



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMODÚRICAS EN
LECHE UTILIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS
FRESCOS ARTESANALES EN LA PARROQUIA RURAL DE
QUIMIAG DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de investigación

Presentado para obtener al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTORA: GISELA PAULINA RAMOS ILVIS

TUTORA: PAOLA FERNANDA ARGUELLO H. MSc.

Riobamba-Ecuador

2018

© **2018**, Gisela Paulina Ramos Ilvis

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación experimental certifica que: El trabajo de investigación: “IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMODÚRICAS EN LECHE UTILIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS FRESCOS ARTESANALES EN LA PARROQUIA RURAL DE QUIMIAG DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”, de responsabilidad de la señorita egresada Gisela Paulina Ramos Ilvis, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

Paola Arguello MSc.

DIRECTOR DE TESIS

Janneth Gallegos PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Gisela Paulina Ramos Ilvis, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Gisela Paulina Ramos Ilvis
060381547-3

DEDICATORIA

A mi padre:

Cuyo más grande deseo era el que llegue a culminar con éxito mi carrera. Y que a su ejemplo me convierta en una persona ética y honorable en el desarrollo de mi vida como profesional.

A mi madre:

Con todo cariño a ella que ha compartido conmigo los más difíciles años, durante toda mi vida estudiantil y en todo momento tuvo voces de aliento para que termine mis estudios.

A mi hermana Anita:

Que como una verdadera madre me ayudó con toda decisión y en todo sentido hasta terminar mis estudios.

A mi tío P. Baltazar:

Que como hermano ha sido un pilar fundamental en mi vida, acompañándome en mis momentos de alegrías y tristezas; agradezco de manera especial su acompañamiento espiritual el cual me ha ayudado a sobrellevar las diferentes dificultades presentadas.

A amigos:

Carlitos B, Carlita H, Joha V., Miguel S., Benjamín R., Vero V., José Luis P., Jenny L., Fernando C., Jessy Z., Amparito J., Paola V., por estar presentes durante toda o la mayor parte de mi vida. Gracias por demostrarme que las cosas y buenos actos son recompensados con grandes personas como Uds.

A Vero M., Pao Chiluzza R. y Rafita P. por brindarme su amistad, apoyo incondicional y aportar con sus valiosos conocimientos y experiencias en este trabajo.

De manera especial dedico este trabajo al Programa de Becas estudiantiles de Austria en la persona de Ivonne Carrera S., Patricia Moreno y todas las personas que forman parte de este maravilloso proyecto por depositar su confianza en mí, y haber sido un sustento importante durante toda mi formación estudiantil.

Gise

AGRADECIMIENTO

A Dios y María Inmaculada

Por darme la vida, mi familia y la oportunidad de conocer personas que forman una parte imprescindible en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Universidad donde durante todo este tiempo me he formado, adquiriendo los conocimientos que me constituirán como una profesional ética y competente en el desempeño de la vida profesional.

A la MSc. Paola Arguello H.

Quién, como directora de Tesis, me brindó todo su apoyo y generosa ayuda, junto con su amplia experiencia y prueba de capacidad científica para llevar a feliz término mi tesis.

A la PhD. Janneth Gallegos

De quien guardo profundo reconocimiento y eterno agradecimiento, porque ella supo brindarme todo el bagaje de sus conocimientos y experiencia en Microbiología, con la fina sensibilidad de quién realmente es poseedor de la ciencia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I

1.	Marco teórico referencial.....	18
1.1.	Antecedentes de la investigación.....	18
1.2.	Microbiología	18
1.3.	Leche	19
1.3.1.	Leche cruda.....	19
1.3.2.	Leche pasteurizada	19
1.4.	Derivados de la leche.....	19
1.4.1.	Queso	19
1.4.1.1.	Queso artesanal	19
1.4.2.	Yogurt.....	20
1.5.	Propiedades nutritivas.....	20
1.6.	Microorganismos en alimentos.....	20
1.6.1.	Microorganismos patógenos contaminantes de la leche.....	21
1.6.1.1.	Bacterias termodúricas.....	21
1.7.	Fuentes de bacterias termodúricas y defectos en la producción quesera.	21
1.8.	Clasificación de bacterias termodúricas	21
1.8.1.	Géneros de mayor importancia.....	22
1.8.1.1.	Género <i>Bacillus</i>	22
1.8.1.2.	Género <i>Lactobacillus</i>	22
1.9.	Tinción gram.....	22
1.10.	Medios de cultivo	24
1.10.1.	Tipos de medios de cultivo	24
1.10.2.	Composición química de medios.....	25
1.11.	Pruebas microbiológicas de identificación preliminar - lectura inmediata.....	28
1.11.1.	Catalasa.....	28

