experimental (Cepa B, CP2).	12	del	diseño	82
A.15	Reactivos y Materiales Api				90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
No.		
3.1	Diagrama de un crustáceo. El cefalotórax incluye el cefalón y el tórax.	14
3.2.	Estructura molecular de la quitina. fuente: (Sabry, 1992)	16
3.3	Diagrama del proceso de extracción de quitina a) Proceso químico b) Proceso biológico	17
3.4	Proceso metabólico de la glucólisis donde se obtiene el ácido láctico. (Illescas, 2018)	21
3.5	Curva de crecimiento de cultivo bacteriano	25
4.1	a) Desechos de camarón (cabezas) en base húmeda utilizada durante la investigación. (b) Instalaciones de la Empresa CAMANICA del Grupo PESCANOVA.	34
4.2	Reactor de vidrio Pyrex con tapa con una capacidad de 1 litro. Fuente (García González, 2018).	37
4.3	(a) materiales utilizados en la determinación y (b) Seriado de diluciones decimales (Fuente: García González, 2018).	38
4.4	(a) cepa seleccionada con su duplicado y (b) cepas obtenidas en tubos con cultivo axénico.	39
4.5	Plantilla plástica del sistema miniaturizado API 50 CH.	40
4.6	(a) Total de reactores obtenidos, (b) reactores recién salidos de autoclave y (c) reactores listos para la adición de la Cepa nativa identificada.	42
4.7	Enjuague e introducción de Cepa A al (a) biorreactor sin precursor y (b) biorreactor con precursor.	43
4.8	(a) biorreactor listo para inocular, (b) Algunos de los reactores montados conforme al diseño experimental y (c) Lectura de placas a 24 horas de incubación.	44
5.1	Comparación de (a) curva cinética de crecimiento y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo de la cepa <i>Lactobacillus brevis</i> 3 (cepa A), sin precursor (SP1) y con precursor (CP2).	52

5.2	Comparación de (a) curva cinética de crecimiento y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo de la cepa <i>Lactobacillus Buchneri</i> (cepa B), sin precursor (SP1) y con precursor (CP2).	55
5.3	Comparación de (a) la curva cinética de crecimiento bacteriano de las cepas <i>Lactobacillus brevis</i> 3 (cepa A) y <i>Lactobacillus Buchneri</i> (cepa B) y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo, sin precursor (SP1).	57
5.4	Comparación de (a) la curva cinética de crecimiento bacteriano de las cepas <i>Lactobacillus brevis</i> 3 (cepa A) y <i>Lactobacillus Buchneri</i> (cepa B) y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo, con precursor.	58
A.1	Diagrama de flujos del proceso de fermentación ácido-láctica de desechos de camarón y suero lácteo enriquecido con azúcar morena, aislamiento, caracterización e identificación bioquímica	69
A.2	Resumen de los pasos para la prueba de Tinción de gram	86
A.3	Coloración de los bacilos (a) Gram positivos y (b) Gram negativos	87
A.4	Ejecución de la Prueba de la catalasa, mostrando una reacción positiva	88
A.5	Prueba de oxidasa Positiva y Negativa	89
A.6	Ejemplo de rayado en placas.	99
A.7	Ejemplo de Tubos inclinado con agar	100
A.8	Ejemplo de rayado en tubos.	100
A.9	Ejemplo de un erlenmeyer con agar solido preparado y (b) Tubos con campana de Durham.	101

1. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua existen 15 empresas procesadoras de camarón y langostinos, que producen alrededor de 46 millones de libras, de los cuales 18 millones se consideran desechos y contaminantes potencialmente peligrosos por su alta carga orgánica (El Nuevo Diario, 2017).

Actualmente, estas empresas han mostrado interés en los últimos estudios realizados en la Facultad de Ingeniería Química (FIQ), de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), como una alternativa de aprovechamiento de los desechos de camarón para la obtención de productos de valor comercial.

Inicialmente, la obtención de estos productos se llevó a cabo por métodos químicos, donde el caparazón era sometido a diferentes procesos: desproteinización con NaOH al 10%, desmineralización con HCl al 1.8 N y despigmentación o blanqueo usando NaClO al 0.38% (Escorcia, Hernández, Sánchez, y Benavente, 2009).

Como un seguimiento a este trabajo y basados en estudios utilizando métodos biológicos (Pacheco López, 2010; Cira, Huerta, Hall y Shirai, 2002), los esfuerzos se han centrado en la obtención de quitina, utilizando bacterias ácido lácticas nativas para la desproteinización y descalcificación del caparazón de crustáceos.

En el estudio realizado por Marcía, Malespín, Sánchez y Benavente (2011), se utilizaron desechos de camarón y langostino en un reactor vertical, evaluando las variables: tiempo de fermentación (2 y 3 semanas) y uso de Inóculo. Los resultados mostraron que al fermentar cefalotórax de camarón durante dos semanas con parámetros iniciales de 10 % p/p de inóculo *lactobacillus spp*, 10% p/p de azúcar de caña como fuente de carbono y 75 % de suero lácteo se lograba mayor estabilidad del proceso y mayor desmineralización, con porcentajes de recuperación de quitina del 85%.

Así mismo, la comparación de los espectros infrarrojos de la quitina producida, comparada con una muestra de quitina comercial, mostró un porcentaje de correlación del 93-95 %, indicando que la quitina obtenida al utilizar el método combinado (microbiológico-químico), tiene un alto grado de pureza (Marcía, Malespín, Sánchez y Benavente, 2011).

Continuando con este estudio, García González (2018), evaluó el efecto del rango de tamaño de partículas (< 3.5 mm y > 3.35), el tipo de sustrato (azúcar o melaza) y el porcentaje de inóculo (5 y 10%) en el rendimiento y la calidad de quitina obtenida en

el proceso de fermentación ácido láctica. Adicionalmente, se comprobó cualitativamente y cuantitativamente, la presencia de proteínas en los residuos del proceso de fermentación y se caracterizó e identificó las bacterias ácido-lácticas presentes en uno de los experimentos realizados.

Los resultados mostraron que se obtuvo un rendimiento medio global de quitina del $7.48 \pm 1.91\%$ basado en la masa inicial de desechos de camarón. La media global del grado de correlación del espectro IR de la quitina producida con respecto a la muestra comercial fue de $90.84 \pm 1.87\%$. Por medio de la reacción xantoproteica se identificaron tres aminoácidos: fenilalanina, triptófano y uno no esencial, tirosina. El análisis del porcentaje promedio de proteínas en el material proteico fue de 1.60% .

Como parte del estudio, se caracterizaron tres colonias de bacterias ácido-lácticas nativas de morfología celular: bacilar alargada, cocobacilo y bacilo corto. Las cepas presentes fueron *Lactobacillus paracasei* 1 y *Leuconostoc mesenteroides cremoris*, las cuales facilitaron la hidrólisis del material proteico presentes en la mezcla (García González, 2018).

Los resultados de la presente investigación contribuyeron a determinar el efecto de un precursor en la cinética de crecimiento poblacional de las bacterias con el objetivo de reducir del tiempo de fermentación; un parámetro importante en el escalamiento industrial del proceso biotecnológico. Además, se estableció el efecto del uso de dos cepas con características conocidas en un medio de cultivo estéril, durante la fermentación ácido láctica con caparazón de camarón para la obtención de quitina.

Con esta investigación se sientan las bases para el escalamiento industrial de la obtención de quitina por un medio biológico. Así también, se propone una solución al problema ambiental que provocan los desechos de camarón y los residuos químicos generados por la producción de quitina por procesos químicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar la cinética de crecimiento de microorganismos específicos aislados en la ruta metabólica ácido láctico del caparazón de camarón, con y sin precursor, en un periodo de dos semanas a nivel de laboratorio.

2.2 Objetivos Específicos

- Establecer las características morfológicas y fisiológicas de cepas de microorganismos específicos aislados provenientes de la fermentación de caparazón de camarón mediante pruebas bioquímicas.
- Identificar las cepas de microorganismos específicos aislados provenientes de la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón mediante el uso del sistema miniaturizado API 50 CH en conjunto con el medio API 50 CHL.
- Evaluar el efecto del uso de extracto de levadura como precursor de la cinética de crecimiento de dos cepas de microorganismos específicos durante la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón, mediante las gráficas de conteo celular microbiano, pH y porcentaje de acidez total titulable (ATT) en función del tiempo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Crustáceos

Los Crustáceos son artrópodos mandibulados, con dos pares de antenas, cinco pares de patas, un par de mandíbulas, respiración branquial y el cuerpo generalmente dividido en dos partes denominadas cefalotórax y abdomen. Unos pocos presentan tres partes denominadas cabeza, tórax y abdomen como los insectos (Botanical-online, 2012) (Figura 3.1). En muchos de ellos, la quitina está impregnada de sales (carbonato cálcico) para ser más resistente.

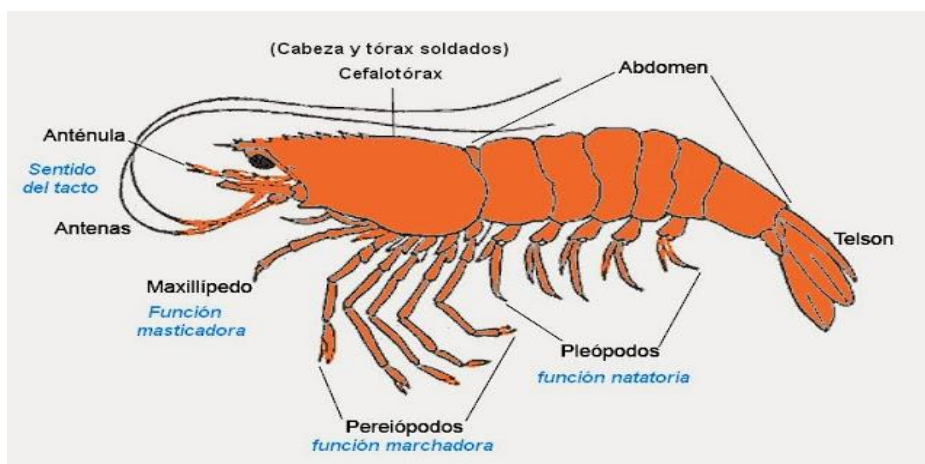


Figura 3.1 Diagrama de un crustáceo. El cefalotórax incluye el cefalón y el tórax (Extraída de <http://cantabrico2007.blogspot.com/2007/08/invertebrados-3.html>).

En el caso del camarón, solamente el 50% es comestible ya que el resto comprende el cefalotórax que es la parte que se desecha. Esto puede dar una idea de los grandes volúmenes de desechos que se producen por año y, por tanto, muestra la magnitud del problema que esto suscita.

3.1.1 Composición de los desechos de crustáceos

La composición de los desechos en base seca está formada por proteínas (13-58%), carbonatos –y fosfatos- de calcio (20-72%), lípidos (0.8-12%) y quitina (14-35%). El contenido de humedad varía, en un rango de 50% a 80% en función del origen biológico y del manejo de los desechos (Pastor de Abram, 2004).

El contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el desecho varía ampliamente dependiendo de la especie, de la parte del organismo, del estado de nutrición y de la etapa de ciclo reproductivo, así como de las condiciones de separación del exoesqueleto durante el proceso (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). En

la Tabla 3.1 se muestra la composición de los desechos de diferentes tipos de crustáceos.

En el caso de los desechos de camarón y langostino, la composición de quitina se encuentra en un rango de 14 a un 35% en base seca (Pastor de Abram, 2004). El contenido de humedad varía, en función del origen biológico y del manejo de los desechos. Escorcia, Hernández, Sánchez y Benavente (2009) reportaron valores de humedad del 72.11% para el desecho de langostino y 76.7% para el desecho de camarón.

Tabla 3.1 Composición en base seca de desperdicios de caparazón de crustáceos.

Fuente de quitina		Proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
		(%)	(%)	(%)	(%)
Cangrejo:	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
Camarón:	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Crangon crangon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Panaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Cangrejo de río:	<i>Procambarus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
Kril:	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

Elaborado de acuerdo a: Muzzarelli (1997), Shahidi y Synowiecki (1991), Synowiecki y Al.-Khateeh (2000).

3.1.2 Los crustáceos en Nicaragua

En Nicaragua existen quince plantas procesadoras de camarón y langostino. Ocho de ellas se encuentran localizadas en la zona del Pacífico especialmente en los departamentos de Chinandega y León (Escorcia, Hernández, Sánchez y Benavente, 2009).

En 2017, el país exportó alrededor de \$27 millones entre langosta y camarón de cultivo. Ambos están entre los 10 principales productos exportados del país (El Nuevo Diario, 2017). Las exportaciones de camarón se han mantenido constantes desde el año 2008 con valores alrededor de los 46 millones de libras.

No obstante, esta industria produce una gran cantidad de desechos, hasta de un 40 a 50 % del peso total de la producción (Xu, Gallert y Winter, 2008), los cuales se consideran contaminantes potencialmente peligrosos por su alta carga orgánica (Cabrera, 2010), pero representan una fuente viable de producción de quitina (Cabarcas-Lorduy, Marimón Bolívar y Miranda Marzola, 2011).

3.2 La quitina en los crustáceos

La quitina es el segundo compuesto más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Está constituido por moléculas de carbohidratos con grupos nitrogenados (moléculas de N-acetil Glucosamina) (Figura 3.2), y juega un papel importante en la rigidez del caparazón de los crustáceos (Dutta, Dutta y Tripathi, 2004).

Este polímero al ser sometido a un proceso de hidrólisis (descomposición del polímero), permite la obtención de productos con alto valor agregado (Wang, Liang y Yen, 2011).

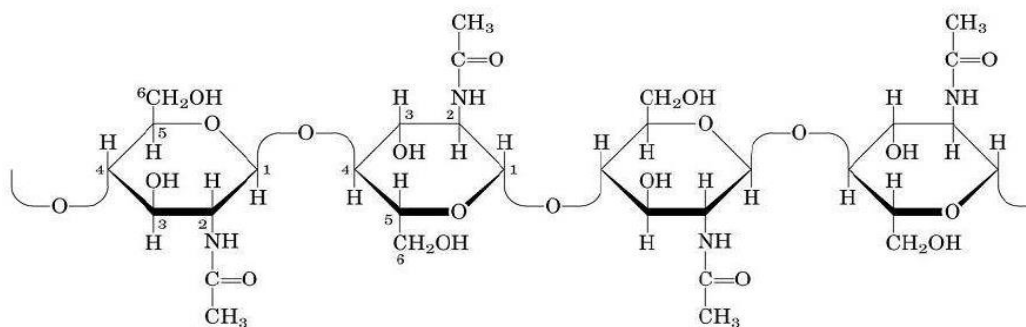


Figura 3.2 Estructura molecular de la quitina (Tomado de Sabry, 1992).

3.3 Métodos de obtención de la quitina

A continuación, se describen los dos principales métodos que se utilizan para la obtención de quitina a partir de desechos de crustáceos.

3.3.1 Método de extracción química

En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, extracción de la proteína (desproteínización), eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización) y decoloración de la quitina obtenida (despigmentación), tal como se observa en el diagrama de bloques de la Figura 3. 3.a. (Peniche, 2006).

3.3.2 Método biotecnológico de extracción.

El enfoque biotecnológico plantea dos vías: una es la digestión del caparazón de crustáceos mediante enzimas proteolíticas como la papaína y la pepsina. Así también, las quitinasas (glicosil-hidrolasas) liberan las unidades químicas de la quitina (N-acetil glucosamina), estas enzimas son ampliamente distribuidas en los organismos vivos como mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias (Deeba, Shakir, Irfan y Qazi, 2016). Este paso puede ser ejecutado antes o después de la desmineralización.

La segunda vía es la fermentación por microorganismos, la cual puede ser de dos tipos: ácido láctico y no láctico (Figura 3.3.b). Entorno a esto, diversos microorganismos se han reportado con actividad quitinolítica, entre los que destacan especies del género *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Serratia* sp., entre otros (Kaur y Singh, 2013; Zakaria, Hall y Shama, 1997).

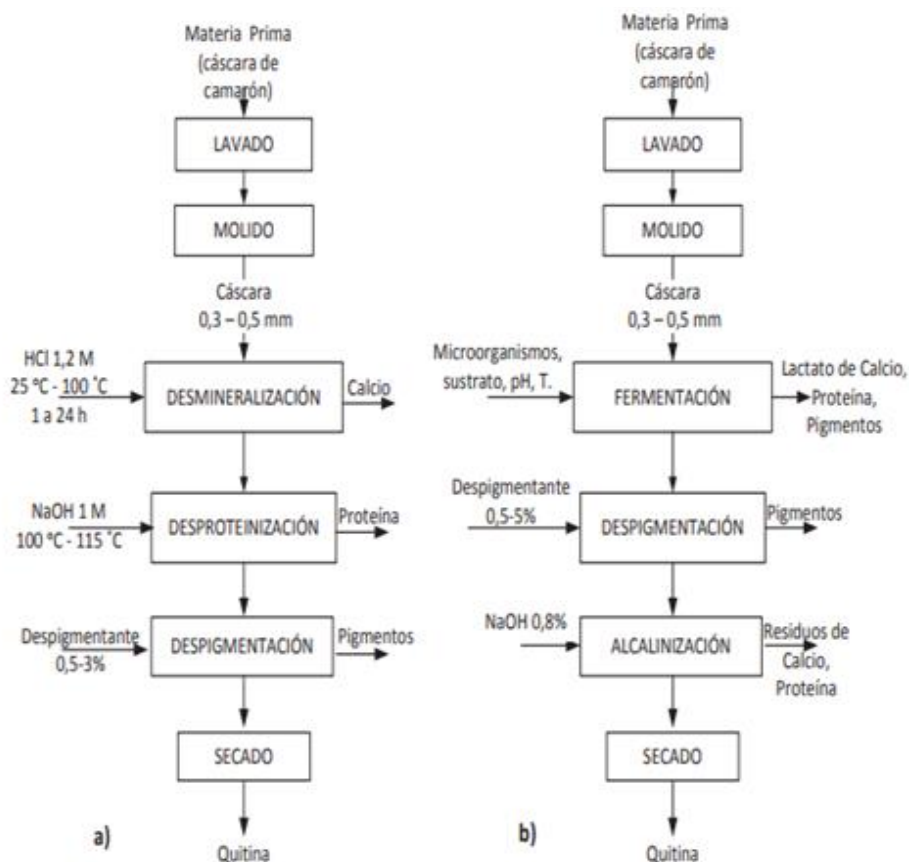


Figura 3.3 Diagrama del proceso de extracción de quitina (a) Proceso químico (Peniche, 2006) y (b) Proceso biológico-químico (Folgueras, 2008).

Sin embargo, la aplicación de estas dos vías no garantiza la pureza de la quitina que se obtiene ya que el material todavía contiene restos de pigmentos y proteicos indicando que el proceso de desproteínización no es completo.

Para asegurar la completa remoción de las proteínas y pigmentos, Marcía, Malespín, Sánchez y Benavente (2011) adicionaron NaOH al 5 % para conseguir el rompimiento del complejo quitina-proteína del caparazón e NaClO al 0.38 % para la despigmentación. Al finalizar el procedimiento químico, la quitina obtenida tenía una apariencia suave al tacto, sin olor y sin pigmentación.

El método biotecnológico de extracción de la quitina presenta varias ventajas, como una extracción reproducible, mayor facilidad en el manejo del proceso, el uso de ácidos y bases fuertes se suplen con compuestos orgánicos (leche, azúcar de caña), consume menos energía, es más productivo, “amigable” con el ambiente, hay menor grado de descomposición, lo que permite recuperar los subproductos con menor limitación en la purificación de los compuestos finales (Krithika y Chellaram, 2016; Gortari y Hours, 2014).

Esta tecnología elabora productos con características estructurales y funcionales de mayor calidad y reduce costos de producción; asimismo, diversos trabajos de investigación concluyen que hay mayor rendimiento del producto final respecto al método químico. Sin embargo, hasta ahora este procedimiento no se ha generalizado en la industria (Gálvez López, Rosas Quijano y Salas Ovilla, 2017).

A este método se le han identificado dos ventajas notables en comparación con el proceso químico tradicional.

- Usa 50% menos de agua, ya que aprovecha la humedad natural de los desechos de crustáceo.
- Reduce el uso de productos químicos considerados agresivos, lo que permite obtener productos finales con pocas impurezas.

Así también, este método permite también la obtención de otros subproductos: proteína, astaxantina y calcio, los cuales no pueden ser obtenidos por el proceso químico o son obtenidos con altos niveles de impureza, debido a su alto nivel de corrosión (Matsumoto, 2011).

3.4 Fermentación

Es un proceso catabólico de oxidación de sustancias orgánicas para producir otros compuestos orgánicos y energía. Los procesos de fermentación son realizados por levaduras y bacterias en ausencia de oxígeno (Puerta Quintero, 2010).

3.4.1 Tipos de fermentación

Existen varios tipos de fermentación según el microorganismo, el sustrato y las condiciones, presentados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Tipos de fermentación, según microorganismo, sustratos y condiciones.

Tipo de fermentación	Microorganismos fermentadores	Sustrato	Productos
Alcohólica	Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus, S. anamensisi, S. carlsbengnesis, Candida seudotropicalis, Torulopsis spp., Mucor spp., Kluyveromyces fragilis, Sarcina ventriculi, Zymomonas mobilis	Malta de cebada, cereales, arroz, maíz, trigo, jugo de la vid, caña de azúcar, melaza, sorgo, jugos de frutas, remolacha, suero de leche, soya	Etanol, vinos, cerveza, licores, bebidas destiladas, pan, salsas
Láctica homofermentativa	Streptococcus thermophilus S. lactis, S. faecalis, Pediococcus cerevisiae y por la mayoría de los Lactobacillus como L. lactis, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei.	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	Yogur, suero de leche, quesos, mantequilla, kumis, encurtidos, quitina o quitosano.
Láctica heterofermentativa	Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis y L. fermenti, Bifidobacterium bifidus.	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	
Propiónica o propanoica	Propionibacterium freundenreichii, P. shermanii, P.pentosacum, Micrococcus lactylicus, Clostridium propionicum, entre otras	Productos lácteos, glucosa, sacarosa, lactosa, pentosas, ácido láctico, ácido málico, glicerina	Ácido propiónico, ácido acético y otros ácidos

o butaica	Clostridium butyricum y Clostridium spp.	Polisacáridos (almidón, glucógeno, pectina), glucosa, proteínas, aminoácidos, purinas, etanol, ácido úrico, xantina	Ácidos butírico, acético, fórmico, láctico, succínico, butanol y otros alcoholes y cetonas
Fórmica o ácidomixta	Enterobacter spp., Escherichia coli, Aerobacter aerogens, Erwinia spp., Serratia marcescens, Proteus vulgaris, Salmonella thyphi, Shigella spp., y las bacterias luminosas	Glucosa o lactosa	Ácidos, acético, láctico, málico, fórmico vinagre, glicerina y disolventes
Metánica	Methanobacterium omelianskii, M. formicium y M. ruminantium, Methanosarcina methanica, M. barkeri, Methanococcus mazei y M. vannielii	Alcoholes, ácidos, CO2	Gas metano
Maloláctica	Leuconostoc oenos	Ácido málico	Vinos blancos y rojos, cidra

Fuente: Marcia, Malespín, Sánchez y Benavente (2011)

3.4.2 Fermentación ácido láctica

De acuerdo a Arévalo Illescas (2016), para obtener ácido láctico por fermentación se requiere piruvato o ácido pirúvico, que se obtiene por la degradación de la glucosa u otros azúcares, que en la mayoría de los casos se da por glucólisis, en condiciones anaeróbica o aeróbica en el citoplasma de las células eucariotas o procariotas (Figura 3.4).