1.11.2.	Oxidasa	28
1.12.	Pruebas microbiológicas rápidas	28
1.12.1.	Movilidad.....	28
1.12.2.	Indol.....	29
1.13.	Pruebas microbiológicas-reacción superada las 6 horas.....	29
1.13.1.	Hidrólisis de gelatina	29
1.14.	Pruebas de identificación de bacterias termodúricas	29
1.15.	Susceptibilidad antimicrobiana.....	29
1.15.1.	Antibióticos	30
1.15.2.	Discos antibióticos.....	30
1.15.3.	Resistencia antimicrobiana	31
1.16.	Mantenimiento de cultivos	31
1.16.1.	Métodos de conservación a corto plazo.....	31
1.16.2.	Métodos de conservación a largo plazo.....	33

CAPITULO II

2.	Marco metodológico.....	34
2.1.	Tipo de investigación.....	34
2.2.	Diseño de la investigación.....	34
2.3.	Unidad de análisis.....	34
2.4.	Localización del muestreo y población de estudio	34
2.5.	Lugar de la investigación.....	34
2.6.	Etapas de la investigación.....	35
2.7.	Métodos y técnicas	36
2.8.	Pre ensayos para determinar dilución y temperatura para el crecimiento de bacterias ácido lácticas y termodúricas	36
2.9.	Preparación de diluciones para la siembra en los medios de cultivo PCA, MRS.....	37
2.10.	Preparación de medios.....	38
2.10.1.	Medio MRS	38
2.10.2.	Caldo MRS	38
2.10.3.	Agar PCA, SIM, Müeller-Hinton	39
2.11.	Métodos de siembra.....	39
2.11.1.	Siembra por inmersión o vertido en placa	39

2.11.2.	Siembra por punción.....	39
2.11.3.	Siembra por estriamiento.....	40
2.12.	Recuento de colonias (método de recuento en placa).....	40
2.13.	Aislamiento de cepas bacterianas	40
2.14.	Características fenotípicas	41
2.14.1.	Caracterización macroscópica	41
2.14.2.	Caracterización microscópica.....	41
2.14.3.	Caracterización bioquímica	41
2.14.4.	Prueba de hidrólisis de gelatina	42
2.14.5.	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	43
2.15.	Conservación de cepas bacterianas.....	43
2.16.	Reactivación de cepas bacterianas mantenidas por el método de congelación ordinaria a -20°C	43
2.17.	Prueba de viabilidad	44

CAPÍTULO III

3.	Resultados y discusión.....	45
3.1.	Recuentos bacterianos	45
3.1.1.	Recuento de bacterias ácido lácticas en medio mrs	46
3.2.	Caracterización morfológica de bacterias ácido lácticas termodúricas	48
3.3.	Caracterización fenotípica	51
3.4.	Susceptibilidad antibiótica.....	52
3.5.	Conservación bacteriana.....	56

CONCLUSIONES.....58

RECOMENDACIONES.....59

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Composición nutritiva de la leche.....	20
Tabla 2-1:	Procedimiento para Tinción Gram.....	23
Tabla 3-1:	Medio de cultivo Agar MRS.....	25
Tabla 4-1:	Medio de cultivo Agua peptonada.....	26
Tabla 5-1:	Medio de cultivo Caldo MRS.....	26
Tabla 6-1:	Medio de cultivo Agar PCA.....	27
Tabla 7-1:	Medio de cultivo SIM.....	27
Tabla 8-1:	Medio de cultivo Agar Müeller-Hinton.....	28
Tabla 1-2:	Pre ensayos utilizados en la investigación.....	36
Tabla 2-2:	Diluciones para recuento de bacterias termodúricas.....	38
Tabla 1-3:	Recuento de aerobios mesófilos en medio PCA.....	45
Tabla 2-3:	Recuento de bacterias ácido lácticas en medio MRS.....	47
Tabla 3-3:	Morfología macro y microscópica de los aislados de BAL.....	49
Tabla 4-3:	Pruebas Fenotípicos de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas.....	51
Tabla 5-3:	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio MRS.....	54
Tabla 6-3:	Prueba de viabilidad y pureza.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Apariencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante Tinción Gram.....	23
Figura 1-2:	Metodología.....	34
Figura 2-2:	Técnica de diluciones.....	37
Figura 1-3:	Colonias de borde regular.....	50
Figura 2-3:	Colonias de borde irregular.....	50
Figura 3-3:	Cocos Gram positivos	50
Figura 4-3:	Bacilos Gram positivos	50
Figura 5-3:	Bacilos gram negativos	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Muestreo de la Quesera Q1 Y Q2
Anexo B:	Recuentos bacterianos
Anexo C:	Cultivo bacteriano en caldo MRS
Anexo D:	Aislamiento de bacterias termodúricas
Anexo E:	Pruebas bioquímicas tradicionales
Anexo F:	Tinción Gram
Anexo G:	Pruebas de movilidad
Anexo H:	Viabilidad de bacterias ácido lácticas termodúricas
Anexo I:	Cepario de bacterias ácido lácticas termodúricas
Anexo J:	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en medio MRS
Anexo K:	Fichas técnicas de conservación bacteriana

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue cuantificar e identificar bacterias termodúricas presentes en la leche pasteurizada utilizada en la elaboración de quesos frescos artesanales en la parroquia rural de Quimiag de la provincia de Chimborazo. Se realizó un recuento de aerobios mesófilos y bacterias ácido lácticas termodúricas en muestras de leche: cruda, con tratamiento en la quesera y con tratamiento en el laboratorio; posteriormente se realizaron siembras sucesivas para obtener aislados puros, a los que se les aplicó un test macro y microscópico, y pruebas fenotípicas (indol, hidrólisis de gelatina, catalasa, oxidasa, sulfuro indol motilidad (SIM), susceptibilidad a antibióticos). Los resultados muestran que el tratamiento térmico que la leche recibe en las queseras disminuye el recuento de mesófilos aerobios y de bacterias ácidos lácticas comparados con los resultados del tratamiento térmico que recibió en el laboratorio. En cuanto al aislamiento e identificación, se obtuvieron veinte aislados identificados microscópicamente como, cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos; por los test fenotípicos demostraron ser catalasa y oxidasa negativas, no productores de indol ni hidrolizadores de gelatina, con poca movilidad, altamente sensibles antibióticos como eritromicina, amoxicilina, tetraciclina y resistentes a gentamicina y vancomicina. El tratamiento térmico en las queseras pese a la falta de choque térmico disminuye más la carga microbiana de bacterias ácido lácticas con respecto al tratamiento del laboratorio, lo cual explicaría el sabor y aroma menos acentuados en quesos elaborados con este tipo de leche. Se recomienda la realización de pruebas moleculares para la identificación de este tipo de bacterias, debido a que gran parte de ellas podrían ser utilizadas en la industria alimenticia como probióticos o mejorar las características sensoriales y nutritivas de los quesos.

PALABRAS CLAVE: < BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA >, < TERMODÚRICOS >, < LECHE CRUDA>, >, < CALIDAD HIGIENICO – SANITARIA >, < QUESERA ARTESANAL >. < QUIMIAG (PARROQUIA)>.

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify and identify thermotolerant bacteria present in pasteurized milk used in the preparation of fresh artisan cheeses in Quimiag rural parish in Chimborazo province. A count of aerobic mesophiles and thermotolerant lactic acid bacteria was made in samples of raw milk: with treatment in the cheese and with treatment in the laboratory; subsequently, successive plantings to obtain isolated pure were made, to which a tests (indole, hydrolysis of gelatin, catalase, oxidase, sulfide indole motility (SIM), susceptibility to antibiotics). The results show that the heat treatment that the milk receives in the cheese factory decreases the count of mesophilic aerobic and lactic acid bacteria, compared with the results of heat treatment that you received in the laboratory. With regard to the isolation and identification, twenty isolated identified microscopically were obtained, Gram-positive and Gram-negative bacteria. By phenotypic test they proved to be catalase and oxidase negative, not producers of indole and hidrolizadores of gelatin, with little mobility, highly sensitive antibiotics such as erythromycin, amoxicillin, tetracycline and resistant to gentamicin and vancomycin. Despite the lack of thermal shock, the heat treatment in the cheese factory decreases the load microbiana of lactic acid bacteria with regard to the laboratory treatment, which would explain the less accentuated taste aroma in cheeses made with this type of milk. It is recommended the realization of molecular test for the identification of this type of bacteria, due to the fact that most of them could be used in the food industry as probiotics or improve sensory and nutritional characteristics of the cheese.

KEYWORDS: <BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <THERMOTOLERANT>, <RAW MILK>, <HYGIENIC-SANITARY QUALITY>, <ARTESANAL CHEESE FACTORY>, <QUIMIAG (PARISH)>

INTRODUCCIÓN

Se considera a la leche como el único producto procedente de la naturaleza capaz de actuar de forma exclusiva como fuente de alimento, por sus propiedades nutritivas no ha sido superada por otros alimentos conocidos por el ser humano (González, Molina y Coca, 2010, p.1). Sin embargo, desde su obtención hasta llegar al consumidor, estas propiedades pueden verse sometidas a un sin número de riesgos que presentan peligros físicos, químicos y microbiológicos, por tanto, propician el deterioro de la calidad original de la misma (Magari, 2000, p.2).

Estos riesgos ya sea en conjunto o en forma aislada afectan negativamente la calidad sanitaria y nutritiva de la leche, afectando a la salud pública y a la economía de cualquier país (González, Molina y Coca, 2010, p.1).

Según un informe expedido por la OMS y el Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG), pese a las insuficiencias en datos y a las limitaciones de estas estimaciones iniciales, manifiesta que la carga mundial de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) es considerable y que la misma aqueja a personas de todas las edades, con mayor prominencia a menores de cinco años y a quienes viven en regiones del mundo en donde los ingresos económicos son muy bajos. (WHO/FOS, 2010, p.1).