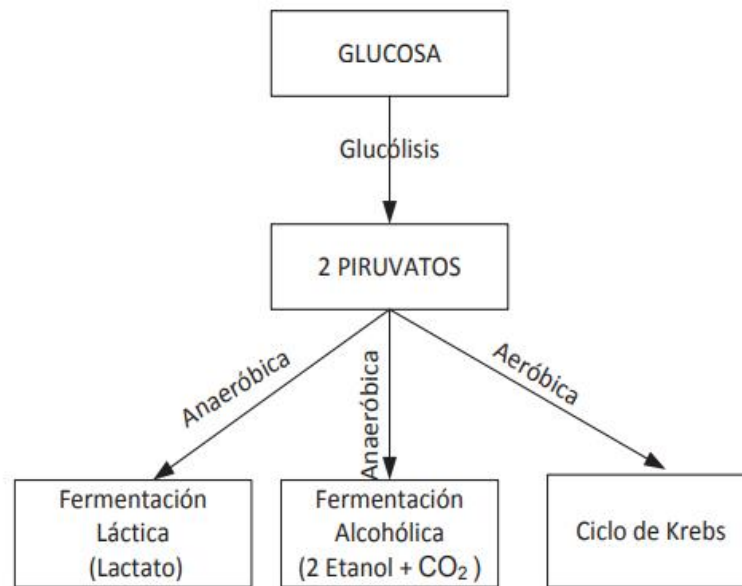


Figura 3.4 Proceso metabólico de la glucólisis donde se obtiene el ácido láctico. (Arévalo Illescas, 2016)

Este proceso ha sido estudiado por varios autores en donde trabajaron con una mezcla de cultivos lácticos; con el objetivo de extraer quitina.

Cira, L., Huerta, Hall, y Shirai (2002) encontraron que el uso de sacarosa como fuente de carbono en la fermentación da mejores resultados en la producción de ácido láctico, comparado con lactosa y suero de leche. El microorganismo empleado fue el *Lactobacillus sub. Paracasei* aislado de los residuos de mariscos. En la investigación, la obtención de quitina incluyó la purificación con un tratamiento de ácido y álcali para remover los residuos de calcio y proteína presentes (pp. 1359-1356).

3.4.3 Factores que influyen en la fermentación

Los factores que más influyen en la fermentación de la cascara de camarón son (Arévalo Illescas, 2016):

- La temperatura, la misma que depende del microorganismo como con el que se trabaje
- El pH que contribuye a la putrefacción de la cáscara
- El enriquecimiento del sustrato con fuentes de carbono
- El tamaño de la cascara de camarón ((Prameela, 2010)

La combinación de estos factores, al igual que la selección de la cepa de bacterias ácido lácticas determina la efectividad del proceso fermentativo (Arévalo Illescas, 2016).

3.4.3.1 Temperatura

La temperatura puede tener una considerable influencia sobre la composición de las poblaciones microbianas. Ciertamente, las altas temperaturas ambientales promueven el rápido crecimiento de todas las clases de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos y de descomposición, así como las bacterias ácidos lácticas (Cira, Huerta, Guerrero, Rosas y Shirai, 2000).

La Temperatura influye sobre el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Temperaturas cardinales de desarrollo (= Zonas de temperatura)

- Mínima: por debajo de ella el crecimiento se detiene.
- Máxima: por encima de ella el crecimiento no es posible.
- Óptima: es la más favorable para la actividad vegetativa.

Las tres varían cuando se modifica el medio donde crecen los microorganismos.

De acuerdo a la temperatura, los microorganismos se dividen en (Agentes Físicos, 2015):

- *Psicrófilos*: se desarrollan a temperaturas relativamente bajas. Pueden crecer a 0°C y pueden crecer a temperaturas medias (psicrófilos facultativos). Para los psicrófilos obligados estas bajas temperaturas son letales. Ej.: organismos que deterioran la carne, los vegetales y las frutas en lugares refrigerados.
- *Mesófilos*: se desarrollan a temperaturas medias. Crecen desde 10 – 45°C. Ej.: Algunas especies del suelo que causan enfermedades.
- *Termófilos*: se desarrollan a temperaturas relativamente altas. Se desarrollan a temperaturas superiores a 45°C. Ej.: organismos que viven en la superficie del suelo bajo radiación solar directa, en el compost, etc.

3.4.3.2 pH

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere (Freeman, 1986).

El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica.

El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0. Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH igual a 1.0 y otros alcalófilos que toleran un pH igual a 10.0.

Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5).

De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante. La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias.

En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos.

3.4.3.3 Suplementos en un proceso microbiológico

Muchos organismos requieren para su nutrición, además de minerales, fuentes de carbono y energía, algunos suplementos o factores de crecimiento. Se trata de algunas sustancias que pertenecen a los componentes básicos de la célula y que no pueden sintetizarse a partir de componentes más sencillos (Schelegel, 1996).

Los factores de crecimiento pertenecen a tres grupos de sustancias, los aminoácidos, las purinas y pirimidinas, así como las vitaminas. Los aminoácidos, purinas y pirimidinas son componentes de las proteínas y los ácidos nucleicos, y la célula los requiere en las cantidades correspondientes; las vitaminas, por el contrario, son componentes de coenzimas o grupos prostéticos, y tiene por ello funciones enzimáticas o catalíticas, y se utilizan únicamente en cantidades muy pequeñas (Peniche, 2006).

3.5 Bacteria ácido láctica (BAL)

Las BAL son un grupo de organismos en forma de cocos o bacilos, Gram-positivos, no esporulados, microaerófilos, los cuales producen ácido láctico como principal producto durante la fermentación de carbohidratos.

Están generalmente asociadas con ambientes ricos en carbohidratos, tales como diversos productos alimenticios (productos lácteos, carnes y vegetales fermentados, frutas, ensilados y bebidas) pero algunas también son miembros de la flora normal del tracto intestinal, respiratorio y genital de humanos y animales. No requieren de oxígeno para crecer. Son resistentes a la inhibición por dióxido de carbono, nitritos y el humo. Son capaces de crecer a concentraciones relativamente altas de sal y pueden tolerar valores de pH más bajos que las bacterias Gram-negativas (Cira, Huerta, Guerrero, Rosas y Shirai, 2000).

3.5.1 Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH

El crecimiento de bacterias lácticas esta necesariamente acompañado por la secreción de ácido láctico y en algunas circunstancias, de ácido acético y una consecuencia disminución del pH en el medio. De ahí, que las bacterias lácticas sean excepcionalmente tolerantes entre las bacterias, a bajos valores de pH en presencia de ácidos orgánicos débiles, azúcar y ambientes ricos en nutrientes (Parras-Huerta, 2010).

La toxicidad de los ácidos débiles está relacionada con la concentración de moléculas del ácido no disociado, la cual es una función de la concentración total del ácido, su pKa y el valor de pH del sistema. Para una efectiva inhibición de las bacterias patógenas y de descomposición, es importante que el valor de pH en la fermentación disminuya tan rápido como sea posible a niveles en los cuales una proporción significativa del ácido está presente en forma no disociada. Como el ácido láctico tiene un pKa de 3.87, la inhibición será importante a valores de pH por debajo de 4.9 (Owens, 2005).

3.6 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano es la división de una bacteria en dos células hijas en un proceso llamado fisión binaria. Suponiendo que no se produzca ningún caso de mutación las células hijas resultantes serán genéticamente idénticas a la célula original. De este modo tiene lugar la "duplicación local" de la población bacteriana. Las dos células hijas creadas tras la división no sobreviven necesariamente (Sanz, 2008).

El conocimiento de cómo se expande la población celular es útil para el diseño de métodos de control para el crecimiento microbiano y adquiere relevancia en el aumento de la biomasa y en los productos que se pueden llegar a obtener (López, Infanzón y Rojas, 2016).

3.6.1 Curva de crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo

Si se inoculan bacterias en un medio de cultivo líquido, crecerán por lo general hasta que un factor que influye en el crecimiento bacteriano llegue al mínimo y el crecimiento se vea limitado. Si durante este proceso no se adiciona ningún nutriente ni se elimina ningún producto metabólico se denomina a este crecimiento en este espacio predeterminado como cultivo discontinuo (Schelegel, 1996).

El crecimiento de un cultivo bacteriano se ve claramente en la representación gráfica, cuando se expresan los logaritmos del número de células viables frente al tiempo. Una curva de crecimiento típica es la representada en la Figura 3.5. Este gráfico tiene un aspecto sigmoide y permite diferenciar varias fases de crecimiento que se presentan regularmente de una forma más o menos acusada: fase de latencia (o lag), fase exponencial (logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte.

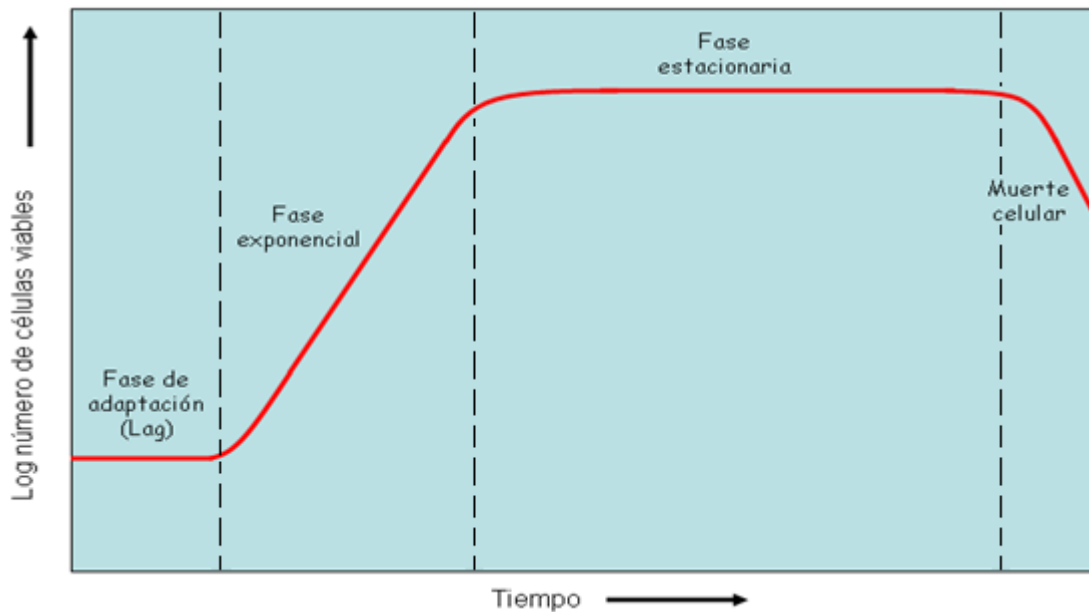


Figura 3.5 Curva de crecimiento de cultivo bacteriano (Adaptado de López, Infanzón y Rojas, 2016)

3.6.1.1 Fase de latencia

La fase de latencia abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de lo apropiado que sea el medio de cultivo (Schelegel, 1996).

Si el inóculo procede de un cultivo previa viejo (fase estacionaria de crecimiento) la célula tiene que adaptarse primero a las nuevas condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas. Si las fuentes de energía y de carbono del nuevo caldo de cultivo se diferencian de las del cultivo previo, la adaptación a las nuevas condiciones va ligada frecuentemente a una nueva síntesis de enzimas que no eran necesarios en el cultivo previo y que no habrán sido sintetizados. La formación de los nuevos enzimas esta inducida por el nuevo sustrato.

3.6.1.2 Fase exponencial

La fase de crecimiento exponencial (logarítmico; fase exp. o fase log) se caracteriza por un tiempo de generación constante y mínimo. El tiempo de generación durante la fase log es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio (Schelegel, 1996). Las Enterobacteriáceas se dividen cada 15-30 min, *Escherichia coli* a 37°C aproximadamente cada 20 min. En otras bacterias el tiempo de generación es considerablemente superior, y para muchas bacterias del suelo es de 60-150 min, en *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* incluso 5-10 horas.

En muchas bacterias el tamaño celular y el contenido en proteínas de la célula es constante durante la fase log; el cultivo está compuesto hasta cierto punto por "células estándar". Si este comportamiento está claramente demostrado y el número de células, proteínas y masa seca aumenta con las mismas tasas, entonces puede seguirse el crecimiento midiendo una de estas magnitudes. Pero en muchos casos en un cultivo discontinuo las células se modifican durante el crecimiento exponencial, ya que el ambiente también se modifica continuamente, desciende la concentración de sustrato, aumenta la densidad celular y se acumulan productos metabólicos.

Debido a la relativa constancia del tiempo de generación durante la fase log, esta resulta idónea para la determinación de la tasa de crecimiento. Para el estudio de la influencia de factores ambientales (pH, potencial redox, temperatura, aireación o semejantes) así como la capacidad de utilizar diversos sustratos se sigue el incremento del número de células, o bien de la turbidez (extinción) durante el crecimiento exponencial.

3.6.1.3 Fase estacionaria

La fase estacionaria se instaura cuando las células ya no crecen. La tasa de crecimiento es dependiente de la concentración de sustrato; como consecuencia, al disminuir la concentración de sustrato ya aparece una disminución de la tasa de crecimiento antes de su total consumo. La transición de la fase exponencial a la estacionaria tiene lugar por tanto paulatinamente. Además de la disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de O₂ baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer disminuir la tasa de crecimiento e introducir la fase estacionaria.

En la fase estacionaria pueden utilizarse aun materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. Los procesos aislados dependen del factor que limite el crecimiento. Solo las células muy sensibles mueren rápidamente. Siempre que pueda obtenerse energía necesaria por respiración de materiales de reserva o proteínas, las bacterias permanecen largo tiempo vivas.

La masa bacteriana alcanzada en la fase estacionaria se denomina rendimiento o producción. Depende del tipo y cantidad de los nutrientes añadidos y de las condiciones de cultivo.

3.6.1.4. Fase de muerte

La fase de muerte y las causas de la muerte de las células bacterianas en soluciones nutritivas normales se han estudiado aun poco. Relativamente claras son las condiciones cuando se acumulan ácidos (*Escherichia*, *Lactobacillus*). El número de células viables puede descender exponencialmente. En según qué circunstancias las células pueden lisarse por acción de los propios enzimas (autólisis).

3.6.2 Construcción de la curva cinética de crecimiento bacteriano

La cinética describe las velocidades a la cual las reacciones bioquímicas se desarrollan en diferentes condiciones. Hay cuatro factores que influyen mayoritariamente en la velocidad de bioconversión y estos son: microorganismos (tipo y número), cantidad de sustrato, biodisponibilidad (composición y tamaño de partículas) y condiciones ambientales (humedad, temperatura, oxígeno y pH).

La curva cinética del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

Esto quiere decir, que corresponde al aumento poblacional de una especie microbiana en un medio de cultivo provisto de todas las necesidades del microorganismo: cantidad de sustrato, nutrientes, temperatura, grado de humedad, oxígeno y pH (Diaz, 2015).

La cinética de crecimiento es útil para evaluar si cepas particulares de bacterias están adaptadas para metabolizar ciertos sustratos, como desechos industriales o contaminación de aceite. Las bacterias que están genéticamente diseñadas para limpiar derrames de petróleo, por ejemplo, se pueden cultivar en presencia de complejos hidrocarburos para asegurar que su crecimiento no sería reprimido por los efectos tóxicos del petróleo.

3.6.2.1 Cinética de crecimiento

Los microorganismos presentan un crecimiento que se puede describir mediante la siguiente función:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

Donde x es la concentración celular (biomasa), μ es la velocidad específica de crecimiento y t es el tiempo de crecimiento.

El crecimiento celular es considerado una reacción auto catalítica de primer orden, en donde en un sistema cerrado el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular.

Si μ se considera constante, entonces:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Aplicando logaritmo natural a ambos lados de la ecuación, se obtiene:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

3.6.2.2 Velocidad específica de crecimiento (μ)

Es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1} . Se mantiene constante durante la fase logarítmica y, en la curva de crecimiento (Figura 3.5) se representa por la pendiente de la línea que simboliza la fase logarítmica (Hernández, 2003).

La relación del crecimiento de la célula en función de los nutrientes del medio se expresa mediante la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (4)$$

Donde μ_{max} es la velocidad específica máxima de crecimiento (hora^{-1}), S es la concentración del sustrato limitante (g/l) y K_S es la constante de saturación (g/l). K_S es la concentración del sustrato correspondiente a una velocidad específica de crecimiento igual a $\mu_{max}/2$.

3.6.2.3 Tiempo de duplicación celular

Es el tiempo requerido para que una célula se divida o para que la población de un organismo se duplique en número. Se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

3.7 Unidad formadora de colonia (UFC)

Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada que se encuentra en un sustrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo.

Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

Cuando algunos tipos de bacterias o de levaduras patógenas crecen sobre superficies forman **biopelículas (biofilms)** en los que las células se asocian entre sí mediante capas de polisacáridos que forman una película que recubre la superficie sobre la que se encuentran las células (Guzmán, 2005).

3.8 Cultivo o siembra microbiana

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento. Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- Que se efectúen asépticamente
- Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados
- Que se realicen solo los manipuleos indispensables
- Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar.

3.8.1 Características del cultivo

Un microorganismo se puede *sembrar* en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne.

Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria.

La principal diferencia entre un medio de cultivo sólido y uno líquido es que el medio de cultivo sólido contiene un 1,5–2% de agar-agar, mientras que el medio líquido no contiene agar-agar (Santambrosio, 2009).

3.9 Medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40°C. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él. La gelatina es otro

agente solidificante, pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

3.9.1 Tipos básicos de medios de cultivo

Según sus cualidades físicas.

- Líquidos
- semisólidos
- sólidos

Según su origen:

- *Naturales*: son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.
- *Sintéticos*: son los medios que contienen una composición química definida cualitativamente y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
- *Semisintéticos*: son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

Según su formulación:

- *Químicamente definidos*: se conoce la cantidad exacta de cada uno de los compuestos que hay en el medio.
- *Complejos*: se realizan a partir de extractos naturales (extracto de levadura, sangre, etc.). No se conoce exactamente cuál es la composición del medio; sin embargo, presenta la ventaja de que ya están presentes todos o casi todos los elementos que una célula puede requerir.

Según su uso:

Medios para aislamientos primarios:

- *Para usos generales*: no selectivos, para cultivo de una amplia variedad de organismos difíciles de hacer crecer. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, Hemoglobina, FX, FV, glutamina, u otros factores accesorios para el crecimiento de las bacterias (Agar Sangre, Schaeffer, etc)
- *Selectivos*: (pueden ser de moderada o de alta selectividad) se añaden sustancias que inhiban el crecimiento de ciertos grupos de bacterias, permitiendo a la vez el crecimiento de otras. Variando las sustancias añadidas, se varía el tipo y grado de selectividad (Mac Conkey, Kanamicina-Vancomicina)
- *Enriquecidos*: ralentizan/suprimen el crecimiento de la flora competitiva normal potenciando el cultivo y crecimiento deseado (Selenito, medio con Vitamina K).
- *Para aislamientos especializados*: formulaciones nutritivas especiales que satisfacen requerimientos de grupos específicos de bacterias, ayudando a su identificación (Lowenstein).

Medios para identificación:

- *Diferenciales*: formulaciones especiales en las que se estudian las peculiaridades fisiológicas (nutrición y respiración, sobre todo) específicas de las bacterias. Seleccionando los medios adecuados se puede llegar a la identificación de casi cualquier bacteria (Oxidación-Fermentación) (Microinmuno, S.F.).

3.10 Pruebas bioquímicas primarias

Las pruebas bioquímicas primarias son usadas para determinar el género de la mayoría de las bacterias. Tales como; Tinción de Gram, Catalasa, Oxidasa y motilidad. En el Anexo A.6 se describe la metodología de medición para la caracterización de bacterias.

3.11 Métodos microbiológicos tradicionales

Los métodos microbiológicos tradicionales son laboriosos y lentos. Esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos, fiables y menos costosos para detectar e identificar microorganismos. A través de los años, han comenzado a utilizarse sistemas miniaturizados de identificación que consisten en galerías con sustratos para evidenciar en forma clara una determinada actividad metabólica.

Todos los micro métodos de identificación comercial están basados en una de cinco tecnologías diferentes o una combinación de ellas.

Estos métodos presentan tres ventajas importantes frente a las técnicas convencionales; posibilidad de determinar varias actividades enzimáticas en periodos de tiempo breves, fácil de realizar y manejar, además de requerir menos material y equipamiento. Actualmente existen diversos sistemas miniaturizados de diagnóstico; de entre ellos cabe mencionar uno (García González, 2018). Entre uno de ellos tenemos el sistema API 50 CH.

El sistema API 50 CH es un sistema estandarizado para la identificación de diferentes grupos bacterianos. Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de varias pruebas bioquímicas a partir de una única suspensión. (BioMérieux, Inc, España, S.F.)

Asocia 49 pruebas bioquímicas para estudiar el metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. API 50 CH, es usado para la identificación de lactobacillus y géneros relacionados. Este método consiste en una plantilla con 50 microtubos con los sustratos que serán fermentados por cierto microorganismo; los sustratos son, en su mayoría, carbohidratos o derivados. Las pruebas de fermentación son inoculadas con medio API 50 CHL de composición similar al caldo MRS pero sin glucosa, citrato de amonio y con púrpura de bromocresol o con medio API 50 CHB/E, que rehidratan los sustratos (García González, 2018).