Los microorganismos son la causa más frecuente de ETAs, un alimento puede contaminarse con estos agentes por causas muy diversas, siendo la manipulación descuidada o incorrecta una de las principales causas de contaminación, esto aunado a la composición química del alimento, lo categoriza como un alimento de alto riesgo sanitario, por tanto, resulta imprescindible realizar los controles sanitarios pertinentes para evitar dichas enfermedades.

Una forma de controlar la calidad sanitaria, en el caso particular de la leche cruda son los microorganismos termodúricos, utilizados como microorganismos indicativos, útiles para juzgar el funcionamiento de empresas productoras, de igual forma dan a conocer durante la manipulación, el incumplimiento de pautas de higiene y permiten inferir la vida útil y la inocuidad del alimento. (Signorini et al., 2008, p. 207)

Específicamente microorganismos del género *Bacillus* y *Clostridium* causan deterioro de la leche como de productos lácteos y en casos más severos cobran importancia por sus efectos en la

seguridad alimentaria debido a las toxinas que producen (Becker et al. 1994: p.9) (Reginensi et al. 2014: p.39), a su vez el género *Lactobacillus* puede modificar las características sensoriales y nutritivas del queso (Samaniego Fernández Luz M. 2010; p.1), por lo que es trascendental no solamente realizar un recuento de los microorganismos termodúricos, sino también caracterizarlos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar bacterias termodúricas presentes en la leche pasteurizada utilizada en la elaboración de quesos frescos artesanales en la parroquia rural de Quimiag de la Provincia de Chimborazo.

Objetivos Específicos

Cuantificar las bacterias aerobias mesófilas y bacterias ácido lácticas presentes en la leche de queseras artesanales de la Parroquia Rural de Quimiag como indicadores de la calidad higiénica.

Obtener aislados puros y caracterizarlos mediante examen macro y microscópico.

Caracterizar mediante pruebas fenotípicas las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) por ser géneros de interés para la industria láctea.

Elaborar el banco de cepas de las bacterias ácido lácticas termodúricas aisladas, verificar su viabilidad y pureza

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

En Ecuador uno de los productos de mayor consumo es el queso fresco y una parte importante es elaborada artesanalmente (Arguello P.; Lucero O.; Castillo G.; Escobar S.; Albuja A., 2015: p.65), sin embargo, este producto se convierte en un alimento con mayor potencial de transmisión de ETAs, debido a las condiciones de higiene no adecuadas en las que se elabora. Estos productos afectan gravemente a la salud y crecimiento económico de un país. (Taylor y Akhtar, 2015, p.219).

Varios estudios realizados indican la relación de contaminación microbiana con la higiene de las instalaciones de fabricación. (Sampayo et al., 2001: p.2), por esto es importante la evaluación de las condiciones higiénico sanitarias de los lugares en los que se elaboran. Las queseras artesanales generalmente se ubican en los sectores rurales, de ahí el planteamiento del proyecto de investigación titulado “Evaluación Higiénico-Sanitaria de las Queseras Artesanales de la Parroquia Rural de Quimiag Cantón Riobamba de la Provincia de Chimborazo”, cuyos resultados preliminares demostraron la presencia de bacterias termodúricas en la leche las cuales resisten temperaturas de pasteurización; dichos microorganismos pueden o no ser beneficiosos en este producto. (Ortíz y Martínez, 2011: p.38)

1.2. Microbiología

La microbiología forma parte del estudio de seres vivos cuya dimensión se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano. (González, 2015, p.1)

La microbiología estudia un heterogéneo grupo de microorganismos microscópicos que pueden vivir ya sea en forma aislada o en asociaciones de células. (Brooks et al, 2011: p.1)

1.3. Leche

1.3.1. *Leche cruda*

La norma NTE INEN 0009:2012 define a la leche cruda como aquella que no ha sufrido ningún tipo de tratamiento térmico luego de su extracción desde la ubre, es decir, la temperatura no ha superado los 40°C. (INEN 009, 2012: pp. 1-9)

1.3.2. *Leche pasteurizada*

Leche homogenizada que ha sufrido calentamiento térmico el mismo que garantiza la eliminación de todos los microorganismos patógenos y casi la totalidad de microorganismos saprofitos, sin cambiar las características físico-químicas, organolépticas y nutricionales. (INEN 0010, 2012: pp.1-12)

1.4. Derivados de la leche

1.4.1. *Queso*

El queso es el producto que resulta de la coagulación de la caseína de manera total o parcial, debido a la acción que ejercen coagulantes idóneos, induciendo un escurrimiento del suero. El queso puede ser fresco, semiduro, duro, madurado, no madurado (INEN 1528, 2012: pp.1-11)

1.4.1.1. *Queso artesanal*

La Sociedad Americana del Queso explica que al hablar de queso artesanal se hace referencia al queso producido a mano esencialmente, su manufactura no es en grandes cantidades y no se utiliza en lo posible procesos mecánicos; este posee diferentes sabores e incluyen en su elaboración todos los tipos de leche. (Dominguez-Lopez et al., 2011: p.176)

1.4.2. *Yogurt*

Se obtiene mediante fermentación láctica de la leche o mezcla de estas, gracias a la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Sreptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*, aunque puede haber la presencia de otras bacterias benéficas que gracias a su actividad pueden otorgar algunas características al producto terminado; las mismas deben permanecer viables y activas al inicio y durante toda la vida útil del producto. (INEN 2395, 2011: pp.1-10)

1.5. **Propiedades nutritivas**

Las propiedades nutritivas que poseen la leche y sus derivados son muy diversas, no obstante desde su obtención hasta llegar al consumidor, estas propiedades pueden verse sometidas a un sin número de riesgos que favorecen un deterioro de la calidad original de la misma.(Magari, 2000: p.2).

Tabla 1-1: Composición Nutritiva de la Leche

Nutriente (g)	Vaca	Búfala	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía (Kcal)	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

Fuente: Agudelo y Bedoya, 2008. (Composición Nutricional de la leche de ganado vacuno)

Realizado por: Gisela Ramos.2018

1.6. **Microorganismos en alimentos**

Sanitariamente, los alimentos pueden servir como vehículos de infecciones e intoxicaciones graves debido a la producción de toxinas generadas por microorganismos. Desde el punto de vista de industrial los microorganismos poseen una importancia incuestionable, ya que pueden alterar los componentes de los alimentos estabilizándolos y alargando su vida útil y, además, gracias a ciertos compuestos se puede conferir sabores característicos. De esta manera se ve compensada la acción de los

microorganismos alterantes y responsables del deterioro de ciertos alimentos. (Rugama. y Castillo, 2010: p.7)

1.6.1. Microorganismos patógenos contaminantes de la leche

1.6.1.1. Bacterias termodúricas

Las bacterias termodúricas pueden estar representados por formas esporuladas que resisten el tratamiento térmico, es decir que sobreviven a temperaturas comprendidas entre los 60 - 80°C, los géneros más comunes presentes en leche son los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, además de formas vegetativas termorresistentes como *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, algunos *Lactobacillus* y otros. (Valbuena et al., 2004: p.9)

1.7. Fuentes de bacterias termodúricas y defectos en la producción quesera.

La contaminación de la leche ocurre durante y después del ordeño (Gleeson; O'Connell; Jordan, 2013, p.221). La mayor parte de estos contaminantes son microorganismos Gram positivos y su termorresistencia revelan que cuando están presentes en la leche cruda también pueden estar presentes en el producto final. (Signorini et al. 2008)

Particularmente en la producción quesera la presencia de éstas bacterias se encuentra asociada al defecto conocido como “hinchazón tardía” mientras que otras bacterias no productoras de esporas termodúricas (heterofermentativos) frecuentemente se asocian a problemas de hinchazón por producción de gas. (Reginensi et al., 2014: p.211)

1.8. Clasificación de Bacterias Termodúricas

Las bacterias termodúricas aisladas de productos lácteos pertenecen a diferentes grupos microbianos e incluyen cepas de los géneros *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, y bacterias formadoras de esporas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Clostridium*. (Valbuena et al., 2004: p.9)

1.8.1. Géneros de mayor importancia

1.8.1.1. Género *Bacillus*

El género *Bacillus* es de especial importancia debido a su consideración como potencial patógeno de los alimentos; su presencia es común en la leche. Gracias a investigaciones se ha confirmado que el aumento de temperatura influye en la capacidad reproductiva de este género. (Science, 2007: p.7)

1.8.1.2. Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es considerado beneficioso para la salud humana y animal porque pueden ser utilizados como probióticos. Debido a su capacidad antagónica, que favorece a la producción de metabolitos inhibidores como H₂O₂, ácidos orgánicos y otros derivados de compuestos aromáticos como glicerol, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas. (Samaniego Fernandez Luz M., 2010: p.1)

Las bacterias heterolácticas en la industria de los alimentos se consideran de mayor importancia por la producción de compuestos como el acetaldehído y diacetaldehído; que tienen la propiedad de intensificar el sabor y aroma de los productos. (Ramírez et al., 2011: p. 2)

1.9. Tinción Gram

Esta técnica permite la diferenciación taxonómica de bacterias en función de su capacidad para retener o no determinados colorantes, clasificándolas en dos grandes grupos: (López-Hontangas, Castillo y Salavert , 2007: p.30)

- Gram-positivas (color violeta azulado)
- Gram-negativas (color rojo-rosado)

Tabla 2-1: Procedimiento de la Tinción Gram

COLORANTES	MODO DE ACCIÓN
Cristal Violeta	Es el colorante primario y se fija con el peptidoglicano de la pared bacteriana.
Lugol	Es el mordiente e impide la salida del colorante primario debido a la formación del complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana.
Alcohol-acetona	Deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma por lo que actúa como decolorante.
Safranina	Tiñe las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo; es decir se usa como colorante secundario.