Durante la incubación, la fermentación es evidenciada por un cambio en el color del microtubo, causada por la producción anaerobia de ácido que origina el vire del indicador de pH en el medio. El primer microtubo, que no contiene ningún ingrediente activo, es usado como un control negativo. El medio empleado en la inoculación de las plantillas dependerá del metabolismo y las exigencias nutricionales del grupo microbiano a ser probado.

El API 50 CH es usado para observar dos actividades metabólicas: La oxidación que es visible por un cambio en el color del cultivo, causada por la producción de ácido y el vire del indicador pH en el medio escogido y la asimilación que es evidenciada por el crecimiento del organismo cuando el sustrato es usado como la única fuente disponible de carbono (García González, 2018). En el Anexo A.7 se describe el procedimiento para la identificación de bacterias.

4 METODOLOGÍA

En esta sección se presenta la metodología desarrollada, relacionando de manera clara y concisa, cada una de las etapas de la investigación, describiendo la parte experimental, el enfoque, las técnicas y procedimientos que se emplearon para cumplir con los objetivos del estudio.

4.1 Materia prima

4.1.1 Desechos de camarón (Cefalotórax):

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron alrededor de 725 g, en base húmeda, de desechos de cefalotórax de camarón de agua dulce, de la especie *Penaeus vannamei* de la familia Penaeidae, orden Decapoda (Figura 4.1.a).

Este material fue proporcionado por la Empresa Camaronera CAMANICA, del Grupo PESCANOVA (Figura 4.1.b), ubicada en el Km 130, Carretera León-Chinandega, Chinandega, Nicaragua.



(a)



(b)

Figura 4.1 (a) Desechos de camarón (cefalotórax) en base húmeda utilizada durante la investigación. (b) Instalaciones de la Empresa CAMANICA del Grupo PESCANOVA.

4.1.2 Suero lácteo

Es la fracción líquida que se obtiene durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso. Este fue elaborado a nivel de laboratorio por las tesis, de acuerdo al siguiente procedimiento: en un recipiente se depositaron 12 L de leche y se añadieron 12.5 g de pastilla de cuajo y se dejó reposar por media hora hasta que la caseína insoluble precipitó formando el cuajo. Una vez que el cuajo estaba

formado, el suero se separó por decantación utilizando un colador y gasas estériles con el fin de remover las partículas más finas.

El suero ya separado de la fracción sólida se guardó en refrigeración. Se debe mencionar que al inicio de cada experimento de fermentación se verificaba el pH del suero ya que conforme pasaba el tiempo, éste variaba su acidez.

4.1.3 Azúcar morena

Es la azúcar sin refinar o parcialmente refinada, con una pureza media del 85% de sacarosa. Está formada por cristales de azúcar con algún contenido residual de melaza o producido por la adición de melaza al azúcar blanco refinado. El material fue adquirido en el mercado local bajo la marca Golden Brown, en una presentación de 2 kg.

4.2 Reactivos, materiales y equipos de laboratorio

4.2.1 Reactivos

- a. **Medio MRS:** Se usó como medio para el aislamiento de las bacterias ya que es el recomendado específicamente para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Para su preparación, se disolvieron los gramos que se especificaban en las instrucciones del frasco, en un litro de agua desmineralizada caliente con agitación constante. Posteriormente, la mezcla se introdujo en una autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se verificó el pH, asegurando un medio ácido a 25°C.
- b. **Agua Peptonada:** Es un medio utilizado como diluyente para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Este reactivo se utilizó como diluyente de las muestras líquidas para llevar a cabo la técnica de seriado, durante la determinación de la concentración de bacterias (UFC/ml).
- c. **Extracto de Levadura:** Para los reactores de fermentación se utilizó una relación de 4 gramos por litro. Tomando esta relación de acuerdo a investigaciones previas. Además, se seleccionó este tipo de precursor ya que es fuente principal de nitrógeno y suplemento vitamínico. Es un reactivo utilizado en la biología molecular por la presencia de aminoácidos, péptidos, vitaminas y elementos esenciales de alta calidad como factor de crecimiento.

4.2.2 Cristalería y materiales de laboratorio.

La cristalería para la inoculación de los experimentos y el procedimiento de identificación de bacterias se esterilizaron por vía húmeda (autoclave) o seca (horno).

- a. **Materiales de laboratorio:** incluyeron pipetas, beakers, matraces volumétricos, soporte universal, goteros, agitadores magnéticos, azas, placas, extractores o peras, mecheros, desecador, tubos de ensayo, entre otros.
- b. **Fascos de vidrio Pyrex tipo schott (Fascos de fermentación):** Fueron utilizados para la fermentación láctica de acuerdo al diseño de experimentos. Los fascos con tapa, resistentes al autoclave tenían una capacidad de 1 litro, una altura de 20.3 cm y un diámetro de 8.2 cm. Así también, se utilizaron frasco de capacidad de 500 ml para la preparación de inóculos.

4.2.3 Equipos

En la Tabla A.1 del Anexo A.1 se describen los equipos utilizados para realizar las pruebas experimentales de fermentación ácido-láctica y la determinación de las características morfológicas y fisiológicas de dos cepas de microorganismos.

4.3 Procedimiento

4.3.1 Aislamiento y caracterización de cepas nativas

Para obtener la población microbiana nativa, se llevó a cabo una fermentación ácido-láctica inicial de caparazón de camarón con suero lácteo y azúcar morena en un frasco tipo schott de 1 L por un período de dos semanas.

Al finalizar el periodo de fermentación, las colonias de microorganismos fueron determinadas a través de siembras en placas microbianas usando medio de cultivo MRS.

Del conjunto de colonias, se seleccionaron y aislaron tres de ellas, las cuales fueron sometidas a pruebas de caracterización e identificación bioquímica. Estas cepas identificadas se utilizaron en los inóculo para las siguientes fermentaciones, de acuerdo al diseño experimental establecido para este estudio.

4.3.1.1 Preparación de los desechos de camarón

- **Descongelado:** Los desechos de caparazón de camarón contenidos en una bolsa plástica se descongelaron completamente, depositándolos en un recipiente con agua a temperatura ambiente.
- **Triturado:** La muestra de desecho de camarón descongelada se trituro en un procesador de alimentos o una licuadora en un período de 5 a 10 min, con el propósito de conseguir un tamaño de material adecuado para debilitar la estructura del caparazón, promover la interacción entre las bacterias y la cabeza de camarón, y facilitar la separación de la quitina, proteínas y calcio.

- **Pesado:** Se pesaron 150 g de caparazón en una balanza de precisión para el montaje del biorreactor. Se dejaron aproximadamente 10 g de muestra para determinar el porcentaje de humedad.

4.3.1.2 Determinación del porcentaje de humedad

- 5.0 g de muestra, previamente pesadas (P1), se colocaron en un horno a 110°C, por 2-3 horas. Posteriormente, las muestras se enfriaron y se pesaron (P2). Esta determinación se realizó por cinco veces para determinar el porcentaje de humedad promedio del material.
- Con los datos de P1 y P2 se determinó el porcentaje de humedad de los desechos de camarón triturados de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100 \quad (1)$$

4.3.1.3 Montaje del biorreactor

El sistema de fermentación o biorreactor (Figura 4.2) consistía en un Frasco de vidrio Pyrex tipo schott con tapa, con una capacidad de 1 litro. Este frasco, resistente a autoclave, tenía una altura de 20.3 cm y un diámetro de 8.2 cm.

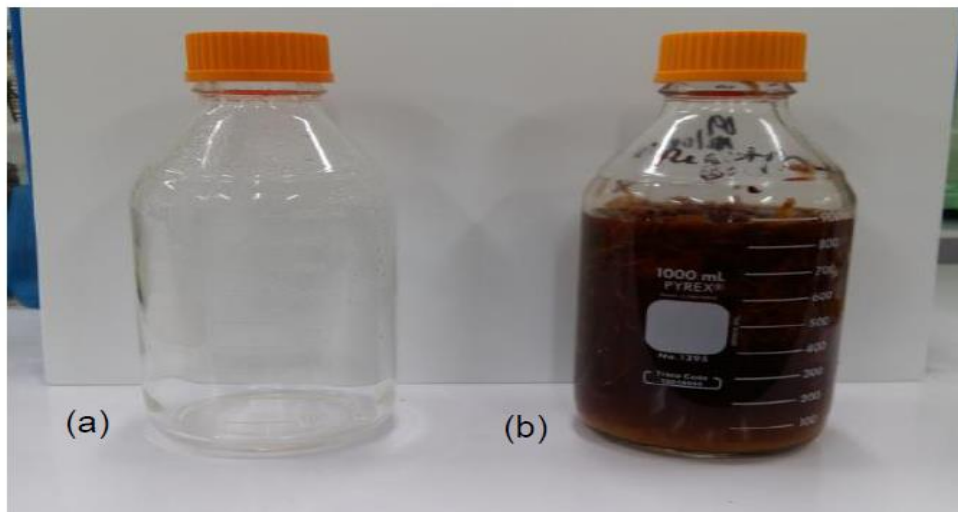


Figura 4.2 Reactor de vidrio Pyrex con tapa con una capacidad de 1 litro. Fuente (García González, 2018).

Los desechos previamente triturados y pesados (150 g de material húmedo) se depositaron en el frasco y posteriormente, se introdujeron 575 ml de suero lácteo enriquecido con azúcar morena al 10% p/v (57.5 g).

Posteriormente, se midió el pH inicial de la mezcla utilizando un pH-metro Orión Mod.410 A. La fermentación batch se llevó a cabo por 14 días, a temperatura ambiente, en el Laboratorio de Alimentos, de la FIQ, UNI. El diagrama de flujo del proceso de fermentación ácido-láctica se muestra en la Figura A.1 del Anexo A.2.

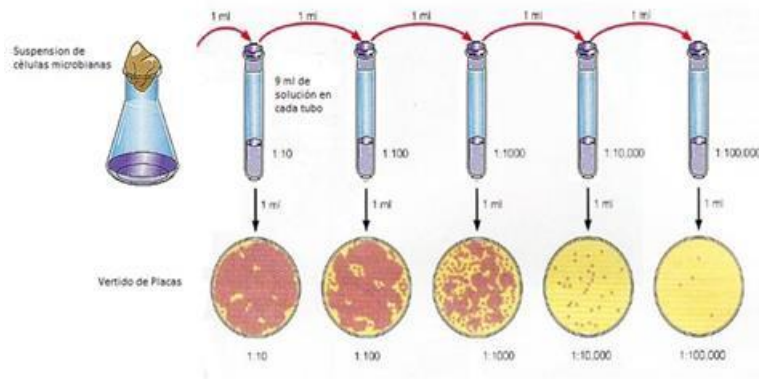
4.3.1.4 Determinación de la concentración de bacterias

Posterior al período de fermentación ácido-láctica, se determinó la concentración de la población total de bacterias, en UFC/ml, mediante la técnica de seriado, de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se tomó una muestra de 1 ml del caldo obtenido en la fermentación ácido-láctica inicial, y se adicionó en un primer tubo conteniendo 9 ml agua peptonada. Se agitó suavemente el tubo y se tomó 1 ml de este primer tubo vertiéndose en un segundo tubo con 9 ml agua peptonada, como se muestra en la Figura 4.3.b. Este procedimiento se repitió hasta una dilución de 1.0×10^6 .
- Utilizando una pipeta estéril, se vertió 1.0 ml de cada una de las diluciones realizadas en placas Petri debidamente identificadas y por duplicado (Figura 4.3.b). Posteriormente, las placas se incubaron a 30°C por un período de 72 horas.



(a)



(b)

Figura 4.3 (a) materiales utilizados en la determinación y (b) Seriado de diluciones decimales (Fuente: García González, 2018).

4.3.1.5 Aislamiento de las cepas

Para el aislamiento, se seleccionaron tres cepas de las placas Petri con el propósito final de escoger dos de las cepas que presentaran mejores resultados y llevar a cabo los experimentos de fermentación ácido-láctica con cepas nativas identificadas.

Los criterios de selección fueron: que las placas y su duplicado presentaran un conteo de colonias en el rango de 30 – 300 (Figura 4.4.a), que las cepas se encontraran aisladas y que, además, tuvieran formas diferentes, para asegurar que estas fueran distintas.

El procedimiento para el aislamiento de las colonias se llevó a cabo para las tres cepas seleccionadas y su duplicado: Cepa 1, Cepa 2 y Cepa 3. El procedimiento se describe en el Anexo A.5.

Cada muestra de cada cepa (y su duplicado) se tomó con el asa de cultivo estéril y se diseminó en la superficie inclinada del medio de cultivos agar MRS, contenido en viales o tubos de ensayo con cultivo axénico (Figura 4.4.b).

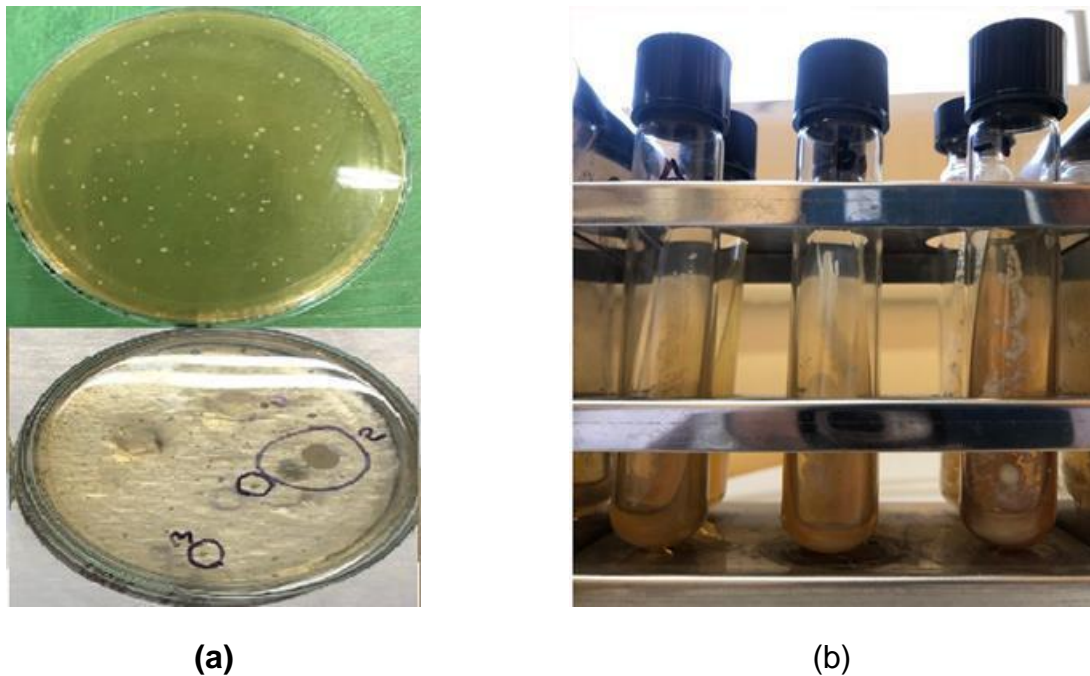


Figura 4.4 (a) cepa seleccionada con su duplicado y (b) cepas obtenidas en tubos con cultivo axénico.

El resultado fueron tres cepas aisladas con su duplicado, para un total de seis tubos con cultivo axénico (Figura 4.4.b). Estos tubos se incubaron a 30°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Esta condición se consiguió colocando en un recipiente una gradilla con los tubos con cultivo axénico y dos tubos con agar MRS.

Los dos tubos con agar MRS sin cultivo fueron un indicador de la posible contaminación en los tubos con cultivos axénicos. Para preservar las cepas se sembraron periódicamente en agar fresco.

Para crear una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono en el frasco, se introdujo una vela encendida antes de sellar la tapa hermética del recipiente. La llama de la vela se quemó hasta extinguirse por falta de oxígeno.

4.3.1.6 Caracterización de las bacterias.

Para la caracterización de las bacterias presentes en las colonias seleccionadas, se realizaron las siguientes pruebas:

- Tinción de Gram (descripción de la metodología en el ítem A.6.1 del Anexo A.6),
- Prueba de catalasa usando peróxido de hidrogeno (descripción de la metodología en el ítem A.6.2 del Anexo A.6),
- Prueba de oxidasa con reactivo de Kovacs (descripción de la metodología en el ítem A.6.3 del Anexo A.6), y
- Prueba de motilidad con el método de la gota pendiente (descripción de la metodología en el ítem A.6.4 del Anexo A.6).

4.3.2 Identificación de microorganismos específicos aislados

Para identificar la bacteria de la colonia o cultivo puro se utilizó el sistema miniaturizado API 50 CH, en conjunto con el médium API 50 CHL empleado para identificar lactobacillus y microorganismos próximos.

El sistema consta de una plantilla plástica con una serie de galerías de 50 microtubos con 49 sustratos fermentables (carbohidratos) y un testigo (Figura 4.5). Los resultados establecen los perfiles de fermentación de carbohidratos de los microorganismos muestra.

El sistema se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante, proporcionadas en la ficha técnica del producto (procedimiento en el ítem A.7.1 del Anexo A.7).



Figura 4.5 Plantilla plástica del sistema miniaturizado API 50 CH.

Finalmente, al obtener los resultados por medio del software APIWeb se encontró que solamente una de las cepas (cepa 1) presentaba un alto porcentaje de identificación, a diferencia de las cepas 2 y 3, las cuales no presentaban porcentaje de identificación por lo que se consideraron que no eran adecuadas para continuar con el estudio.

Para obtener cepas con mayores porcentajes de identificación, se repitieron los ítems 4.3.1.3, 4.3.1.4, 4.3.1.5, 4.3.1.6 y 4.3.2, lográndose un nuevo lote de tres cepas, a las que se les denominó cepa 4, cepa 5 y cepa 6.

De las cepas 4, 5 y 6, se seleccionaron dos cepas bajo los siguientes criterios: forma diferente, amplia presencia en las placas y alto porcentaje de identificación (mayor que el 90% ID). Para continuar con el estudio, a las dos cepas seleccionadas se les codificó como cepa A y cepa B.

4.3.3 Cinética de crecimiento de microorganismos específicos

De acuerdo al diseño experimental se llevaron a cabo 12 experimentos de fermentación ácido-láctica, donde las variables independientes fueron: cepa inoculada (A o B) y el uso del precursor extracto de levadura. Las cepas utilizadas para las pruebas experimentales fueron cepas nativas plenamente caracterizadas e identificadas. A continuación, se describe el procedimiento:

4.3.3.1 Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se dispusieron 4 biorreactores de 250 ml: dos biorreactores para la Cepa A y dos biorreactores para la Cepa B (Figura 4.6.a). En la Tabla 4.1 se describe el tipo de cepa y uso del precursor de cada biorreactor.

Tabla 4.1 Descripción de los biorreactores para la preparación de los inóculos.

No. del biorreactor	Cepa	Uso del precursor
1	A	Sin precursor
2		Con precursor (1 g del extracto de levadura)
3	B	Sin precursor
4		Con precursor (1 g del extracto de levadura)

*Relación de extracto de levadura tomada de Pérez Zoraya (2009)

El procedimiento que se llevó a cabo para la elaboración de los inóculos involucró la preparación de los desechos de camarón (ítem 4.3.1.1) y el montaje del biorreactor (ítem 4.3.1.3) con las siguientes cantidades de materia prima: 65.22 g de desechos de camarón en base húmeda, 25 g de azúcar morena y 250 ml de suero lácteo. Seguidamente se le añadió el precursor a cada biorreactor según descripción de la Tabla 4.1.

Una vez preparados los cuatro biorreactores, sin la presencia de la cepa seleccionada, fueron colocados en la autoclave para su esterilización a una presión de 15 lb y una temperatura de 121°C por un tiempo de 120 minutos. El proceso de esterilización permite la destrucción total de los microorganismos presentes en los materiales utilizados, garantizando, de esta manera, que las únicas bacterias que iniciarán el proceso de fermentación fueran las provenientes de las cepas con características identificadas.

Después del proceso de esterilización, los biorreactores se dejaron enfriar a temperatura ambiente (Figura 4.6.b) y se procedió a adicionarles la Cepa correspondiente, de acuerdo a la descripción de la Tabla 4.1 (Figura 4.6.c).

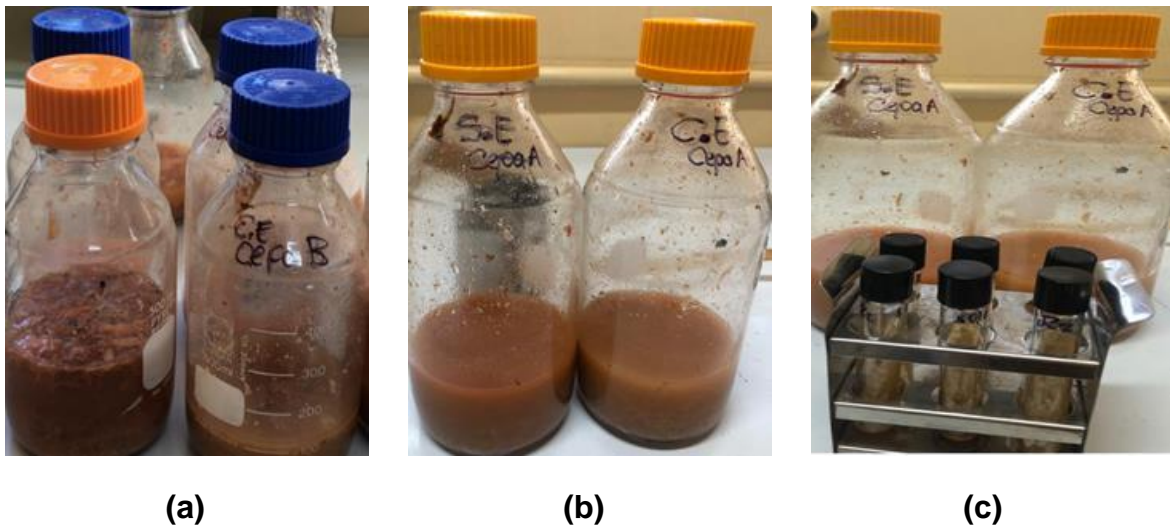


Figura 4.6 (a) Total de reactores obtenidos, (b) reactores recién salidos de autoclave y (c) reactores listos para la adición de la Cepa nativa identificada.

Para llevar a cabo la adición de la cepa, ésta se extrajo por medio de un enjuague; es decir, se tomó 1 ml del licor del biorreactor correspondiente ya esterilizado y se agregó al tubo que contenía la cepa identificada. Posteriormente, se agregó la mezcla conteniendo la cepa al biorreactor (Figura 4.7).

Seguidamente, se midió el pH inicial al licor de cada uno de los biorreactores. Para evitar la contaminación del licor con algún otro microorganismo externo, se tomaron 4 ml de licor de cada biorreactor con una pipeta estéril y se colocaron en un beaker de 150 ml, luego se realizó la lectura utilizando el pH metro.

A los 4 días, después de iniciada la fermentación en los biorreactores, se midió el pH de los licores de cada uno y se observó que tenían un pH más bajo en comparación con el pH inicial. Posteriormente, a los 7 días se volvió a medir el pH y su resultado fue un pH constante por lo que se llegó a la conclusión que el inculo ya estaba listo para el siguiente procedimiento.



(a)

(b)

Figura 4.7 Enjuague e introducción de Cepa A al (a) biorreactor sin precursor y (b) biorreactor con precursor.

4.3.3.2 Montaje de los biorreactores

El procedimiento para el montaje de los biorreactores con el objetivo de estudiar el efecto de las variables independientes en el comportamiento del pH, del porcentaje de acidez total titulable (%ATT) y en la cinética de crecimiento de microorganismos específicos, se describe a continuación:

- a. En un frasco tipo schott de un litro se agregaron 135 g de desechos de camarón, previamente descongelados y lavados, 51.75 g de azúcar y 517.5 ml de suero lácteo y 2.07 g de extracto de levadura según lo indicado en la Tabla A.2 del Anexo A.3.

- b. Seguidamente, el biorreactor ya preparado (Figura 4.8.a) fue esterilizado en la autoclave a una presión de 15 lb y una temperatura de 121°C, por un tiempo de 120 minutos.
- c. Después que el biorreactor se enfría a temperatura ambiente, se adiciona 57.5 ml del inóculo de la cepa nativa identificada (A o B) (Figura 4.8.b), según corresponda al número de ensayo del diseño experimental presentado en la Tabla A.2 del Anexo A.3
- d. Posteriormente, después de mezclar el reactor se tomó una muestra para determinar el pH inicial, el %ATT y el conteo de bacterias (UFC/ml). El proceso de fermentación ácido-láctica se llevó a cabo por 14 días, a temperatura ambiente, en el Laboratorio de Alimentos, de la FIQ, UNI.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.8 (a) biorreactor listo para inocular, (b) Algunos de los reactores montados conforme al diseño experimental y (c) Lectura de placas a 24 horas de incubación.

4.3.3.3 Monitoreo del proceso de fermentación

Consistió en dar seguimiento al proceso de fermentación ácido-láctica de cada biorreactor durante 2 semanas. Cada 12 horas se tomaban muestras de los biorreactores, iniciando a un tiempo $t = 0$, para determinar:

- pH: procedimiento en el A.8.3, respectivamente, del Anexo A.8.
- Porcentaje de Acidez Total Titulable (%ATT): procedimiento en el A.8.4, respectivamente, del Anexo A.8.

- Conteo de UFC/mL de caldo de cultivo: se utilizó el procedimiento del ítem 4.3.1.4 con un periodo de incubación de 24 horas.

A partir de los datos experimentales obtenidos se construyeron:

- Los gráficos de pH y %ATT en función del tiempo.
- Las curvas cinéticas de Log UFC/ml vs. tiempo.

4.3.4 Diseño Experimental

Con este estudio se comprueba si las variables independientes tienen algún efecto en la cinética de crecimiento microbiana de la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón y suero lácteo.

El estudio requiere de un diseño factorial donde se evaluaron dos variables de manera simultánea: tipo de cepa y uso de precursor; midiendo la cinética de crecimiento (Log UFC/ml en función del tiempo), el pH y el porcentaje de acidez total titulable (%ATT), los cuales se basan en trabajos anteriores (Marcia, Malespín, Sánchez y Benavente, 2011; García González, 2018).

Este diseño involucró combinaciones entre los niveles de dos factores, con la finalidad de determinar su efecto en el crecimiento poblacional bacteriano hasta su llegada a la fase estacionaria. En la Tabla 4.2 se muestran los niveles considerados.

Tabla 4.2 Factores y niveles de diseño experimental factorial.

Factores	Niveles	Descripción	Variable Respuesta
Tipo de microorganismo	2	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa A • Cepa B 	Conteo UFC/ml pH
Uso de Precursor	2	<ul style="list-style-type: none"> • Con precursor • Sin precursor 	Porcentaje de acidez total titulable

Para determinar el número de tratamiento para el diseño experimental se utilizó el software STATGRAPHIC PLUS, seleccionando el diseño multifactorial con una réplica para un total de 12 experimentos. En la Tabla A.2 del Anexo A.3 se muestra el resultado de cruce de variables independientes:

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los principales resultados y discusión del aislamiento, caracterización e identificación de cepas nativas encontradas en la fermentación ácido-láctica de desechos de cabezas de camarón de agua dulce, de la especie *Penaeus vannamei* de la familia Penaeidae, usando suero lácteo y azúcar morena como sustrato.

Así mismo, se presentan los resultados de la evaluación del comportamiento del proceso de fermentación ácido láctica usando cepas plenamente caracterizadas e identificadas, con y sin el precursor Extracto de levadura, a través del monitoreo del pH, Acidez Total Titulable (%ATT), y el conteo de bacterias en UFC/ml.

5.1 Caracterización e identificación de cepas nativas




Para un primer aislamiento y caracterización de cepas nativas se requirió una fermentación ácido-láctica inicial de caparazón de camarón con un alto grado de porcentaje de humedad promedio del 80%, suero lácteo y azúcar morena, por un período de dos semanas y con un pH inicial de 6.0. Al final del proceso fermentativo se obtuvo un pH final de 3.32 y una concentración promedio de microorganismos totales de 36×10^5 UFC/ml.

A partir del seriado de diluciones se obtuvieron un total de doce placas Petri, las cuales presentaron crecimiento microbiano en su totalidad. Para el aislamiento, se seleccionaron tres cepas, a las que se denominaron 1, 2 y 3, bajo los criterios: forma diferente y amplia presencia en las placas.

A las cepas aisladas se les realizaron una serie de siembras, en medio sólido, hasta lograr cultivos morfológicamente uniformes, los cuales fueron sometidos a las pruebas de: Tinción de Gram, Catalasa, Oxidasa, Motilidad y Morfología Celular. Los resultados de la caracterización presentados en la Tabla 5.1 muestran que las cepas aisladas A y C, dan positiva a las pruebas de tinción de gram, y negativa para las pruebas de oxidasa, motilidad y catalasa.

Los resultados encontrados concuerdan con aquellos determinados por García y Benavente (2019), los cuales describen el comportamiento de bacterias del género ácido láctico (Paramo, 2013, en García y Benavente, 2019). Es decir, este grupo de bacterias son fisiológicamente uniformes, de pared Gram-positiva, anaerobias facultativas, catalasa negativa y no formadoras de esporas (Parras-Huerta, 2010). Esto no ocurre con la cepa B, que presenta una discrepancia en la prueba de catalasa.

Tabla 5.1 Descripción de las características e identificación de las cepas obtenidas del primer aislamiento del reactor inicial de fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón y suero lácteo.

Colonia	1	2	3
Descripción	Color: Blanca Tamaño: pequeña Aspecto: Brillante Forma: Redonda (punto) Bordes: Lisos Altura: Plana	Color: Crema Tamaño: Grande Aspecto: Opaco Forma: Redonda con un punto en el centro. Bordes: Lisos Altura: Convexa	Color: Crema Tamaño: Mediano Aspecto: Opaco Forma: Redonda Bordes: Lisos Altura: Convexa
Imagen			
Morfología Celular	Bacilo	Bacilo	Cocobacilos
Tinción de Gram	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo	Negativo
Motilidad	No tiene motilidad	No tiene motilidad	No tiene motilidad
Catalasa	Negativo	Positiva	Negativo
Cepa identificada	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (96.1 %), <i>Lactobacillus buchneri</i> (2.6 %)	<i>Lactobacillus brevis</i> 3, <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1(ambos sin porcentaje de identificación)	<i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1 (ambos sin porcentaje de identificación)

Así también, los resultados del proceso de identificación de las cepas seleccionadas usando el sistema API 50 CH en conjunto con el API 50 CHL, indican que la cepa 1 fue plenamente identificada como *Lactobacillus brevis* 3 con un porcentaje de identificación (ID) del 96.1%. No obstante, el sistema también indicó la presencia de *Lactobacillus buchneri* con un ID del 2.6 %.

Por su parte, los resultados de la identificación de las bacterias aisladas (cultivo puro), para las cepas 2 y 3 mostraron la presencia de: *Lactobacillus brevis* 3, *Lactococcus lactis ssp lactis* 1, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum* 1. Sin embargo, estas cepas no presentaban un porcentaje de identificación, indicando un resultado no confiable en la identificación de las bacterias aisladas.

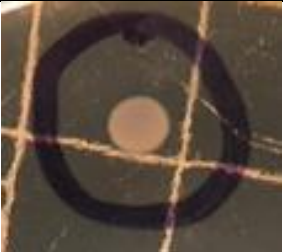


Para obtener cepas con mayores porcentajes de identificación, se repitió el proceso de aislamiento de las cepas de un reactor de fermentación con un pH de 3.39 y una concentración promedio de 138×10^3 UFC/ml. La selección de las cepas se realizó bajo los mismos criterios de selección antes mencionados, denominando a estas cepas como 4, 5 y 6. En la Tabla 5.2 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas, de motilidad, morfología celular y Sistema API 50 CH en conjunto con el API 50 CHL.

La Tabla 5.2 indica que las cepas 4, 5 y 6 presentaron un alto porcentaje de identificación (mayor que el 93%); observándose que la cepa 4 presenta el mismo taxón de la cepa 1 (*Lactobacillus brevis* 3). Por su parte, la cepa 5 y 6 presentaron colonias bacterianas no encontradas en el aislamiento inicial: *Lactobacillus brevis* 2 y *Lactobacillus buchneri*.

Estos resultados reflejan que en el caldo de fermentación ácido láctica de camarón y suero lácteo están presentes diferentes cepas bacterianas del género *lactobacillus*, lo cual fue también corroborado por González y Benavente (2019), ya que ellos identificaron y confirmaron la presencia de cepas de *Lactobacillus paracasei* 1 y *Leuconostoc mesenteroides cremoris* en un caldo de fermentación láctica de caparazón de camarón de mar.

De acuerdo al tipo de fermentación de la glucosa, las especies *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* del género *Lactobacillus* se clasifican como heterofermentativas estrictas; es decir, la fermentación se lleva a cabo mediante la vía del 6-fosfogluconato y origina por cada mol de glucosa consumida, 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o ácido acético) y 1 mol de ácido láctico (Thomas, Ellwood, & Longyear, 1979; De Vos, y otros, 2009).

Tabla 5.2 Descripción de las características e identificación de las cepas obtenidas del segundo aislamiento del reactor inicial de fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón y suero lácteo

Colonia	4	5	6
Descripción	Color: Blanca Tamaño: Mediano Aspecto: Brillante Forma: Redonda Bordes: Lisos Altura: Plana	Color: Blanca Tamaño: Mediana Aspecto: Opaco Forma: Husillo Bordes: Lisos Altura: Convexa	Color: Blanca Tamaño: Pequeña Aspecto: Opaco Forma: Husillo Bordes: Lisos Altura: Convexa
Imagen			
Morfología Celular	Cocobacilos	Cocobacilos	Cocobacilos
Tinción de Gram	Positivo	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo	Negativo
Motilidad	No tiene motilidad	No tiene motilidad	No tiene motilidad
Catalasa	Negativo	Negativo	Negativo
Especie identificada	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (97.5 %), <i>Lactobacillus buchneri</i> (2.2 %)	<i>Lactobacillus brevis</i> 2 (93.3%), <i>Lactobacillus fermentum</i> 1 (6.6%)	<i>Lactobacillus buchneri</i> (99.3%), <i>Lactobacillus brevis</i> 3 (0.4 %)

Para cumplir el objetivo del estudio cinética de crecimiento de microorganismos ácido-lácticos aislados durante la fermentación de caparazón de camarón, se seleccionaron las dos cepas con el mayor porcentaje de identificación, según el sistema API 50 CH en conjunto con el API 50 CHL. En la Tabla 5.3 se indica las cepas seleccionadas a las que se denominaron como A y B.

Tabla 5.3 Cepas bacterianas aisladas de la fermentación ácido-láctica de desechos de cabezas de camarón de agua dulce, de la especie *Penaeus vannamei* de la familia Penaeidae, suero lácteo y azúcar morena.

Cepa	Especie	Porcentaje de Identificación
A	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	97.5 %
B	<i>Lactobacillus Buchneri</i>	99.3 %

5.2 Cinética de crecimiento de microorganismos específicos

Para evaluar el efecto del tipo de cepa: A (*Lactobacillus brevis 3*) y B (*Lactobacillus Buchneri*) y uso del precursor (Extracto de levadura al 0.1%) en la cinética de crecimiento de microorganismos específicos durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón se llevaron a cabo 12 experimentos, de acuerdo al diseño experimental presentado en la Tabla A.2 del anexo A.3.

La cinética bacteriana, ante el consumo de proteínas y minerales que posee el caparazón de camarón y el suero lácteo, fue valorada mediante la determinación del conteo celular poblacional (UFC/ml), el pH y el % ATT del caldo de fermentación. Los datos experimentales en función del tiempo (en horas) se presentan en las Tablas de A.3 a A.14 del Anexo A.4.

5.2.1 Efecto del precursor Extracto de levadura

Para que los microorganismos crezcan y se multipliquen deben existir ciertas condiciones ambientales tales como tiempo, alimento (nutrientes), agua, temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno. Si las condiciones para el crecimiento son óptimas los microorganismos incrementarán en número (Pérez Zelaya, 1997).

El extracto de levadura contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas y elementos esenciales de alta calidad como factor de crecimiento (Laboratorios Britania S.A, 2019). Por lo tanto, ya que las bacterias ácido lácticas requieren vitaminas y aminoácidos, además de carbohidratos como fuente de carbono y energía, en este estudio se analiza el efecto de este precursor en el pH, el %ATT y en la cinética de crecimiento de la población bacteriana durante la fermentación de caparazón de camarón y suero lácteo.

Para analizar este efecto se realizaron experimentos con y sin precursor. Los resultados del estudio se reflejan en las Figuras 5.1 y 5.2, donde se muestra la curva del crecimiento bacteriano, Log (UFC/ml) en función del tiempo, pH y %ATT de la cepa *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y de la cepa *Lactobacillus Buchneri* (cepa B), sin precursor (SP1) y con precursor (CP2).

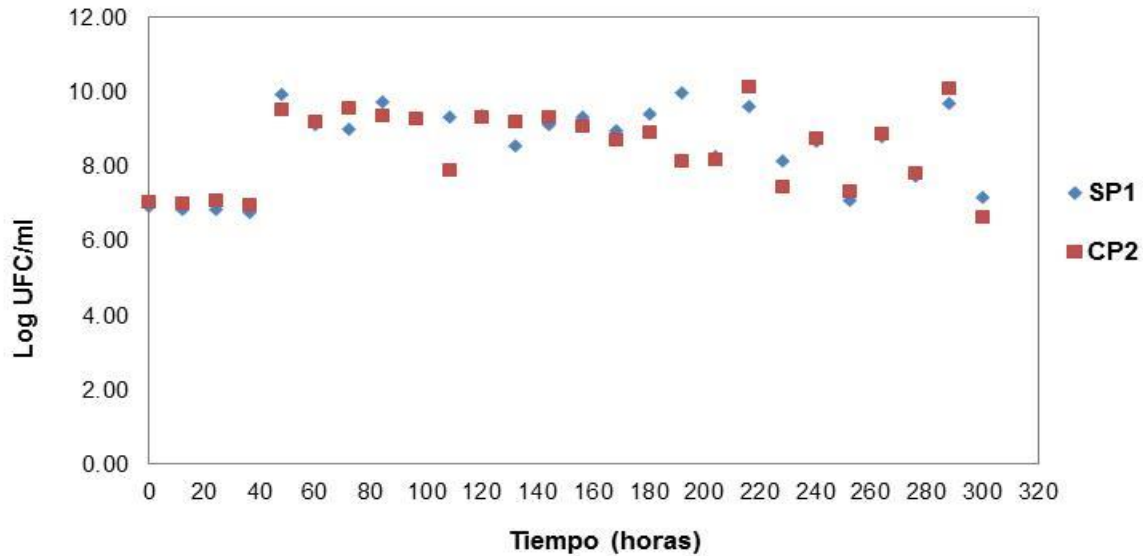
En la Figura 5.1.a, correspondiente al crecimiento bacteriano de la cepa *Lactobacillus brevis* 3, con precursor (SP1) y sin precursor (CP2), se distinguen las diferentes fases de crecimiento de la población bacteriana.

Para la curva con extracto, prácticamente no hubo presencia de Fase Lag. No obstante, para la curva sin extracto, esta fase es de aproximadamente 36 h la cual es relativamente corta en comparación con la curva de crecimiento bacteriano poblacional obtenido por Pérez & Benavente (2019), donde la Fase Lag fue de aproximadamente 80 h en un reactor con las mismas condiciones del reactor inicial empleado en este estudio.

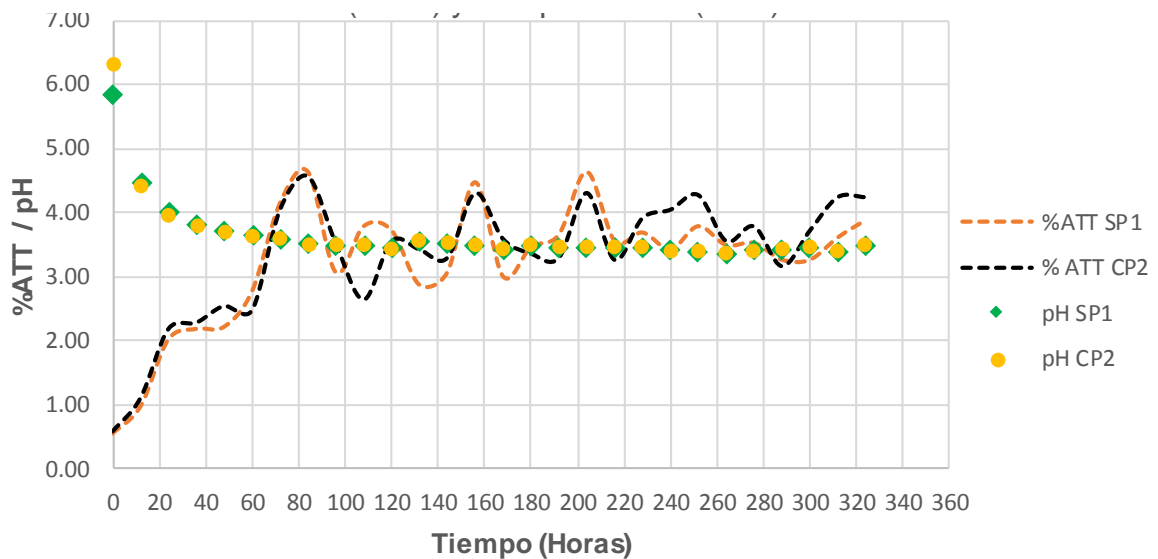
Así mismo, se observa como gradualmente pasa a la fase exponencial, donde se genera la mayor cantidad de células microbianas, siendo ésta la mejor etapa de vida de las bacterias. Posteriormente, a las 60 h del proceso de fermentación, entran a la fase estacionaria donde se produce un cese del crecimiento de la población bacteriana posiblemente debido al agotamiento de nutrientes, a la acumulación de algún producto metabólico tóxico y a cambios en el medio (Pérez Zelaya, 1997). En esta fase el comportamiento es inestable con repentinos cambios en los valores de Log UFC/mL hasta alcanzar puntos estables en el rango de 120 – 180 horas.

La fase de declive se efectúa en 24 horas, para finalizar a las 192 horas. La curva cinética continua con un comportamiento muy variable hasta la finalización del monitoreo (2 semanas), con crecimiento y un paulatino decrecimiento de las células en el mismo período de tiempo. Esto puede deberse a que durante el proceso de fermentación se rompen las membranas de la pared celular de las células muertas y el endógeno se convierte en alimento de las células vivas (Brock, Smith, & Madigan, 1987) y al efectuar un monitoreo exhaustivo cada 12 horas de la población microbiana se obtiene una valoración más sensible, que permite observar estos cambios en los gráficos.

Comparando las dos curvas cinéticas de crecimiento de la Figura 5.5.a (con y sin precursor), se observa que el comportamiento es prácticamente similar; es decir, las diferentes etapas de la cinética de crecimiento se producen en el mismo período de tiempo. Este comportamiento indica que el extracto de levadura no es un precursor adecuado para la Cepa *Lactobacillus brevis* 3, ya que no hay cambios en la cinética de crecimiento para alcanzar la fase exponencial.



(a) Curva cinética de crecimiento.



(b) Gráficos de pH y %ATT.

Figura 5.1 Comparación de (a) curva cinética de crecimiento y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo de la cepa *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A), sin precursor (SP1) y con precursor (CP2).

Por otro lado, la Figura 5.1.b muestra que los gráficos de pH en función del tiempo, sin extracto (SP1) y con extracto (CP2), tuvieron un comportamiento similar con un descenso gradual del pH, hasta alcanzar valores entre 3.60 y 3.45. Estos resultados indican que el extracto de levadura no tiene un efecto significativo en el pH del medio, lo que se traduce en el mínimo efecto que tiene este precursor en el crecimiento bacteriano.

De acuerdo a Romero Cabello (2007), el efecto del pH sobre los microorganismos o sobre las unidades formadoras de colonias es significativo ya que afecta directamente su crecimiento al modificar el medio de cultivo.

En la Figura 5.1.b también se puede observar que, para ambos casos, con precursor y sin precursor, el %ATT muestra un gradual incremento hasta un valor máximo de 4.57% a las 84 horas, donde el pH alcanza estabilidad. Según Araujo et al. (2009), al ocurrir una disminución del pH se presenta un aumento en el %ATT, debido a la producción metabólica de ácido láctico a partir de la fuente de carbono.

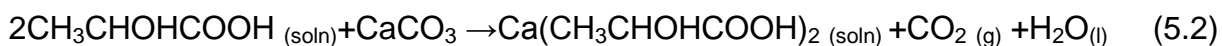
El comportamiento del %A TT es muy variable durante el proceso fermentativo (Figura 5.1.b), esto debido a que en el método biológico, la función de desproteínizar y desmineralizar los desechos de camarón, están a cargo de las bacterias *Lactobacillus* a través de la fermentación ácido láctica, la cual causa una reducción gradual del pH y un aumento de la acidez total titulable (Duran, Romero, García, Brenes, & Garrido, 1997). Ambos procesos ocurren de manera simultánea, donde el ácido láctico es consumido a través del proceso de desmineralización y producido a través de la desproteínización del camarón.