Fuente: López, 2014. (Tinciones básicas en el laboratorio de microbiología)

Realizado por: Gisela Ramos. 2018



Figura 1-1: Apariencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante Tinción Gram

Fuente: (Vizcarrondo y Gutiérrez 2008). Morfología de mo.

Por lo cual los géneros esporulados *Bacillus* y *Clostridium* son significativos para la industria láctea debido a su amplia distribución en los ambientes naturales y aunque su concentración inicial en la leche sea mínima pueden esporular y resistir los tratamientos térmicos. (Nicholson et al., 2000: p.550)

1.10. Medios de cultivo

Un medio de cultivo contiene un conjunto de componentes (macronutrientes, micronutrientes, factores de crecimiento) que crean las condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos. (Doménech y García, 2009: p.1)

1.10.1. Tipos de medios de cultivo

Existe una gran variedad de medios de cultivo utilizados en el mercado, su técnica y utilización depende de la naturaleza de la investigación que se realice. (Brooks et al., 2011: p.70)

Medios sólidos: Permiten aislar todas las bacterias presentes en una muestra cualquiera. (Medina, 2012: p. 9)

Medios líquidos: Se utilizan para aislar bacterias en donde su concentración sea mínima. (Medina, 2012: p. 9)

Medio complejo: Son medios comúnmente utilizados, formados por tejidos animales y vegetales, por lo que su composición que no es está exactamente definida. Su desventaja es que en condiciones experimentales la reproductibilidad no puede ser exacta. (Medina, 2012: p.12)

Medio de enriquecimiento: Son sustancias nutritivas normales que incorporan factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. (Medina, 2012: p.10)

Medios selectivos: Permiten aislar bacterias a partir poblaciones mixtas; contienen sustancias que favorecen e inhiben el crecimiento de algunas bacterias como: cloruro de sodio, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares, antibióticos, antisépticos. (Fernández Olmos et al., 2010: p.5)

Medios diferenciales: Ayudan dilucidar las características distintivas de las colonias en función del color que estas presenten. (Fernández Olmos et al., 2010: p.5)

1.10.2. Composición Química de Medios

A continuación, se detalla en tablas la composición química de los medios de cultivo a utilizarse

Agar MRS

Gracias a la composición de glucosa, peptona, manganeso y magnesio, este medio es ideal para el crecimiento de todas las cepas de *Lactobacillus*, incluso de cepas de cultivo difícil y lento; además se obtiene un mejor crecimiento con la modificación del pH hasta un valor aproximado de 5.5. Sin embargo, dificulta la gelificación del medio. (Panreac Química S.A, 2000: p.86)

Tabla 3-1: Medio de cultivo Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Ingrediente	Concentración del medio g/L
di- Amonio Hidrógeno Citrato	2,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
D (+)- Glucosa	20,0
Magnesio Sulfato	0,2
Manganeso (II) Sulfato	0,05
Peptona Bacteriológica	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sodio Acetato	5,0
Tween 80	1,0
Agar	10,0

Fuente: Panreac Química SA, 2000. (Manual Básico de Microbiología) p.86

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Cultivo de Agua Peptonada

Este medio es empleado como diluyente en muestras alimentarias, diversos materiales e inclusive agua. Además, debido a su elevada concentración de triptófano puede ser usado para la determinación de microorganismos Indol-positivos. (Panreac Química S.A, 2000: p.8)

Tabla 4-1: Medio de cultivo Agua Peptonada

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Peptona	10
Cloruro de sodio	5

Fuente: Panreac Quimica SA, 2000. (Manual Básico de Microbiología) p.8

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Caldo MRS

El caldo MRS es utilizado para el enriquecimiento de productos alimenticios en general de productos lácteos, además permite determinar microorganismos mediante el método del NMP. (Panreac Química S.A, 2000: p.86)

Tabla 5-1: Medio de cultivo Caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Ingrediente	Concentración del medio g/L
di- Amonio Hidrógeno Citrato	2,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
D (+)- Glucosa	20,0
Magnesio Sulfato	0,2
Manganeso (II) Sulfato	0,05
Peptona Bacteriológica	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sodio Acetato	5,0
Tween 80	1,0

Fuente: Panreac Quimica SA, 2000. (Manual Básico de Microbiología) p.86

Realizado por: Gisela Ramos, 2018

Agar PCA

El medio Plate Count Agar es utilizado para realizar la determinación microbiológicos de agua, leche, comida y otros productos lácteos. (Group, 2017: p.1)

Tabla 6-1: Medio de cultivo Plate Count Agar (PCA)

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Triptona	5,0
Dextrosa	1,0
Extracto de levadura	2,5
Agar	12,0

Fuente: (Group 2017b) Plate Count Agar

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Medio SIM

El medio SIM generalmente es utilizado para la diferenciación e identificación de Enterobacterias debido a la producción de sulfuro, indol y movilidad. (Panreac Quimica SA, 2000: p.119)

Tabla 7-1: Medio de cultivo SIM

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Amonio Hierro(III) Sulfato	0,2
Peptona de Carne	6,1
Peptona de Caseína	20,0
Sodio Tiosulfato	0,2
Agar	3,5

Fuente: Panreac Quimica SA, 2000. (Manual Básico de Microbiología) p.119

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Agar Müller-Hinton

Este medio debido a su composición es recomendado generalmente para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana, ya que es un medio nutritivo no selectivo que favorece el desarrollo microbiano, por lo que ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la ejecución de antibiogramas en medio sólido debido a la buena reproducibilidad en pruebas de sensibilidad. (Group, 2017; p.1)

Tabla 8-1: Medio de cultivo Agar Müller-Hinton

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Caseína ácida hidrolizada	17,5
Pasta de extracto de corazón	5,0
Almidón	1,5
Agar	12,0

Fuente: (Group 2017) Mueller Hinton Agar p.1

Realizado por: Gisela Ramos, 2018

1.11. Pruebas Microbiológicas de Identificación Preliminar - Lectura inmediata

1.11.1. Catalasa

Enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, esta permite hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso liberándolo en forma de burbujas. (Fernández Olmos et al., 2010: p.6)

1.11.2. Oxidasa

Determina la presencia de enzimas oxidasas y su reacción se debe al sistema conocido como citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo; el cual es reducido por el oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. (Fernández Olmos et al., 2010, p.6)

1.12. Pruebas microbiológicas rápidas

1.12.1. Movilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Principalmente los bacilos tienen movilidad debido a que poseen flagelos, sin embargo, existen algunos cocos que son móviles. (Lira et al., 2003: p.96)

1.12.2. *Indol*

Prueba empleada para identificar la liberación de indol en un cultivo bacteriano, debido a la acción de la enzima triptofanasa sobre el aminoácido triptófano. (Fernández Olmos et al.; 2010: p.7)

1.13. Pruebas microbiológicas-Reacción superada las 6 horas

1.13.1. *Hidrólisis de Gelatina*

Permite conocer la capacidad que poseen ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina, convirtiéndolos en aminoácidos y péptidos por la acción de enzimas específicas conocidas como gelatinasas. (Fernández Olmos et al.; 2010: p.7)

1.14. Pruebas de identificación de bacterias termodúricas

Para lograr su multiplicación, estas bacterias requieren de elevadas temperaturas, es decir que para determinar su presencia se debe realizar un tratamiento térmico en baño de María a 80°C durante 10 min. (Coorevits et al., 2011: p.18)

Su determinación será eficiente mediante siembra en superficie utilizando Caldo MRS, además Agar PCA. A partir de estas se identifica por sus características morfológicas diferentes colonias para luego ser aisladas en el mismo medio y posteriormente identificadas mediante pruebas fenotípicas tales como catalasa, oxidasa, SIM, hidrólisis de gelatina y susceptibilidad a antibióticos. (Moreno, 2011: p.18)

1.15. Susceptibilidad Antimicrobiana

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana tiene por objetivo evaluar la respuesta que presenta un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, reflejando de este modo su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o conjunto bacteriano. (Picazo et al., 2000: p.4)

1.15.1. Antibióticos

Son sustancias producidas por el metabolismo de organismos vivos, principalmente hongos y bacterias; éstos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o destruir microorganismos. (Seija y Vignoli, 2006: p.631). Su uso frecuente ha extendido el término de antibiótico a aquellos agentes antibacterianos sintéticos como sulfonamidas y quinolonas. (Volfredo, 2010: p.7)

1.15.2. Discos antibióticos

Discos que contienen concentraciones predeterminadas de antibióticos permitiendo una correlación más o menos precisa de la concentración inhibitoria de dichos antibióticos. (Bernal R. y Guzmán, 1984: p.112)

➤ **Eritromicina**

Este antibiótico bacteriostático de moderada o rápida absorción; tiene la capacidad de estar presente en leche hasta 72 horas equivalente a 6 ordeños y 30 días en carne después del último tratamiento. (Carmona Solano y Vindas 2006; p. 51)

➤ **Amoxicilina**

Posee un amplio espectro pues actúa contra bacterias gram positivas y negativas; empujándose como un bactericida en infecciones del ser humano y veterinarias (Mora y García 2007; p.53); puede durar en leche hasta 72 horas y en carne 21 días.