El ácido láctico producido durante la fermentación láctica homofermentativa, reacciona con los minerales de calcio, los cuales se encuentran unidos a la quitina en el caparazón de camarón produciendo lactato de calcio.

En la fermentación homoláctica una molécula es convertida a dos moléculas de ácido láctico (Xu, Gallert, & Winter, 2008):



Y en la desmineralización, 2 moléculas de ácido láctico reaccionan con una molécula de carbonato de calcio:



La desproteínización es llevada a cabo por las enzimas peptidasas (antes conocidas como proteasas) las cuales se encuentran presentes de forma natural en el crustáceo. Estas enzimas son activadas a bajo pH y actúan rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción del licor (L. A. Cira, S. Huerta, G. Hall, G.M y Shirai K., 2002).

En las curvas de crecimiento bacteriano de la *Lactobacillus Buchneri* (cepa B), con extracto y sin extracto (Figura 5.2.a), se distinguen tres fases de crecimiento de la población bacteriana. Para la curva con extracto, prácticamente no hubo presencia

de Fase Lag; de igual manera, para la curva sin extracto, esta fase es de aproximadamente 36 horas, al igual que con la cepa *Lactobacillus brevis* 3.

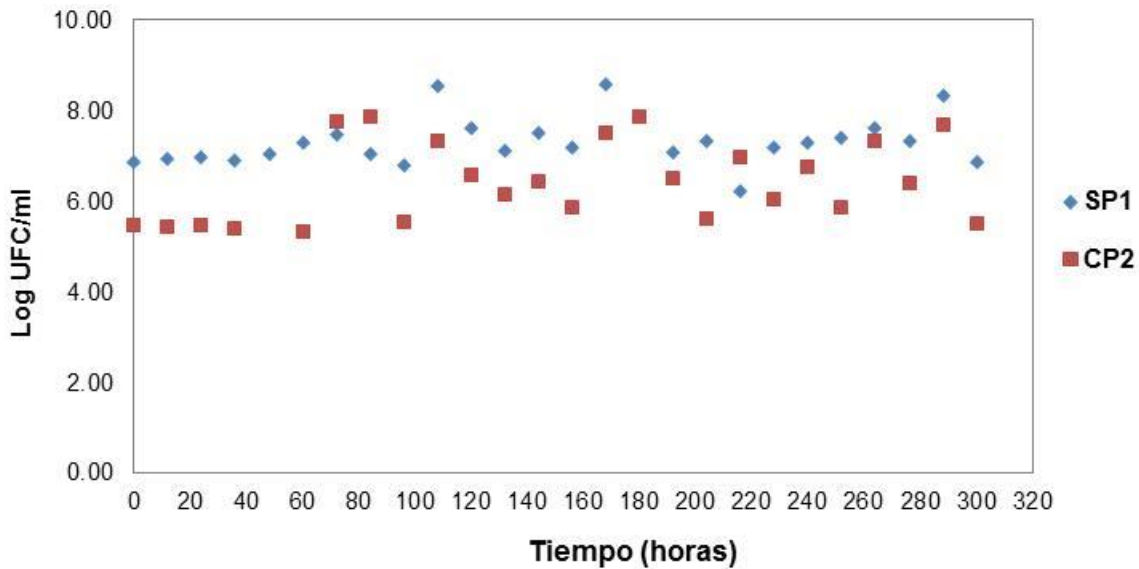
Así también, se observa como gradualmente ambas curvas pasan a la fase exponencial, donde se presenta la mayor reproducción de células microbianas. Posteriormente, a las 48 horas del proceso entran a la fase estacionaria. Esta fase al igual que con la cepa *Lactobacillus brevis* 3, muestra una gran variación en los valores de Log UFC/mL. Esto, al igual que en el caso anterior, puede deberse al rompimiento de las membranas de la pared celular de las células muertas convirtiéndose en alimento para las células vivas (Brock, Smith, & Madigan, 1987).

Comparando las dos curvas de crecimiento bacteriano de la Figura 5.2.a, se observa que las diferentes etapas de la cinética de crecimiento se producen en el mismo período de tiempo. No obstante, se observa una mayor concentración poblacional de microorganismos cuando no se usa el precursor. Este comportamiento indica que el extracto de levadura no es un precursor adecuado para este tipo de bacteria, ya que no acelera la cinética de crecimiento para alcanzar la fase exponencial y provoca un efecto opuesto al disminuir la concentración poblacional de microorganismos en el medio.

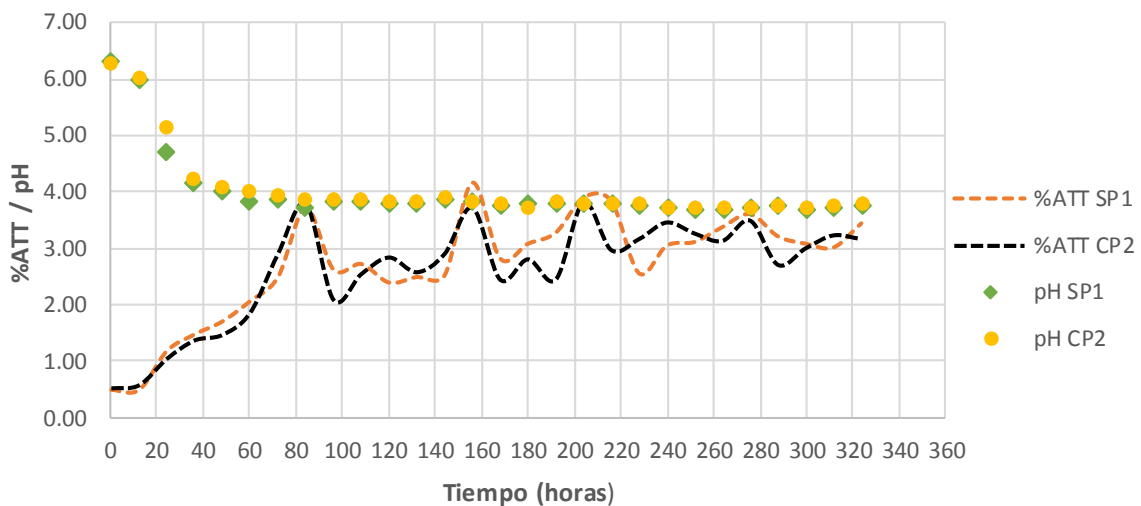
Estos resultados son distintos a aquellos encontrados por Pérez Zelaya (1997), ya que el uso de este precursor permitió reducir el tiempo de crecimiento para alcanzar el máximo desarrollo de la bacteria *Azotobacter chroococcum* (fase exponencial) de 24 a 12 horas.

Por su parte, la Figura 5.2.b muestra que las curvas de pH sin extracto (SP1) y con extracto (CP2) descienden, de igual manera, hasta alcanzar un valor de 3.87 a las 84 horas del proceso; observándose que los valores de pH se mantuvieron constantes entre 3.85 y 3.78. El descenso del pH se debe a la producción de ácido láctico durante el proceso de fermentación, el cual reacciona con los minerales, principalmente de calcio, asociados a la quitina en el caparazón de crustáceos, formando lactatos de calcio y promoviendo la desmineralización del material (Colina, y otros, 2017).

Las curvas de % ATT de la cepa B sin precursor (SP1) y con precursor (CP2) (Figura 5.2.b), muestran un ascenso hasta un máximo de 3.71% a las 84 horas, donde las curvas de pH alcanzan estabilidad. El comportamiento del %ATT después de las 84 h es variable, con aumentos y bajas en su valor hasta la finalización del proceso.



(a) Curva cinética de crecimiento.



(b) Gráficos de pH y %ATT.

Figura 5.2 Comparación de (a) curva cinética de crecimiento y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo de la cepa *Lactobacillus Buchneri* (cepa B), sin precursor (SP1) y con precursor (CP2).

5.2.2 Tipo de cepa: *Lactobacillus brevis* 3 (A) y *Lactobacillus Buchneri* (B)

Para analizar el efecto de las cepas *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y *Lactobacillus Buchneri* (cepa B) en la cinética de crecimiento bacteriano de la fermentación ácido láctica de caparazón de camarón y suero lácteo se realizaron experimentos con y sin

precursor. Los resultados del estudio se reflejan en la Figura 5.3 (sin precursor) y en la Figura 5.4 (con precursor).

La comparación de la curva cinética de crecimiento la cepa A y cepa B sin precursor (Figura 5.3.a), indica que ambas curvas presentan una Fase Lag de aproximadamente 36 horas y una fase exponencial de 12 horas, la cual finaliza después de transcurrido 48 horas del proceso. Posteriormente, el comportamiento es muy variable hasta la finalización del monitoreo. No obstante, también se observa una mayor concentración poblacional de microorganismos en la fase estacionaria cuando se usa la cepa *Lactobacillus brevis* 3.

Por otro lado, la Figura 5.3.b, muestra que el pH tuvo un comportamiento análogo en ambos reactores, con un descenso gradual hasta un valor de 3.73 para la cepa B y 3.53 para la cepa A, correspondiente a 84 horas. Subsiguientemente, los valores de pH se mantuvieron en un intervalo constante entre 3.85 y 3.68 para la cepa B, y entre 3.55 y 3.38 para la cepa A.

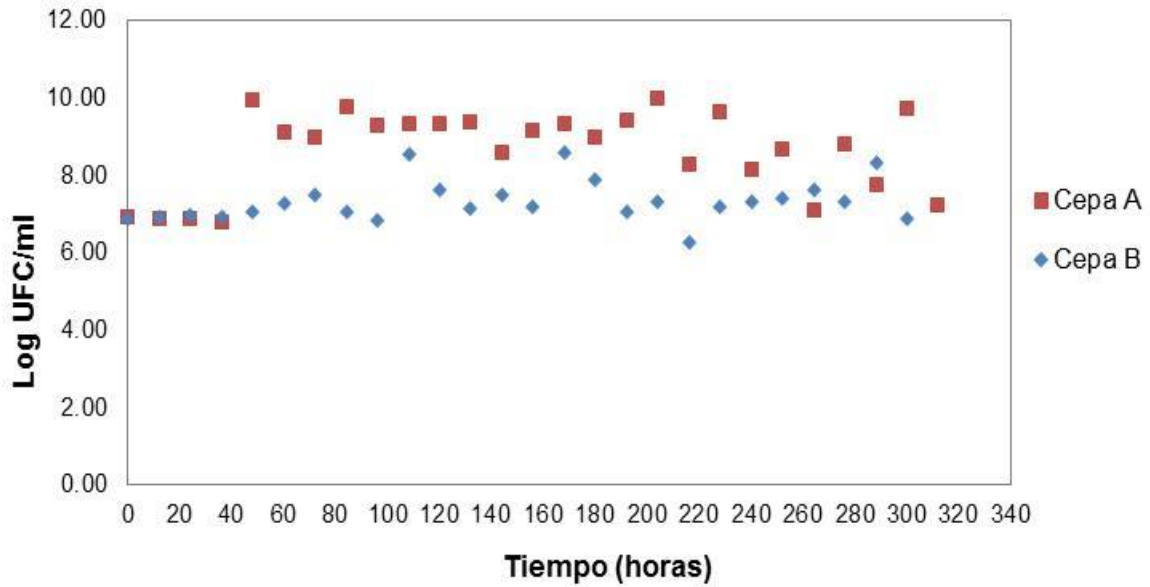
Así también, las curvas de % ATT (Figura 5.3.b) para ambos reactores tienen un comportamiento similar, observándose un incremento de hasta 4.64% para la cepa B y 3.71% para la cepa A, a 84 horas de iniciado el proceso de fermentación. Después, el comportamiento del % ATT es variable, con aumentos y disminución de su valor hasta finalizar el proceso.

Las curvas cinéticas de crecimiento de la cepa A y la cepa B, con precursor (Figura 5.4.a), muestra que ambas cepas inician la Fase lag con distintos valores de log UFC/ml, la cepa A con 7.03 y la cepa B con valor de 5.44.

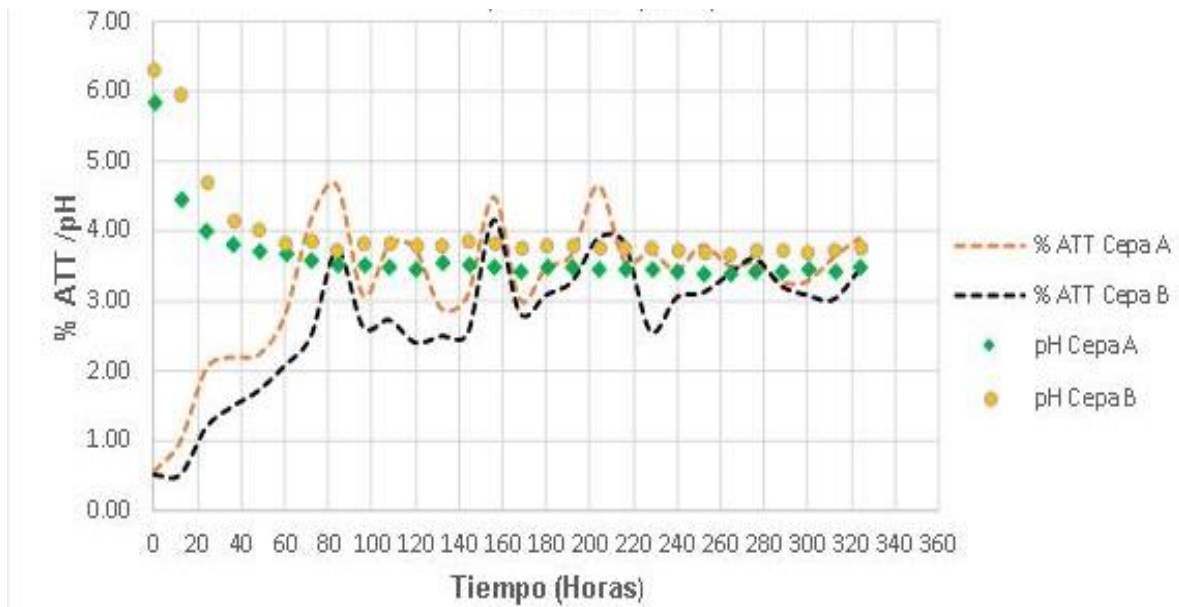
Esta diferencia continúa durante la Fase Lag con una duración de 36 horas, la fase exponencial para la cepa A ocurre en 24 horas que finaliza las 24 horas y para la cepa B es de 12 horas que finaliza a las 48 horas. Posterior a estas etapas, el comportamiento de las curvas es muy variable hasta la finalización del monitoreo manteniendo una diferencia durante el trayecto de la fermentación.

Contrastando las curvas de la Figura 5.4a, se observa que el comportamiento es prácticamente similar; es decir, las diferentes etapas de la cinética de crecimiento se producen en el mismo período de tiempo; no obstante, también se observa una mayor concentración poblacional de microorganismos cuando se usa la cepa A (*Lactobacillus brevis* 3).

En cuanto al pH (Figura 5.4b), los reactores con cepa A y B, con extracto (CP2) presentaron un comportamiento similar, con un descenso gradual hasta un valor de 3.87 para la cepa B y 3.52 para la cepa A que corresponde a las 84 horas. Posterior a esto, los valores de pH se mantuvieron en un intervalo constante de aproximadamente de 3.89-3.71 para la cepa B y 3.71-3.40 para la cepa A.



(a) Curva cinética de crecimiento microbiano.

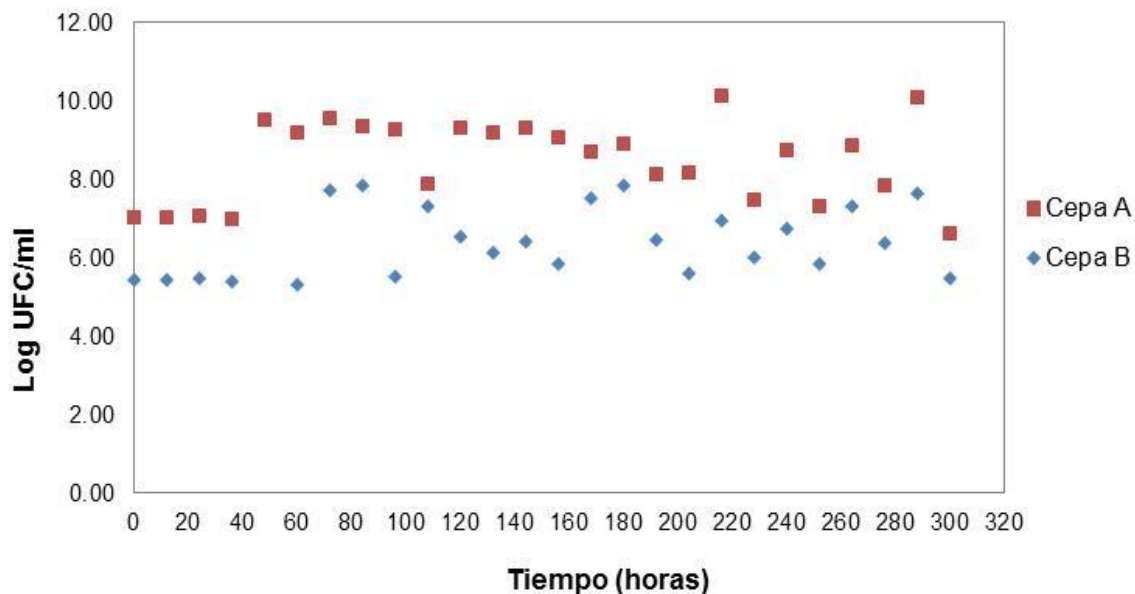


(b) Gráficos de pH y %ATT.

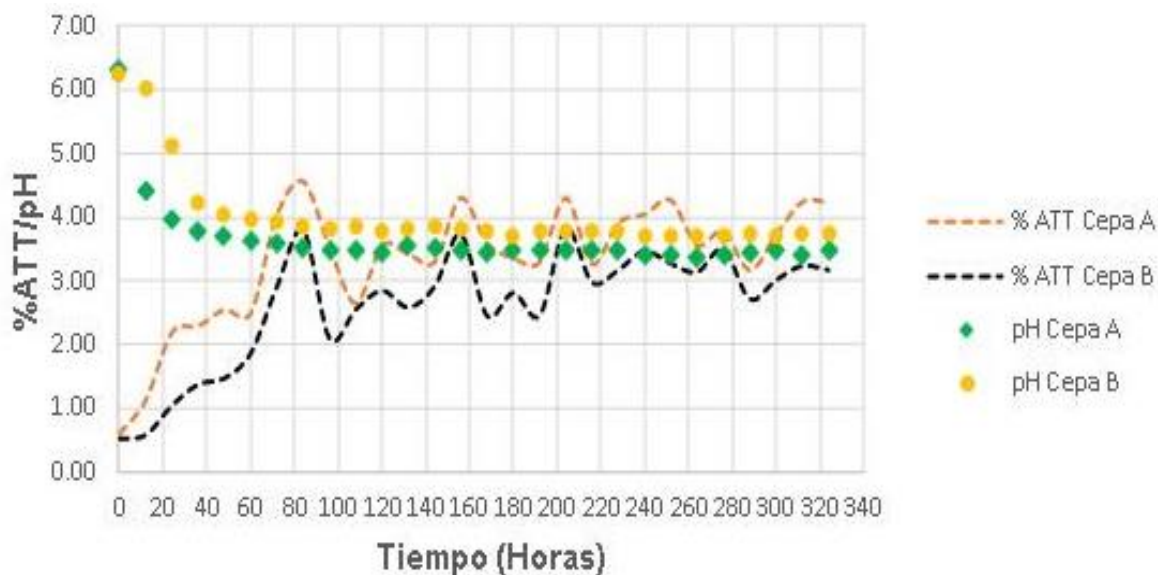
Figura 5.3 Comparación de (a) la curva cinética de crecimiento bacteriano de las cepas *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y *Lactobacillus Buchneri* (cepa B) y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo, sin precursor (SP1).

Las curvas de % ATT de la cepa B y cepa A, con precursor (CP2) (Figura 5.4b), muestran un ascenso hasta un máximo de 3.87 para la cepa B y 4.57 para la cepa A

en tiempo de 84 horas. El comportamiento del pH después de las 84 h es variable, con aumentos y bajas en su valor hasta la finalización de su monitoreo, conservando la cepa A valores superiores de % ATT.



(a) Curva cinética de crecimiento microbiano.



(b) Gráficos de pH y %ATT.

Figura 5.4 Comparación de (a) la curva cinética de crecimiento bacteriano de las cepas *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y *Lactobacillus Buchneri* (cepa B) y (b) gráficos de pH y %ATT en función del tiempo, con precursor.

En resumen, los gráficos comparativos del comportamiento de las cepas aisladas *Lactobacillus brevis* 3 (cepa A) y *Lactobacillus Buchneri* (cepa B) en medio estéril, con precursor (CP2) y sin precursor (SP1) indican que:

- La cepa A no presenta una variación notoria en su cinética microbiana con el uso del precursor (extracto de levadura). Por lo contrario, los biorreactores que contiene la cepa B disminuye su población microbiana durante el proceso fermentativo con el uso del precursor.
- La población microbiana de los biorreactores inoculados con la cepa A, no son afectados con la ausencia o presencia del extracto de levadura, esto se muestra en los gráficos debido a que la cepa A supera a las curvas de la cepa B en los valores de Log UFC/ml.
- Al comparar la curva de crecimiento bacteriano (Log UFC/ml) durante la fermentación ácida de caparazón de camarón y suero lácteo en función del tiempo obtenida por (Pérez & Benavente, 2019), cuyas condiciones de trabajo son las empleadas en el reactor inicial de este estudio. Revelan que emplear condiciones estériles y cepas aisladas, originan mayor población microbiana durante el proceso fermentativo.
- Los biorreactores con cepa A, finalizaron con valores de pH menores, en rango de 3.48-3.51, en comparación con los que emplearon cepa B cuyo rango se encuentra en valores de 3.74-3.80. Esto indica que los biorreactores con cepa A produjeron mayor ácido láctico como resultado del proceso fermentativo.
- Las fases de las curvas de crecimiento bacteriano, muestran un comportamiento no definido para las fases estacionario y de declive donde la conducta de la curva es inestable, con crecimiento y un paulatino decrecimiento de las células en el mismo período de tiempo.

6. CONCLUSIONES

La caracterización fisiológica, bioquímica y la aplicación del sistema miniaturizado API 50 CH indican que las cepas aisladas A y B fueron plenamente identificadas como *Lactobacillus brevis* 3 (ID: 97.5%) y *Lactobacillus Buchneri* (ID: 97.5%), respectivamente. Cepas del género *Lactobacillus*, Gram-positiva.

La cinética de las curvas de crecimiento de las cepas *Lactobacillus brevis* 3 y *Lactobacillus Buchneri* en la ruta metabólica ácido láctica del caparazón de camarón, con y sin extracto de levadura, mostró tres fases en el periodo de fermentación de dos semanas: la fase Lag, la fase exponencial y fase estacionaria. La fase de adaptación o fase Lag se efectuó aproximadamente en un periodo de 36 h, la cual es relativamente corta en comparación con la curva de crecimiento bacteriano poblacional obtenida en estudios anteriores de aproximadamente 100 h. Por su parte las curvas experimentan una breve fase exponencial, seguida de la fase estacionaria caracterizada por valores variables de Log UFC/m en el tiempo.

La comparación de las curvas cinéticas de crecimiento de las cepas identificadas, con y sin extracto de levadura, permiten concluir que no hay diferencia entre las diferentes fases de la curva de crecimiento, las cuales se producen en el mismo periodo de tiempo. No obstante, el uso del precursor causa:

- (i) Un efecto no deseado en los biorreactores que contiene la cepa *Lactobacillus Buchneri* puesto que disminuye la población microbiana durante el proceso fermentativo;
- (ii) Un efecto positivo en el comportamiento del pH ya que disminuye más rápidamente en los primeros días de fermentación, provocando que la fase de adaptación de las bacterias ácido lácticas sea más corta y
- (iii) Ningún efecto en el comportamiento del %ATT, el cual es muy variable durante el proceso fermentativo, debido a la producción del ácido láctico durante la desproteínización de los desechos de camarón y al consumo de este mismo ácido durante la desmineralización del material, donde ambos procesos ocurren de manera simultánea.

Con lo anterior, se concluye que el extracto de levadura no es un precursor adecuado para las cepas *Lactobacillus brevis* 3 y *Lactobacillus Buchneri* ya que no acelera la cinética de crecimiento para alcanzar la fase exponencial, y que ambas cepas son adecuadas para su aplicación en el escalamiento industrial de la fermentación ácido láctica de desechos de camarón para la obtención de quitina por un medio biológico.

7. RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos se deben tener ciertas consideraciones:

- Crear un sistema de control automático, que permita monitorear el pH, la acidez total titulable, y el crecimiento microbiano en las fermentaciones para evitar contaminar, afectar o interrumpir la supervisión del proceso.
- Se sugiere emplear condiciones estériles y cepas aisladas durante el proceso fermentativo, los resultados indican mayor población microbiana en las etapas del crecimiento bacteriano, en comparación con una usar una población microbiana diversa y no identificada.
- Para efecto de futuras investigaciones, se recomienda evaluar el efecto de otros precursores de la cinética de crecimiento durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón, debido que el proceso continúa siendo dilatado al ser comparado con el proceso químico.
- El precursor resultó ser no es adecuado para las cepas seleccionadas en este estudio, sin embargo, se sugiere realizar el estudio de la cinética bacteriana en otras cepas presentes en el caldo de fermentación del reactor inicial.
- Las cepas aisladas pueden ser usadas para el mejoramiento de alimentos para animales de granjas y para la fabricación de productos derivados de la leche. *Lactobacillus Buchneri* se emplean como inoculante bacteriano para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje, para prevenir el calentamiento y el deterioro después de la exposición al aire. Por otro lado, las bacterias del grupo *Lactobacillus. brevis* son apropiadas para usarse como una alternativa a otros probióticos en yogures, mejorando la función inmune humana.
- Estos datos pueden servir de guía productiva para escalar un diseño y establecer el verdadero aporte ambiental que tendría, por lo tanto, deberán analizarse las ventajas y desventajas que implica una puesta en marchas de una planta enfocada en el proceso productivo y sistemas de tratamiento de desechos.
- La materia usada debe ser fresca tanto el desecho de camarón, como el suero de leche el cual no debo contener sal y tener aproximadamente un pH de 4.5, sin aditivos inhibidores de bacterias y sin agua añadida

8. Referencias Bibliográficas

Agentes Físicos (2015). Recuperado el 3 de diciembre de 2019, de Microbiología: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm>

Araujo, A., Costa, L., Muñiz, E., Nascimento, A., Lourenco, L., & Bergamasco, R. (2009). Fermentación de residuos de cangrejo y camarón para la obtención de quitinasas en medio sólido. São Cristóvão, Brazil: Nucleo de Engenharia de Alimento Campus Univeritario de São Cristóvão.

Arévalo Illescas, A. P. (noviembre de 2016). Fermentación láctica de la cáscara de camarón con *Lactobacillus delbrueckii* para obtención de quitina. Recuperado el 10 de Junio de 2019, de SlideShare: <https://es.slideshare.net/CarolinaVrtizdelAgui/fermentacion-lactica-de-la-cascara-de-camaron-con-l-actobacillus-para-la-obtencion-de-quitina>

Biomérieux España. (sin fecha). Gama de galería API ID. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de Biomérieux España: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/gama-de-galerias-apir-id>

Botanical-online. (2012). características de los crustáceos. Obtenido de Botanical-online: <https://www.botanical-online.com/animales/crustaceos-caracteristicas>.

Brock, T., Smith, D., & Madigan, M. (1987). *Microbiología* (Cuarta edición ed.). México D.F.: Prentice-Hall Hispanoamerica, S.A.

Cabarcas Lorduy, M., Marimón Bolívar, W. y Miranda Marzola, M. (2011). Diseño de un Proceso Económico y Competitivo para la Extracción de Quitina y Producción de Quitosano a partir de exoesqueletos de Camarón. Tesis de grado, Universidad de Cartagena, Colombia.

Cabrera, L. E. (2010). Recursos potenciales de desechos de crustáceos: obtención de biomeculas. Obtenido de <http://someicca.com.mx/wp-content/uploads/Recursos-potenciales-de-desechos-de-crustaceos-obtencion-de-biomoleculas.pdf>

Cira, L. A., Huerta, S., Guerrero, L., Rosas, R. y Shirai, K. (2000). Scaling up of lactic acid fermentation of prawn wastes in packed-bed column reactor for chitin recovery. *Advances in chitin science*, 2-27.

Cira, L., Huerta, S., Hall, G. y Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359-1366).

Colina, M., Medina, K., Vargas, J., Rincón, D., Arismendi, R., & Montilla, B. (2017). Extracción de quitina. *Revista bases de la ciencia*, 1-18.

Deeba, F., Shakir, H. A., Irfan, M., y Qazi, J. I. (2016). Producción de quitinasa en organismos: una revisión. Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/327386720_Chitinase_production_in_organisms_A_review.

Diaz, A. G. (2015). Curva de crecimiento bacteriano. Recuperado el 2019 de junio de 2019, de Slideshare: <https://es.slideshare.net/Altajimenez/curva-de-crecimiento-bacteriano>.

Duran, M., Romero, O., García, P., Brenes, M., & Garrido, A. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasa y aceites*, 48, 297-311. Obtenido de <https://digital.csic.es/bitstream/10261/21870/1/815.pdf>

Dutta, P.K, Dutta, J., y Tripathi, V.S. (Enero de 2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. Obtenido de Niscar Online Periodicals Repository: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5397/1/JSIR%2063%281%29%2020-31.pdf>

El Nuevo Diario. (2017 de noviembre de 2017). Exportaciones de camarón incrementan en 28.1%. Recuperado el 3 de diciembre de 2019, de El nuevo diario.com.ni: Por favor, no copie nuestra nota. Si desea compartir esta información, puede hacerlo a través del siguiente link: <https://www.elnuevodiario.com.ni/economia/447815-exportaciones-camaron-se-incrementan-28-1/>

Escorcía, D., Hernández, D, Sánchez, M. y Benavente, M. (2009). Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas. En *Nexo, Revista Científica*. 22(2), 45-55. <https://doi.org/10.5377/nexo.v22i2.42>.

Folgueras, M. (2008). Microorganismos. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de EcuRed: <https://www.ecured.cu/Microorganismo#Clases>

Freeman, B. (1986). Microbiología. España: Editorial Interamericana.

Gálvez López, D., Rosas Quijano, R. y Salas Ovilla, R. (2017). La quitina: lo mejor de los desechos marinos. Recuperado el 3 de noviembre de 2019, de Ciencia UANL: <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=7170>

García González, M. (2018). Estudio de la fermentación ácido láctica de desechos de camarón para la obtención de quitina y material proteico. Tesis para optar al título de

Ingeniero Químico, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Ingeniería Managua, Nicaragua.

García, M. y Benavente M. (2019). Estudio de la fermentación ácido láctica de desechos de camarón para la obtención de quitina. XXV Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Ingeniería Química y Carreras Afines (COLAEIQ), San José, Costa Rica.

Gil, M. (2009). Prueba de la catalasa: fundamento, técnica y usos. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de Lidefer.com: <https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/>

Gil, M. (2014). Tinción de Gram: fundamento, materiales, técnica y usos. Recuperado el 10 de junio de 2019, de Lifeder: <https://www.lifeder.com/tincion-de-gram/>

Gortari, M. C. y Hours, R. A. (15 de mayo de 2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review. Obtenido de Electronic Journal of Biotechnology: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v16n3-10/1607>

Guzmán, J. (2005). Modelo matemático del crecimiento de bacterias. Recuperado el 14 de junio de 2019, de Monografias.com: <https://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano/crecimiento-bacteriano.shtml>.

Hernández (2003). Microbiología Industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia, EUNED. San José, Costa Rica.

Invertebrados: crustáceos. (agosto de 2007). Recuperado el 3 de Diciembre de 2019, de Mar Cantábrico: <http://cantabrico2007.blogspot.com/2007/08/invertebrados-3.html>

Kaur, S. y Singh, D. (2013). Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. Crit Rev Biotechnol.

Krithika, S., y Chellaram, C. (2016). Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine Wastes. Obtenido de International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: <https://pdfs.semanticscholar.org/5cf9/2fb78bb5649c561bd2c9af04a99b38dcb3c4.pdf>

López, L., Infanzón, B. y Rojas, A. (2016). Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Marcia, E., Malespín, J., Sánchez, M., y Benavente, M. (2011). Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de

Matsumoto, K. S. (2011). Producción de quitina y quitosano. Universidad Autónoma Metropolitana.

Microbitos, G. (27 de septiembre de 2011). Pruebas bioquímicas primarias: Tinción de GRAM, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de O/F y motilidad. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de Microbitos blog: <http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/>

Microinmuno. (sin Fecha). Los medios de cultivo en microbiología. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de Microinmuno: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm>

Muzzarelli, R. (1997). Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. European Chitin Society, 109-119.

Ormaechea, E. (11 de diciembre de 2017). Tinción de Gram. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de Mapfre: <https://www.salud.mapfre.es/pruebas-diagnosticas/otras-pruebas-diagnosticas/tincion-de-gram/>

Owens, J. D. (2005). Enzimically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. Journal of Food Technology, pp. 355-365.

Pacheco Lopez, N. A. (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos. Obtenido de Food and Nutrition_ Université Claude Bernard Lyon I: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00807945/document>

Parras-Huerta, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Scielo, 93-105.

Pastor de Abram, A. (2004). Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Lima, Peru: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica de Peru.

Peniche, C. (2006). Estudio sobre quitina y quitosano. En Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias 2009. (págs. 153-170). La Habana, Cuba: Universidad de la Habana.

Pérez Zelaya, Z. (1997). Aislamiento y purificación de *Azotobacter Chroococcum* de suelos de la Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional de Ingeniería.

Pérez, Z., & Benavente, M. (2019). Estudio de la cinética de crecimiento microbiano en la ruta metabólica de la fermentación ácida del caparazón de camarón.

Prameela, Kandra; Mohan, CH. Murali; Smitha, P.V.; Hemalatha, K.P.J. (Sin especificación de Nov-Dec de 2010). Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic. Obtenido de <http://ijabpt.com/pdf/87022-Prameela-Gitam%5B1%5D.pdf>

Puerta Quintero, G. I. (Diciembre de 2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Recuperado el 9 de Junio de 2019, de Federación Nacional de Cafeteros de Colombia: <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/345/1/avt0402.pdf>

Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (3ra Edición ed.). México: Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.

Sabry, S. A. (1992). Microbial degradation of shrimp shell waste. *Journal of basic microbiology*, 107-111.

Santambrosio, E. (2009). Siembra y recuento de microorganismos. Recuperado el 4 de diciembre de 2019, de CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf

Sanz, J. (2008). Cinética y crecimiento bacteriano. Recuperado el 3 de diciembre de 2019, de Bacanova: https://web.archive.org/web/20071024061527/http://www.ifr.ac.uk/bacanova/project_backg.html

Schelegel, H. G. (1996). *Microbiología general*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.

Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1991). Aislamiento y caracterización de nutrientes y productos de valor agregado de los descartes de procesamiento de cangrejo de las nieves (*Chionoecetes opilio*) y camarones (*Pandalus borealis*). *Journal of agriculture and Food*, 1527-1532.

Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Obtenido de Taylor and Francis Online: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690390826473>

Thomas T.D., Ellwood D.C., Longyear V.M.C. (1979). Change from homo to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J Bacteriol* 138: 109-117.

Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman W (eds) (2009) Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes, vol 3. Springer, Heidelberg,

Wang, S.-L., Liang, T.-W., & Yen, Y.-H. (2011). Bioconversion of Chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. Carbohydrate Polymers, 732-742.

Xu, Y., Gallert, C. y J. Winter (2008). Chitin Purification from Shrimp Wastes by Microbial deproteination and decalcification. Application Microbiology and Biotechnology, Vol. 79, pp. 687-697.

Zakaria, S., Hall, G.M. y Shama, G. (1997). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry. Vol 33 (1), pp. 1-6.

Anexos

Anexo A.1. Descripción de los equipos utilizados en las pruebas experimentales.

Tabla A.1 Descripción de los equipos utilizados

No.	Descripción	Marca y Modelo	Observación.
1	Procesador de alimentos.	Oster-3200	Trituración de la materia prima (camarón).
2	Incubadora.	Pirex England	Incubación de siembras en placas.
3	Balanza de precisión	Adventurer Ohaus	Pesaje de materia prima y materiales.
4	Horno	Precision 120 V	Secado y estilización en seco de cristalería.
5	pH-metro	WTW-330i	Análisis de pH.
6	Autoclave	Colony model No. 3325	Esterilización de materiales y cristalería.
7	Contador de colonias	Reichert Quebec darfield	Conteo en placas de colonias desarrolladas.
8	Espectrómetro IR	FT-IR ALPHA T Bruker	Sólidos disueltos en el reactor (absorbancia).
9	Microscopio	LW Scientific	Identificación de bacterias.

Anexo A.2. Diagrama de Flujos del proceso de fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón.

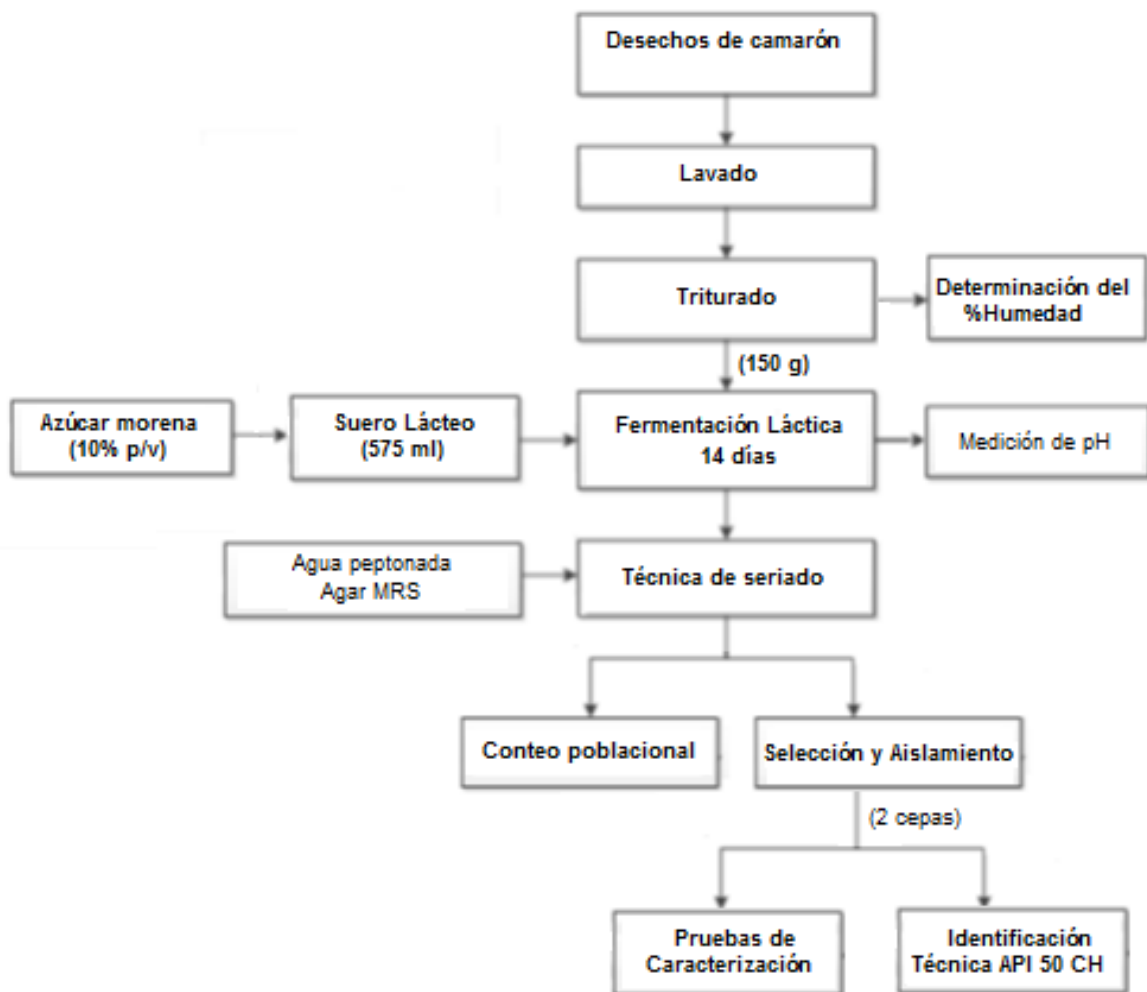


Figura A.1 Diagrama de flujos del proceso de fermentación ácido-láctica de desechos de camarón y suero lácteo enriquecido con azúcar morena, aislamiento, caracterización e identificación bioquímica.

Anexo A.3 Tabla de variables del diseño experimental del proceso de fermentación láctica.

Tabla A.2 Cruce de variables independientes del diseño experimental.

No. Experimento	Factor 1	Factor 2
1	Cepa B	SP1
2	Cepa A	SP1
3	Cepa B	SP1
4	Cepa A	CP2
5	Cepa B	SP1
6	Cepa B	CP2
7	Cepa A	CP2
8	Cepa B	CP2
9	Cepa A	SP1
10	Cepa A	SP1
11	Cepa A	CP2
12	Cepa B	CP2

Descripción de la nomenclatura

Factor 1: Tipo de Cepa	Cepa A: <i>Lactobacillus brevis</i> 3 Cepa B: <i>Lactobacillus Buchneri</i>
Factor 2: Uso de precursor (Extracto de levadura)	SP1: Sin precursor CP2: Con precursor

Anexo A.4 Resultados del proceso de fermentación láctica con caparazón de camarón.

Tabla A.3 Resultados del Experimento 1 del diseño experimental (Cepa B, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	7.00E+06	6.85	6.24	0.49
12	7.40E+06	6.87	5.96	0.39
24	8.69E+06	6.94	4.70	1.27
36	7.29E+06	6.86	4.16	1.57
48	1.08E+07	7.03	4.03	1.76
60	2.18E+07	7.34	3.90	1.96
72	6.20E+07	7.79	3.86	3.33
84	1.80E+06	6.26	3.80	3.33
96	6.00E+06	6.78	3.82	2.35
108	1.31E+10	10.12	3.82	2.84
120	7.30E+07	7.86	3.77	1.96
132	1.06E+07	7.03	3.78	2.65
144	1.10E+08	8.04	3.86	2.94
156	2.30E+07	7.36	3.82	4.80
168	1.04E+08	8.02	3.76	2.74
180	2.60E+06	6.41	3.79	3.14
192	6.90E+06	6.84	3.80	2.94
204	2.04E+07	7.31	3.77	3.63
216	1.82E+04	4.26	3.76	4.02
228	1.09E+07	7.04	3.77	3.04
240	6.61E+06	6.82	3.72	2.84
252	1.00E+07	7.00	3.69	2.16
264	1.19E+07	7.08	3.67	2.94
276	1.03E+07	7.01	3.74	3.53
288	6.45E+07	7.81	3.76	2.35
300	3.64E+06	6.56	3.62	3.43
312	5.77E+03	8.76	3.70	2.84
324	*		3.76	3.53

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.4 Resultados del Experimento 2 del diseño experimental (Cepa A, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	8.99E+06	6.95	6.09	0.49
12	8.26E+06	6.92	4.55	0.98
24	7.63E+06	6.88	3.97	1.96
36	4.83E+06	6.68	3.79	2.25
48	1.01E+09	9.00	3.72	1.96
60	2.58E+09	9.41	3.67	2.65
72	6.20E+07	7.79	3.58	4.41
84	2.79E+09	9.45	3.50	4.61
96	1.61E+09	9.21	3.50	2.94
108	2.29E+09	9.36	3.50	4.31
120	1.56E+09	9.19	3.44	4.02
132	1.50E+09	9.18	3.57	2.84
144	1.71E+09	9.23	3.53	2.94
156	1.30E+09	9.11	3.49	4.80
168	4.20E+08	8.62	3.44	3.43
180	2.12E+10	10.33	3.50	3.33
192	8.41E+10	10.92	3.48	3.63
204	4.50E+08	8.65	3.47	4.51
216	6.00E+08	8.78	3.46	4.02
228	4.00E+07	7.60	3.47	3.63
240	5.00E+07	7.70	3.42	3.43
252	3.10E+07	7.49	3.40	4.02
264	2.31E+08	8.36	3.38	3.14
276	5.31E+07	7.73	3.44	3.14
288	2.55E+09	9.41	3.47	3.33
300	2.08E+07	7.32	3.41	3.43
312	*		3.38	2.84
324	*		3.48	3.14

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.5 Resultados del Experimento 3 del diseño experimental (Cepa B, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	9.06E+06	6.96	6.19	0.49
12	9.81E+06	6.99	6.03	0.59
24	9.38E+06	6.97	4.72	1.18
36	8.40E+06	6.92	4.13	1.37
48	4.78E+09	9.68	4.01	1.57
60	2.16E+07	7.33	3.67	2.16
72			3.87	1.96
84	1.84E+07	7.26	3.58	4.17
96	1.02E+07	7.01	3.83	2.65
108	2.26E+08	8.35	3.80	2.94
120	4.10E+07	7.61	3.81	2.84
132	1.66E+07	7.22	3.81	2.45
144	2.10E+07	7.32	3.85	2.35
156	1.70E+07	7.23	3.83	3.33
168	3.48E+10	10.54	3.78	2.65
180	7.08E+07	7.85	3.80	3.33
192	2.60E+07	7.41	3.79	3.14
204	1.98E+07	7.30	3.79	4.21
216	1.53E+07	7.18	3.79	4.02
228	2.15E+07	7.33	3.79	2.55
240	6.20E+07	7.79	3.73	3.23
252	6.20E+07	7.79	3.70	3.63
264	7.67E+07	7.88	3.69	3.33
276	3.64E+07	7.56	3.72	3.63
288	6.76E+09	9.83	3.74	3.04
300	1.56E+07	7.19	3.74	2.45
312	6.40E+08	8.81	3.75	3.04
324			3.77	3.43

*Modificación de la técnica de conteo poblacional, que impidió registrar el valor correspondiente al periodo de tiempo.

** Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.6 Resultados del Experimento 4 del diseño experimental (Cepa A, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	8.53E+06	6.93	6.21	0.49
12	1.04E+07	7.02	4.42	1.08
24	1.11E+07	7.05	3.98	2.16
36	9.08E+06	6.96	3.82	2.45
48	1.95E+07	7.29	3.72	2.74
60	1.33E+09	9.12	3.60	2.35
72	1.46E+07	7.16	3.61	4.41
84	3.40E+09	9.53	3.52	4.61
96	2.32E+09	9.37	3.50	3.63
108	1.94E+09	9.29	3.51	2.84
120	1.95E+09	9.29	3.46	3.63
132	8.84E+08	8.95	3.57	3.72
144	1.89E+09	9.28	3.53	3.33
156	1.53E+09	9.19	3.51	5.49
168	3.90E+08	8.59	3.45	4.31
180	8.85E+08	8.95	3.52	3.23
192	3.10E+07	7.49	3.48	3.43
204	1.42E+08	8.15	3.47	4.31
216	1.33E+11	11.12	3.48	3.14
228	1.42E+08	8.15	3.50	3.14
240	1.10E+09	9.04	3.42	4.51
252	5.90E+07	7.77	3.39	3.92
264	1.50E+08	8.18	3.39	3.14
276	6.50E+07	7.81	3.42	3.82
288	3.88E+10	10.59	3.44	2.65
300	1.56E+07	7.19	3.46	3.63
312	*		3.41	4.80
324	*		3.50	4.41

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.7 Resultados del Experimento 5 del diseño experimenta (Cepa B, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	6.32E+06	6.80	6.49	0.49
12	8.03E+06	6.90	5.93	0.49
24	8.41E+06	6.92	4.71	1.08
36	7.34E+06	6.87	4.17	1.47
48	8.27E+08	8.92	4.00	1.76
60	1.34E+07	7.13	3.95	2.06
72	1.96E+07	7.29	3.89	2.16
84	1.80E+07	7.26	3.82	3.63
96	4.10E+06	6.61	3.82	2.84
108	7.40E+06	6.87	3.84	2.35
120	2.40E+07	7.38	3.77	2.35
132	1.24E+07	7.09	3.82	2.35
144	1.28E+07	7.11	3.85	2.25
156	8.20E+06	6.91	3.81	4.31
168	1.27E+07	7.10	3.77	3.04
180	1.97E+09	9.30	3.82	2.74
192	8.00E+06	6.90	3.81	3.72
204	2.00E+07	7.30	3.78	3.82
216	1.70E+07	7.23	3.78	3.43
228	1.30E+07	7.11	3.76	2.06
240	1.63E+07	7.21	3.72	3.04
252	2.50E+07	7.40	3.69	3.53
264	7.08E+07	7.85	3.69	3.82
276	2.16E+07	7.33	3.72	3.63
288	1.95E+07	7.29	3.72	4.21
300	6.90E+06	6.84	3.7	3.33
312	2.34E+08	8.37	3.72	3.14
324	*		3.76	3.33

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.8 Resultados del Experimento 6 del diseño experimental (Cepa B, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	2.29E+05	5.36	5.91	0.49
12	3.16E+05	5.50	5.51	0.59
24	3.20E+05	5.51	4.78	1.18
36	2.97E+05	5.47	4.20	1.57
48	1.40E+08	8.15	4.05	1.27
60	6.00E+05	5.78	3.96	2.06
72	1.12E+09	9.05	3.91	3.04
84	2.00E+05	5.30	3.80	3.92
96	3.30E+06	6.52	3.77	2.55
108	3.30E+06	6.52	3.80	2.65
120	4.00E+06	6.60	3.76	2.55
132	2.20E+05	5.34	3.80	3.04
144	2.70E+05	5.43	3.83	3.63
156	2.00E+05	5.30	3.79	4.61
168	1.75E+08	8.24	3.72	2.55
180	1.23E+10	10.09	3.75	2.74
192	1.30E+08	8.11	3.78	2.55
204	*		3.76	3.53
216	5.00E+07	7.70	3.75	3.23
228	2.10E+07	7.32	3.75	3.14
240	9.00E+09	9.95	3.7	3.82
252	2.00E+06	6.30	3.67	3.43
264	2.95E+08	8.47	3.67	4.41
276	1.20E+06	6.08	3.67	3.23
288	2.29E+08	8.36	3.72	2.94
300	1.64E+06	6.21	3.68	3.14
312	3.60E+07	7.56	3.71	3.33
324	**		3.74	3.14

*No se efectuó conteo microbiano debido a que la placa con la siembra de la dilución más alta presentó demasiada cantidad de colonias para contar.

** Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.9 Resultados del Experimento 7 del diseño experimenta (Cepa A, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	1.33E+07	7.12	6.38	0.59
12	1.06E+07	7.03	4.47	1.08
24	1.33E+07	7.12	3.98	2.25
36	9.55E+06	6.98	3.81	2.16
48	1.25E+09	9.10	3.72	2.45
60	2.02E+09	9.30	3.67	2.74
72	6.90E+06	6.84	3.61	3.53
84	1.99E+09	9.30	3.52	4.21
96	1.71E+09	9.23	3.50	3.63
108	3.00E+05	5.48	3.50	2.45
120	1.92E+09	9.28	3.45	2.16
132	2.15E+09	9.33	3.55	3.14
144	2.33E+09	9.37	3.55	3.43
156	1.21E+09	9.08	3.50	4.02
168	3.94E+08	8.60	3.45	2.94
180	7.08E+08	8.85	3.52	3.23
192	1.34E+09	9.13	3.49	3.43
204	1.36E+08	8.13	3.50	5.00
216	1.80E+08	8.26	3.48	3.53
228	1.10E+06	6.04	3.49	4.61
240	6.70E+07	7.83	3.43	3.82
252	5.61E+07	7.75	3.45	4.12
264	5.31E+08	8.73	3.40	3.23
276	7.54E+07	7.88	3.41	3.23
288	5.87E+09	9.77	3.43	3.53
300	1.50E+07	7.18	3.48	3.82
312	*		3.41	3.82
324	*		3.50	4.02

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.10 Resultados del Experimento 8 del diseño experimental (Cepa B, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	2.90E+05	5.46	6.25	0.69
12	2.63E+05	5.42	5.94	0.66
24	3.11E+05	5.49	5.19	1.08
36	2.36E+05	5.37	4.25	1.27
48	2.24E+08	8.35	4.11	1.47
60	1.00E+05	5.00	4.04	1.86
72	1.74E+08	8.24	3.98	3.33
84	6.34E+08	8.80	3.91	3.82
96	*		3.92	1.86
108	3.60E+09	9.56	3.89	2.74
120	6.00E+06	6.78	3.85	2.94
132	1.20E+05	5.08	3.88	2.45
144	6.30E+05	5.80	3.93	2.74
156	6.70E+04	4.83	3.86	4.21
168	1.40E+07	7.15	3.82	2.16
180	7.22E+06	6.86	3.54	2.94
192	1.17E+05	5.07	3.85	2.35
204	4.10E+04	4.61	3.83	4.02
216	4.96E+07	7.70	3.81	3.14
228	2.00E+04	4.30	3.82	3.33
240	9.00E+04	4.95	3.75	3.43
252	4.00E+04	4.60	3.76	2.84
264	1.35E+07	7.13	3.72	3.04
276	9.36E+06	6.97	3.71	3.04
288	2.62E+08	8.42	3.77	2.16
300	6.00E+04	4.78	3.73	3.04
312	2.70E+06	6.43	3.77	3.43
324	**		3.79	3.63

*No se efectuó conteo microbiano debido a que la placa con la siembra de la dilución más alta presentó demasiada cantidad de colonias para contar.

** Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.11 Resultados del Experimento 9 del diseño experimental (Cepa A, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	6.95E+06	6.84	5.78	0.59
12	5.88E+06	6.77	4.35	1.08
24	7.29E+06	6.86	4.02	2.06
36	6.35E+06	6.80	3.83	1.96
48	8.58E+08	8.93	3.75	2.25
60	2.89E+09	9.46	3.69	2.45
72	1.05E+07	7.02	3.58	4.21
84	3.00E+09	9.48	3.53	4.61
96	2.32E+09	9.36	3.51	3.43
108	2.22E+09	9.35	3.49	3.92
120	3.56E+09	9.55	3.46	4.31
132	8.09E+08	8.91	3.53	3.14
144	2.80E+09	9.45	3.53	3.23
156	2.54E+09	9.40	3.47	4.61
168	1.36E+09	9.13	3.43	2.55
180	1.01E+09	9.00	3.47	3.53
192	7.25E+08	8.86	3.48	3.14
204	1.20E+08	8.08	3.47	4.61
216	6.90E+08	8.84	3.47	3.33
228	4.68E+08	8.67	3.49	3.43
240	2.28E+09	9.36	3.41	3.92
252	4.00E+06	6.60	3.42	4.12
264	2.66E+08	8.42	3.37	3.72
276	6.24E+07	7.80	3.40	3.63
288	1.59E+08	8.20	3.40	4.41
300	3.64E+07	7.56	3.45	3.53
312	*		3.42	3.78
324	*		3.48	4.70

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.12 Resultados del Experimento 10 del diseño experimental (Cepa A, SP1).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	9.12E+06	6.96	5.72	0.59
12	6.74E+06	6.83	4.53	0.88
24	6.84E+06	6.84	4.02	2.06
36	5.96E+06	6.78	3.84	2.35
48	5.41E+08	8.73	3.73	2.45
60	1.77E+08	8.25	3.66	3.23
72	2.81E+09	9.45	3.59	3.82
84	3.77E+09	9.58	3.56	4.70
96	2.15E+09	9.33	3.52	2.84
108	1.75E+09	9.24	3.49	3.14
120	2.08E+09	9.32	3.44	2.84
132	3.80E+07	7.58	3.55	2.65
144	4.60E+08	8.66	3.51	3.04
156	2.66E+09	9.42	3.48	4.02
168	1.36E+09	9.13	3.43	3.04
180	7.38E+08	8.87	3.47	3.53
192	1.31E+10	10.12	3.47	4.21
204	1.09E+08	8.04	3.48	4.80
216	1.77E+11	11.25	3.47	3.33
228	1.35E+08	8.13	3.46	4.02
240	8.00E+08	8.90	3.42	2.94
252	1.40E+07	7.15	3.41	3.23
264	3.76E+09	9.57	3.39	3.63
276	5.46E+07	7.74	3.49	3.82
288	2.74E+11	11.44	3.45	2.06
300	4.80E+06	6.68	3.49	2.84
312	*		3.44	4.21
324	*		3.50	3.82

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.13 Resultados del Experimento 11 del diseño experimental (Cepa A, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	1.12E+07	7.05	6.42	0.69
12	1.07E+07	7.03	4.40	1.18
24	1.10E+07	7.04	3.98	2.16
36	9.68E+06	6.99	3.81	2.25
48	3.69E+08	8.57	3.73	2.45
60	2.40E+09	9.38	3.64	2.35
72	6.30E+06	6.80	3.57	4.21
84	1.99E+09	9.30	3.51	4.90
96	1.76E+09	9.24	3.52	3.33
108	1.68E+09	9.23	3.52	2.65
120	2.40E+09	9.38	3.45	4.90
132	1.89E+09	9.28	3.61	3.43
144	2.29E+09	9.36	3.53	3.14
156	9.74E+08	8.99	3.48	3.43
168	9.74E+08	8.99	3.47	3.53
180	9.15E+08	8.96	3.49	3.63
192	6.50E+07	7.81	3.51	3.04
204	1.89E+08	8.28	3.48	3.63
216	1.05E+11	11.02	3.49	3.14
228	1.56E+08	8.19	3.48	4.02
240	2.20E+09	9.34	3.43	3.82
252	3.00E+06	6.48	3.43	4.80
264	4.75E+09	9.68	3.40	4.31
276	6.24E+07	7.80	3.43	4.31
288	8.83E+09	9.95	3.47	3.33
300	3.12E+05	5.49	3.50	3.72
312	*		3.40	4.12
324	*		3.51	4.31

*Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Tabla A.14 Resultados del Experimento 12 del diseño experimental (Cepa B, CP2).

Tiempo (h)	UFC/ml (muestra total)	Log UFC/ml	pH	% de Acidez Total Titulable
0	3.23E+05	5.51	6.68	0.39
12	2.39E+05	5.38	6.61	0.49
24	2.66E+05	5.42	5.42	0.88
36	2.15E+05	5.33	4.23	1.27
48	2.96E+08	8.47	4.06	1.67
60	1.20E+06	6.08	3.99	1.67
72	1.10E+06	6.04	3.91	2.35
84	4.00E+05	5.60	3.89	3.63
96	1.20E+06	6.08	3.86	1.86
108	1.30E+06	6.11	3.91	2.25
120	2.00E+06	6.30	3.83	3.04
132	1.04E+08	8.02	3.86	2.25
144	1.22E+08	8.09	3.90	2.35
156	2.60E+07	7.41	3.84	2.35
168	1.35E+08	8.13	3.82	2.65
180	3.80E+06	6.58	3.84	2.74
192	1.80E+06	6.26	3.81	2.45
204	2.70E+05	5.43	3.83	3.92
216	4.20E+06	6.62	3.81	2.55
228	3.10E+05	5.49	3.83	3.04
240	2.90E+06	6.46	3.76	3.14
252	2.00E+05	5.30	3.72	3.53
264	4.63E+06	6.67	3.74	1.96
276	2.07E+06	6.32	3.83	4.21
288	7.70E+05	5.89	3.79	3.04
300	1.56E+06	6.19	3.74	2.84
312	7.60E+05	5.88	3.78	2.94
324	*		3.80	2.74

* Espacio vacío debido a agotamiento de medio de cultivo Agar MRS, que impidió el monitoreo de la población microbiana.

Anexo A.5

Metodología de aislamiento de colonias

La metodología permite obtener cultivos axénicos en tubos. La preparación del medio inclinado posibilita que exista una mayor superficie sobre la que sembrar en un espacio relativamente pequeño, por lo que el riesgo de contaminación es menor

- Flamear el asa de siembra hasta que alcance el rojo vivo en el mechero.
- Abrir la placa que contiene la colonia seleccionada y tocar su superficie con un asa estéril, con el objetivo de arrastrar parte de esta.
- Inocular un tubo con agar MRS inclinando dibujando con la aguja del asa en zig-zag, a lo largo de la superficie del agar.
- Flamear la boca del tubo y colocar nuevamente la tapa.
- Flamear el asa de siembra hasta que alcance el rojo vivo en el mechero.

Anexo A.6 Metodología de medición para la Caracterización de bacterias.

A.6.1 Tinción de Gram.

La tinción de Gram es un tipo de tinción que se realiza sobre las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio. Según la distribución del peptidoglicano de la pared celular que las envuelve, se tiñen de una forma u otra. Así, las bacterias que no se tiñen mediante esta técnica se denominan Gram negativas. Están formadas por una pared más fina formada por menos capas de peptidoglicano y una segunda membrana rica en lípidos (que repele la tinción Gram), al microscopio aparecen incoloras (Gil, 2014).

Las Gram positivas tienen una pared celular mucho más gruesa, formada por un gran número de capas de peptidoglicanos entre las que se inserta la tinción Gram, dando un color violeta intenso al microscopio y se clasifican como Gram +.

La gran aportación práctica de la tinción de Gram es que permite determinar el tipo de antibiótico así como su eficacia. El antibiótico de elección ha de ser capaz de atravesar la pared bacteriana, en función de si la bacteriana es gram positiva o negativa se seleccionará el antibiótico más eficaz (Ormaechea, 2017).

En la Figura A.2 se muestra un resumen gráfico de los pasos para llevar a cabo la tinción de gram. A continuación, se presenta el procedimiento a seguir para la prueba:

A.6.1.1 Preparación de reactivos para la tinción de Gram

Solución: Cristal violeta

Solución A:

Cristal violeta: 2 g

Alcohol etílico 95%: 20 ml

Solución B:

Oxalato de amonio 0.8 g

Agua destilada: 80 ml

Para la preparación final del cristal violeta se debe diluir la solución A 1:10 con agua destilada y mezclar con 4 partes de la solución B. Se almacena la mezcla durante 24 horas antes de usarla. Se filtra en un frasco para tinción color ámbar usando un filtro de papel. (Gil, 2014)

La cantidad que se va a usar a diario se traslada a un frasco ámbar con gotero.

Iodo-lugol

Pesar y medir la cantidad indicada de cada compuesto, tal como sigue:

- Cristales de Iodo: 1g
- Ioduro de potasio: 2g
- Agua destilada: 300 cc

Se disuelve el ioduro de potasio poco a poco en el agua y posteriormente se agrega el iodo. Se traslada la solución a un frasco color ámbar. La cantidad que se va a usar a diario se traslada a un frasco ámbar más pequeño con gotero.

Decolorante

Alcohol etílico al 95: 50 ml

Acetona: 50 ml

Se prepara a partes iguales. Tapar bien, pues tiende a evaporarse. Colocar en frasco con gotero.

Esta preparación proporciona una decoloración en tiempo moderado 5-10 seg y es la más recomendada. Los principiantes prefieren usar solo alcohol etílico al 95%, donde la decoloración es más lenta de 10 a 30 seg. Mientras que los más experimentados

pueden usar acetona pura, donde la decoloración ocurre muy rápidamente de 1 a 5 seg.

Contraste

Solución madre de safranina

Safranina: 2.5 g

Alcohol etílico 95%: 100 ml

Después de pesar la cantidad indicada de safranina se disuelve en 100 ml de alcohol etílico a 95%. A partir de la solución madre se prepara la solución de safranina de trabajo. Para ello, medir 10 ml de la solución madre, agregar 90 ml de agua destilada para completar 100 ml. Se recomienda traspasar la cantidad que se va a usar a diario a un frasco ámbar con gotero.

Los microorganismos que se tiñen débilmente de Gram negativos con la tinción de Gram-Hucker, como ciertos anaerobios, *Legionella sp*, *Campylobacter sp* y *Brucella sp*, pueden teñirse mucho mejor si se usa la modificación que realizó Kopeloff a la tinción de Gram-Hucker, denominada tinción de Gram-Kopeloff.

Esta técnica cambia el colorante de safranina por fucsina básica. Con esta modificación es posible colorear eficazmente a los microorganismos antes mencionados.

Almacenamiento de los reactivos

Los colorantes preparados se deben guardar a temperatura ambiente.

A.6.1.2 Frotis bacteriano

- Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica hasta el rojo vivo y esperar a que enfríe un poco.
- Tomar con el asa una gota de agua estéril y agregarla en un portaobjetos.
- Flamear nuevamente el asa y esperar a que enfríe.
- Tomar con el asa un poco de muestra bacteriana a partir de una colonia aislada.
- Después agregar la muestra en la gota de agua que esta en el portaobjetos y homogeneizar suavemente con movimientos circulares.

- Esperar que seque al aire libre o poner durante uno o dos segundos con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

A.6.1.3 Tinción

- Las células fijadas al calor, primero son teñido cubriendo la muestra con una solución de cristal violeta, se deja reposar por 1 minuto después del cual, el exceso de colorante se elimina lavando con agua.
- El portaobjeto se cubre después con lugol y se deja reaccionar por 1 minuto, el exceso se elimina con agua.
- Con el portaobjeto inclinado se realiza una decoloración agregando con un gotero una mezcla de alcohol-acetona hasta que la solución deje de arrastrar el colorante.
- El portaobjetos con el frotis se cubre con la solución de safranina, se deja reaccionar durante 30 segundos finalmente, se elimina el exceso de colorante y se deja secar en el aire.
- Posteriormente, los portaobjetos colocados en el microscopio para observar la coloración que poseen las bacterias. Las bacterias gram positiva se tiñen de púrpura por el cristal violeta (Figura A.3a), en cambio las bacterias gram negativa perderá la coloración inicial de cristal violeta y se tiñera de rojo debido a la safranina (Figura A.3b).

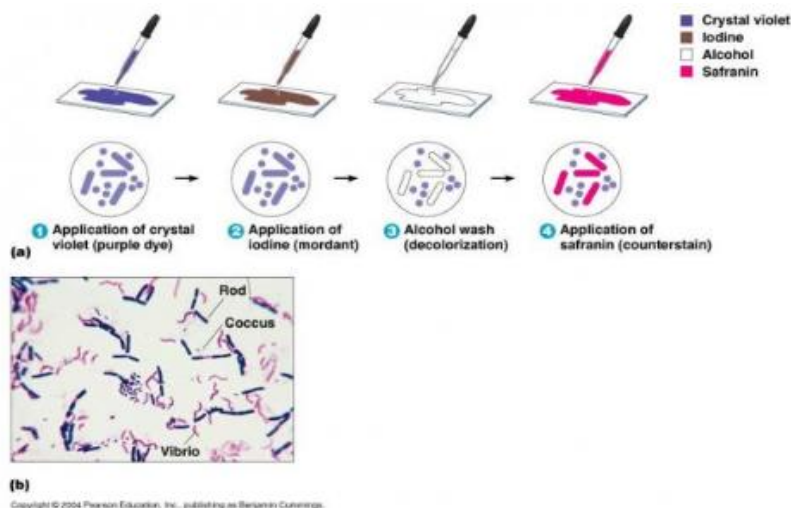
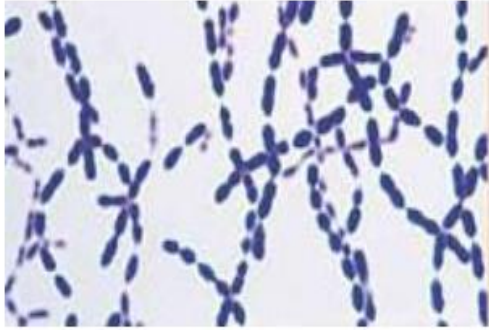


Figura A.2 Resumen de los pasos para la prueba de Tinción de gram.



(a) Bacilos Gram positivos



(b) Bacilos Gram negativos

Figura A.3 Coloración de los bacilos (a) Gram positivos y (b) Gram negativos.

A.6.2 Prueba de la catalasa.

La prueba de la catalasa es una metodología usada en los laboratorios de bacteriología para poner en evidencia la presencia de la enzima catalasa en aquellas bacterias que la poseen. Junto a la coloración de Gram son las principales pruebas que se le deben realizar a los microorganismos recién aislados. Estas pruebas orientan al microbiólogo sobre los pasos a seguir para la identificación definitiva del microorganismo en cuestión (Gil, 2009).

A.6.2.1 Preparación de reactivos

Buffer fosfato pH 7: Pesar 1,361 g de (KH_2PO_4) fosfato monopotásico anhidro. 1,420 g de (Na_2HPO_3) fosfato disódico anhidro. Disolver ambas sales en un poco de agua destilada estéril y completar con agua hasta 1000 ml.

Tween 80 al 10%: Realizar una dilución 1:10 al Tween 80 que viene comercialmente concentrado. Para ello se toma 1 ml de Tween 80 y se coloca en aproximadamente 2 ml de agua destilada. Se disuelve y se completa el volumen con agua hasta 10 ml.

Reactivo final: Mezclar una cantidad de buffer fosfato con una cantidad de Tween 80 al 10% (a partes iguales). Definir en el laboratorio cuanto se desea preparar.

A.6.2.2 Procedimiento

- Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una muestra del cultivo fresco y se adiciona una gota de H_2O_2 al 3 %.

- La prueba es positiva cuando se pone en contacto la muestra con el H_2O_2 y se produce una reacción inmediata liberando burbujas (Figura A.4).



Figura A.4 Ejecución de la Prueba de la catalasa, mostrando una reacción positiva. Fuente: No machine-readable author provided.

A.6.3 Prueba de oxidasa.

La prueba de oxidasa es un método diagnóstico que evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c. Este sistema induce la transformación del citocromo reducido a oxidado, ya que capta el oxígeno y este a su vez actúa como último aceptor de electrones (H^+) en la cadena respiratoria (Microbitos, 2011).

A.6.3.1 Preparación de Reactivo de oxidasa de Kovacs

Está formado por diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%.

El reactivo de Kovacs se prepara disolviendo 1 gr de la sustancia antes mencionada en 50 ml de agua destilada. Se calienta sutilmente hasta su disolución total. Trasvasar a un frasco color ámbar de capacidad suficiente y completar el volumen a 100 ml con agua destilada. Esperar al menos 15 minutos antes de usar. Guardar en nevera protegido de la luz.

Se rotula como reactivo de oxidasa de Kovacs, para diferenciarlo del reactivo de Kovacs utilizado para revelar la prueba del indol. Este reactivo es el más sensible, menos tóxico pero más costoso que el resto de los reactivos.

Una reacción positiva se evidenciará con este reactivo con el cambio de color de la colonia a lavanda, que vira rápidamente a púrpura casi negro. Una reacción negativa se evidencia porque no hay cambio de color de la colonia o esta toma una ligera coloración rosada. El medio puede igualmente oscurecer, pero eso no significa reacción positiva.

Con este reactivo el tiempo de reacción es crucial, se considera una reacción positiva aquel cambio de color que ocurre entre 5 a 15 seg.

A.6.3.2 Procedimiento

- Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca aproximadamente dos gotas de para amino metil amina (sustituto del reactivo de Kovacs).
- Con un asa se toma las colonias aisladas en placa y se mezcla con el reactivo. La prueba positiva se da cuando el reactivo se oxida rápidamente en presencia del citocromo c produciendo coloración azul marino purpúreo lo que se toma como prueba positiva, si la prueba es negativa no habrá viraje.

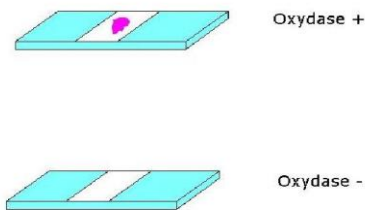


Figura A.5 Prueba de oxidasa Positiva y Negativa. Fuente: Public domain.

A.6.4. Prueba de motilidad:

La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación de los medios OF o en un medio SIM, este método es de confianza variable ya que la picadura se pudo haber hecho chueca o irregular lo que nos darían falso positivo. Para evitar este factor se realiza la técnica de gota suspendida bacteriana.

En esta prueba se alcanzan ver algunas bacterias muy pequeñas y casi translúcidas que se mueven a velocidad variable, observar al menos de 5-10 bacterias recorrer todo el campo de visión para declararse una motilidad positiva. La mayoría de las bacterias motiles son de morfología bacilar o sea Bacilos., Pero no todos los bacilos son motiles (Microbitos, 2011).

Método de la gota pendiente

- Tomar una gota de un cultivo líquido reciente (24 horas) usando un asa de siembra o una pipeta Pasteur estéril.
- Colocar en el centro de un cubreobjetos y añadir cuatro pequeñas gotas de aceite en los cuatro extremos.

- Colocar el portaobjetos excavado sobre el cubreobjetos, cuidando que la gota quede situada en el centro de la depresión.
- Dar la vuelta al portaobjetos.
- Colocar una gota de aceite de inmersión y observar con objetivo de inmersión (100x).

Esta técnica permite observar el desplazamiento rápido y rectilíneo o dando giros y volteretas en aquellas bacterias que tienen flagelos. Las bacterias inmóviles presentan un movimiento vibratorio denominado movimiento browniano, debido al choque de las moléculas en una solución líquida.

Anexo A.7. Método de identificación de bacterias

A.7.1 Kit Rápido API 50 CH

a) Lista de materiales y reactivos

En la Tabla A.15 se presenta los reactivos y materiales utilizados para llevar a cabo la identificación de las bacterias, usando el sistema Api.

Tabla A.15 Reactivos y Materiales Api

Reactivos	Materiales
Galerías API 50 CH	Pipetas Pasteur
McFarland Standard, punto 2	Gradilla para ampollas
Programa informático de identificación ,apiweb™	Protege-ampollas (modelos grande y pequeño)
Aceite de parafina	Equipo general de laboratorio de bacteriología
Medio MRS	Tubos de ensayo
API 50 CHL Medium	Incubadora
Agua destilada estéril	Autoclave

b) Procedimiento

Selección de las colonias

- Verificar la pureza del cultivo.
- Cultivarla sobre medio MRS con agar 24 H a 30°C ó 37°C en microaerofilia. La temperatura de incubación varía según el origen de la cepa.

- Caracterizar: cocos o cocobacilos, Gram (+), catalasa (-), no esporuladas inmóviles, anaerobias (estrictas o facultativas), cultivables sobre el medio MRS.
- Si se utilizan cepas liofilizadas o congeladas, realizar 2 subcultivos en caldo MRS antes del aislamiento sobre el medio MRS sólido.

Preparación de la galería

Cada galería está constituida por 5 filas conteniendo, cada una, 10 pozos numerados. El procedimiento es el siguiente:

- Se rotula la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Se reparte unos 10 ml de agua destilada estéril en los recipientes del fondo para crear una atmosfera húmeda.
- Se saca cada una de las filas de su embalaje, se separan en filas del 0- 9,10-19, 20-29, 30-39, 40-49 y se colocan en el fondo de la cámara de incubación.

Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla conteniendo agua destilada estéril (2 ml) sin aditivos.
- Tomar aproximadamente dos veces colonias del cultivo (puro) con la ayuda de un escobillón o asa.
- Realizar una suspensión densa (S) en la ampolla, depositando en la ampolla los microorganismos que se depositaron en el asa.

Posterior

- Abrir un tubo de ensayo conteniendo agua destilada estéril (5 ml)
- Realizar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión S: anotar dicho número de gotas (n).
- Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium e inocular con 2 veces el número de gotas citadas (o sea 2n).
- Esta suspensión debe utilizarse de inmediato.
- Homogeneizar.

Inoculación de la galería

- Repartir el API 50 CHL Medium así inoculado sólo en los pozos, y recubrir los ensayos con aceite de parafina.
- Incubar a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ó $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en aerobiosis durante 48 horas (± 6 horas).

c) Lectura e Interpretación

Lectura de la galería

- Leer después de 24 y 48 horas de incubación.
- En cada tubo se investiga la acidificación producida, que se traduce por el cambio de color a AMARILLO del púrpura de bromocresol contenido en el medio.
- En el ensayo de esculina (tubo n° 25) se observa un viraje de color de púrpura a NEGRO.
- Anotar los resultados en la hoja de resultados.

Interpretación

El perfil bioquímico así obtenido puede ser identificado a partir de la base de datos, con la ayuda del programa informático de identificación apiwebTM.

Anexo A.8. Metodología de medición de parámetros en el proceso de fermentación ácido-láctica.

A.8.1 Medición de la absorbancia

Base teórica

Absorbancia, o densidad óptica, se define como

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

Donde:

I es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica tras haber atravesado una muestra (intensidad de la luz transmitida).

I_0 es la intensidad de la luz antes de entrar a la muestra (intensidad de la luz incidente).

La absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia, c , por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación: $A = \epsilon b c$, donde c se expresa en mol/L, b es la longitud del camino óptico (anchura de la célula que contiene la disolución de la sustancia) y se expresa en cm, y ϵ es la absorptividad molar, propiedad característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración, siendo sus unidades $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (téngase en cuenta que la absorbancia no tiene unidades).

Para medir los valores de absorbancia de una disolución se utilizan espectrofotómetros UV-Visible, es un equipo de uso fácil y las determinaciones que en él se realizan son de tipo cuantitativo.

Procedimiento

- Ajustar la longitud de onda, presionando primero la tecla “Ajustar nm” y después las teclas numéricas necesarias y por último oprimir ENTER.
- Con la tecla de cambiar modo, puede alternar la determinación de absorbancia, transmitancia o concentración.
- Preparar la solución blanco o de referencia, colóquela en la celda y ésta a su vez en el porta-celdas (la celda se debe orientar con el lado transparente frente a la persona que opera el espectrofotómetro, el ancho de la celda es de 1 cm). Ajuste la absorbancia a cero oprimiendo la tecla medir blanco.

- Retirar la celda y cambie la solución de referencia por la muestra problema.
- Tomar la lectura de la absorbancia que se muestra en el panel. Es recomendable, ajustar nuevamente con el blanco antes de tomar la lectura de otra muestra.
- Cuando se termine de efectuar todas las determinaciones, no olvidar retirar la celda. Presione la tecla “ESC” tres veces para terminar.

A.8.2 Siembra por dilución

- **Dilución:** Se mezcla la muestra, se toma 1.0 mL con una pipeta y se vierte en un tubo con 9 mL de solución reguladora de peptona; se agita el tubo con la muestra y se toma 1.0 mL de la dilución vertiéndose en un segundo tubo con 9 mL de solución reguladora de peptona. Se repite esta operación con un tercero, cuarto o más tubos hasta completar el número de requerido de diluciones, (1: 1000000) o 10⁶, se agitan cuidadosamente todas las diluciones.
- **Vertido en placas:** Se vierte con una pipeta estéril 1.0 mL de cada una de las diluciones realizadas en placas Petri debidamente identificadas y por duplicado.
- **Incubación:** Las cápsulas solidificadas se incuban en posición invertida durante 72 horas a 35 °C
- **Computo de las colonias:** Después de la incubación, se cuentan todas las colonias visibles de las cápsulas que contienen entre 30 y 300 colonias y se anotan los resultados.

Cálculo

- a) Cuando en las capsulas examinadas no se observa ninguna colonia se reporta como Menor de 1×10^1 UFC por gramo o mililitro.
- b) Cuando se observan menos de 30 colonias en la dilución 1:10 se reporta como menos de 3×10^2 UFC por gramo o mL.
- c) Cuando hay más de 30 colonias se cuentan las colonias de las dos placas de la dilución escogida, se calcula la media con dos cifras significativas solamente y se multiplica por el inverso de la dilución correspondiente a fin de obtener el número de bacterias por gramo o mL.

UFC/g = Promedio del Número de Colonias Contadas * Factor de dilución empleado en el cómputo.

A.8.3. Medición del pH

Base Teórica

El pH-metro es un dispositivo que mide el potencial de una solución. Este potencial depende de la actividad de los protones, por lo cual, conociendo el potencial, es posible conocer el pH de la solución a medir. El método más adecuado para la medición del pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una delgada membrana de vidrio que separa dos soluciones con distinta concentración de protones (H^+).

Procedimiento a seguir para la utilización del pH-metro

1. Encender el equipo y dejarlo estabilizarse (el tiempo requerido para esto depende de cada equipo).
2. Lavar el electrodo combinado con cuidado para evitar roturas y déjelo sumergido en agua destilada.
3. Secar suavemente el electrodo con papel absorbente.
4. Sumergir hasta leer el pH correspondiente de la muestra. Esperar unos segundos hasta ver una lectura constante.
5. Lavar y secar el electrodo.
6. Dejarlo sumergido en la solución de KCl. No dejar el electrodo seco durante períodos prolongados.

Nota: Es recomendable verificar que la lectura para los patrones no se ha modificado. De ser así, calibrar el equipo; ya que esto puede ocurrir por falta de estabilización del equipo.

A.8.4. Porcentaje de Acidez Total Titulable

Base teórica

Una titulación o valoración es un procedimiento analítico, en el cual se mide cuantitativamente la capacidad de una determinada sustancia de combinarse con un reactivo. Normalmente, este procedimiento se lleva a cabo mediante la adición controlada del reactivo de concentración conocida a la solución problema, hasta que por algún medio se juzga que la reacción es completa. Al reactivo de concentración conocida usado en la titulación, se le conoce como solución patrón.

El objetivo final de cualquier valoración es la adición del reactivo patrón en una cantidad tal que sea químicamente equivalente a la sustancia problema con la cual reacciona es decir, añadir un número de equivalentes de reactivo patrón igual al número de equivalentes de la sustancia problema.

Reactivos

Indicador de Fenolftaleína 1%: Pesar 1.0 g de fenolftaleína y transfiera a un matraz volumétrico de 100 ml, llene hasta la mitad con alcohol al 95% y disuelva. Complete el volumen con el alcohol y mezcle.

Solución de NaOH 0.1 N: Pesar 0.999992 g de hidróxido de sodio de grado analítico y transfiera a un matraz volumétrico de 250 ml, llene hasta la mitad con agua destilada y disuelva. Complete el volumen con agua destilada y mezcle.

Determinación del porcentaje en peso/volumen (%p/v) del licor muestra

El tratamiento consiste en la toma de una alícuota de 1 ml de licor muestra en la que estará contenida una concentración desconocida de ácido láctico, esta será valorada con una solución de base fuerte con ayuda del indicador hasta llegar a un pH de 8.3. Por lo tanto se procederá de la siguiente manera:

Mida 1 ml del licor muestra con una pipeta aforada y colóquelo en un matraz Erlenmayer de 25 ml. Agregue 10 ml de agua destilada y 3 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína. Titule con una solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M que estará contenida en una bureta de 25 ml con agitación constante proporcionado por el agitador magnético hasta el viraje del indicador. Finalmente se utiliza el Phmetro para comprobar el pH final establecido para esta prueba.

Tomando en cuenta el gasto final de NaOH determinaremos la concentración del ácido en las muestras de licor:

$$N_m V_m = N_{NaOH} V_{NaOH} \quad (1)$$

$$N_m = \frac{N_{NaOH} V_{NaOH}}{V_m} \quad (2)$$

Si en vez de calcular la normalidad del ácido, se prefiere expresar su porcentaje (relación peso/volumen) y tomando en cuenta el número de iones hidróneos (H^+) del ácido que aporta que en este caso es 1 para el cálculo de meq del ácido se operará del siguiente modo:

$$\frac{g \text{ de Ac}}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 = \frac{N_{NaOH} \times V_{NaOH} \times meq.\acute{a}cido}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 \quad (3)$$

Finalmente se obtiene la ecuación siguiente:

$$\% p / v = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times meq.\acute{a}cido \times fd}{V_m} \times 100 \quad (4)$$

Donde,

V_{NaOH} : Volumen gastado de base

N_{NaOH} : Concentración de la base

$meq.\acute{a}cido$: Miliequivalente del ácido presente en la muestra

fd : Factor de dilución

V_m : Volumen del analito

A.9. Composición de los seres vivos.

Para entender un poco de los microorganismos tenemos que saber un poco de la composición celular de los seres vivos, en este caso de la célula.

La célula.

La célula es la unidad morfológica y funcional que compone a todo ser vivo. Estas unidades morfológicas se dividen en dos grandes grupos según su estructura: las células procariotas y las células eucariotas o también llamadas 'procariontes' o 'eucariontes'.

Ambos términos, procariota y eucariota se deben a E. Chatton y se empezaron a usar a principios de 1950. Pero para poder comprender los diferentes tipos de células y sus divisiones es esencial conocer la definición de las mismas.

Diferencias entre ambas células

La principal diferencia radica en que en las células procariotas el material genético no está separado del citoplasma y las eucariotas presentan el material genético está organizado en cromosomas rodeados por una membrana que los separa del citoplasma.

Otra de las diferencias principales entre la célula eucariota y procariota es que los organismos eucariotas tienen un núcleo rodeado de una membrana, mientras que los procariotas no.

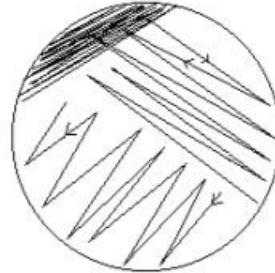
Para concluir, cabe decir que en las procariotas el ADN se encuentra en una región del citoplasma, llamada nucléoide, a diferencia de la célula eucariota, donde la información genética se encuentra en el núcleo.

Anexo A.10. Técnicas de siembra

A.10.1 Técnicas para la siembra en estrías, el objeto es obtener colonias aisladas.

- Técnica A

Consiste en cargar el ansa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se quema el ansa, se enfría, se gira la placa a 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de la placa. Por último, sin quemar el ansa, se estria el resto de la superficie sin sembrar.



- Técnica B

Con el ansa cargada se hacen 3 o 4 estrías; se quema el ansa, se hacen 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores, se quema el ansa y se repite el procedimiento hasta agotar la superficie de la placa.

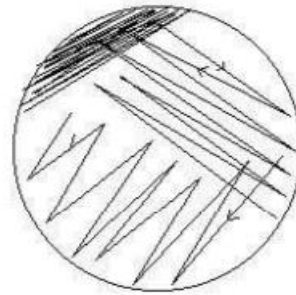


Figura A.6 Ejemplo de rayado en placas.

A.10.2 Siembra en agar en tubo inclinado o bisel

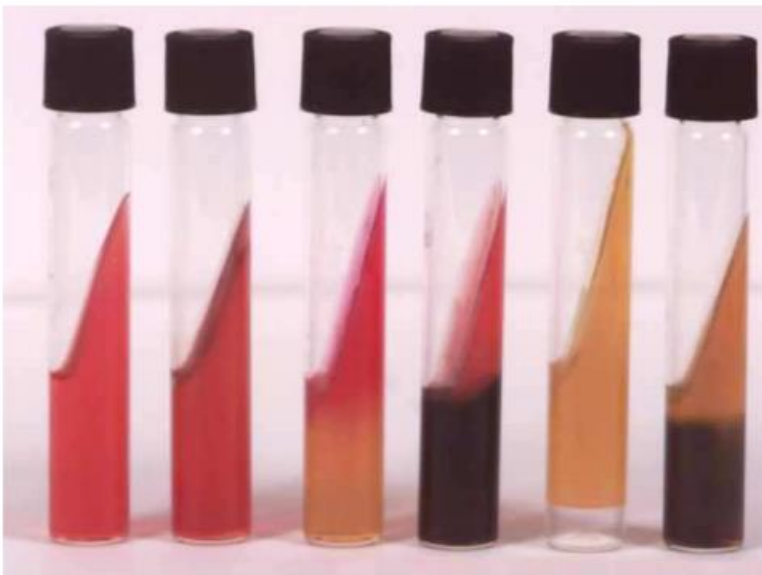


Figura A.7 Ejemplo de Tubos inclinado con agar.

Se colocan 5 ml de medio de cultivo fundido y estéril, se inclina el tubo y se deja enfriar.

El inóculo se siembra, con ayuda de ansa, de la siguiente manera:

- En profundidad con ansa de punta: se pica con el ansa el cultivo a sembrar y se introduce mediante punsión en el medio contenido en la parte inferior del tubo.



- En superficie con ansa de aro: se pica con el ansa el cultivo a sembrar y se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag.



Figura A.8 Ejemplo de rayado en tubos.

Anexo A.11. Preparación del medio de cultivo

Preparación de medio de cultivo sólido.

Se siguen las instrucciones del rótulo del medio de acuerdo a la cantidad a preparar. Se transfiere el medio a un erlenmeyer y se agrega la cantidad de agua destilada establecida.

Con ayuda de un vigilante se disuelven los grumos que puedan formarse y se lleva la suspensión a baño maría hasta que el medio se torne transparente, se cubre el erlenmeyer con un tapón de algodón (torunda) envuelto en gasa (Figura A.7.a). Se cubre la torunda con material impermeable y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Si se utiliza de inmediato, dejar enfriar a temperatura alrededor de 45°C. En caso de que el medio solidifique, fundirlo nuevamente a baño maría antes de su uso.



(a)



(b)

Figura A.9 (a) Ejemplo de un erlenmeyer con agar sólido preparado y (b) Tubos con campana de Durham.

Preparación de medio de cultivo líquido.

En el caso del caldo McConkey, se siguen las instrucciones del rotulo, y se distribuye el caldo colocando 10 ml en tubos de ensayo de 20 y 10 ml en tubos de ensayo de 50. Se coloca previamente en los tubos una campana de Durham invertida. Se tapan los tubos y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C (Figura A.7.b).