➤ **Gentamicina**

Es un antibiótico bactericida que posee un amplio espectro de acción sobre bacterias gram positivas y gram negativas; posee además un efecto post - antibiótico prologado por lo que su rastro demora 80 días en carne y 96 horas en leche equivalente a 8 ordeños luego del último tratamiento. (Mora y García 2007; p.42)

➤ **Vancomicina**

Pertenece al grupo de glucopéptidos con efecto bactericida. Posee un amplio espectro de acción actuando sobre la mayor parte de bacterias gram positivas; además posee una casi exclusiva excreción glomerular por lo que está presente en leche. (Mora y García 2007; p.96)

➤ **Tetraciclina**

Antibiótico de uso bacteriostático, poseen un espectro de acción amplio pues actúan sobre bacilos y cocos gram positivos, bacilos gram negativos; su metabolismo es parcial y su excreción es por filtración glomerular por lo que su rastreo en leche es de 72 horas y 28 días en carne. (Mora y García 2007; p.65)

1.15.3. Resistencia Antimicrobiana

Las terapias prolongadas con el uso de antibióticos de vía oral y/o parenteral conllevan al desarrollo de cepas resistentes, las cuales no solo se pueden transferir a bacterias patógenas sino también a las no patógenas. (Okolo, 1986: p.23)

1.16. Mantenimiento de cultivos

El mantenimiento de cultivo son procedimientos que a veces no son considerados como una prioridad dentro del laboratorio, sin embargo; el desarrollo de medicamentos, aminoácidos, etc. ha generado la necesidad de llevar a cabo procedimientos de mantenimiento que puedan brindar una mayor estabilidad de las características de interés las cuales puedan ser aprovechadas en el campo industrial o de investigación. (Leal y Ramírez, 2005: p.4)

Por otra parte, no existe un método universal de conservación debido a que existen diferentes grupos taxonómicos en los que sus características de interés se ven afectadas pues su comportamiento es diferente.

1.16.1. Métodos de conservación a corto plazo

➤ **Subcultivo**

Permite la inoculación de un cultivo en un medio fresco que favorezca su crecimiento y almacenamiento; este método se basa en trasladar el cultivo a un medio fresco antes de que este perezca. Este método es de bajo costo y aplicable en diferentes microorganismos, sin embargo, existe un alto riesgo de contaminación del subcultivo, pérdida de las características y mutación. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.21)

➤ **Inmersión en Aceite**

Existen algunas bacterias las cuales pueden sobrevivir en aceite mineral de grado medicinal o con parafina de gravedad específica durante meses e inclusive años. Este método preserva a los cultivos mayores periodos de tiempo, sin embargo, las desventajas son iguales a las experimentadas en el subcultivo. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.22)

➤ **Congelación Ordinaria -20°C**

Su conservación se mantiene a una temperatura de -20°C, y el éxito del mantenimiento se ve sesgado por el tipo de microorganismos a conservar puesto que no todos reaccionan de manera similar. El tiempo de conservación oscila entre los 6 meses y los 2 años, pero no es muy recomendable debido al daño celular que producen a nivel de congelación. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.23)

➤ **Baja Congelación -70°C**

Esta conservación de cultivos se realiza a una temperatura de -70°C y es utilizado para una gran variedad de bacterias, constituye un método fácil, rápido y su preservación ofrece una viabilidad durante periodos de tiempo prologados, sin embargo, el equipo a utilizar posee un alto costo y no es recomendable en muestras que se necesitan utilizar con frecuencia. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.24)

➤ **Secado**

Este método es utilizado en el mantenimiento de cultivos de hongos, en donde se procede a la remoción del agua previniendo la rehidratación. Este método de desecación puede llevarse a cabo mediante el uso de suelo o arena, papel de filtro, tapones pre - secados, gelatina, sílica gel, perlas de vidrio y porcelana. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.26)

1.16.2. Métodos de conservación a largo plazo

➤ **Liofilización**

Es uno de los métodos más empleados debido a las ventajas que presenta, entre las más importantes resalta el tiempo de supervivencia prologando que alcanza una viabilidad de 50 años, además de que permite lograr una buena estabilidad del material liofilizado.

Se pueden conservar cultivos de bacterias, hongos, levaduras y algunos virus, pero su eficiencia se ve afectada en el mantenimiento de algas, protozoos, células animales y plantas. La laboriosidad del proceso y el precio del equipo de liofilización constituyen las principales desventajas del proceso. (Burguet, 2012: p.1)

➤ **Ultracongelación**

El método de ultracongelación a -140°C (Fase vapor) y -196°C (Fase líquida), se utilizado para mantener cultivos que no pueden ser preservados por ningún otro método. Uno de los riesgos que presenta el método es la pérdida del material biológico el cual puede disminuir mediante el uso de agentes crioprotectores y el control de variables como condiciones de crecimiento, congelación y descongelación.

Se considera un método económico, sin embargo, la evaporación del nitrógeno líquido predispone la pérdida completa de cultivos, además existe el riesgo de explosión de los viales. (Instituto de Biotecnología, 2016: p.36)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Según la característica del objeto de estudio: Cualitativo.

Según el periodo y secuencia de estudio: Transversal.

Según el análisis y alcance de resultados: Descriptivo y observacional.

2.2. Diseño de la investigación

Estudio no experimental, pues permite trabajar de manera directa con el objeto de estudio.

2.3. Unidad de análisis

Tres tipos de muestras: Leche cruda, leche pasteurizada en la quesera y leche pasteurizada en el laboratorio.

2.4. Localización del muestreo y población de estudio

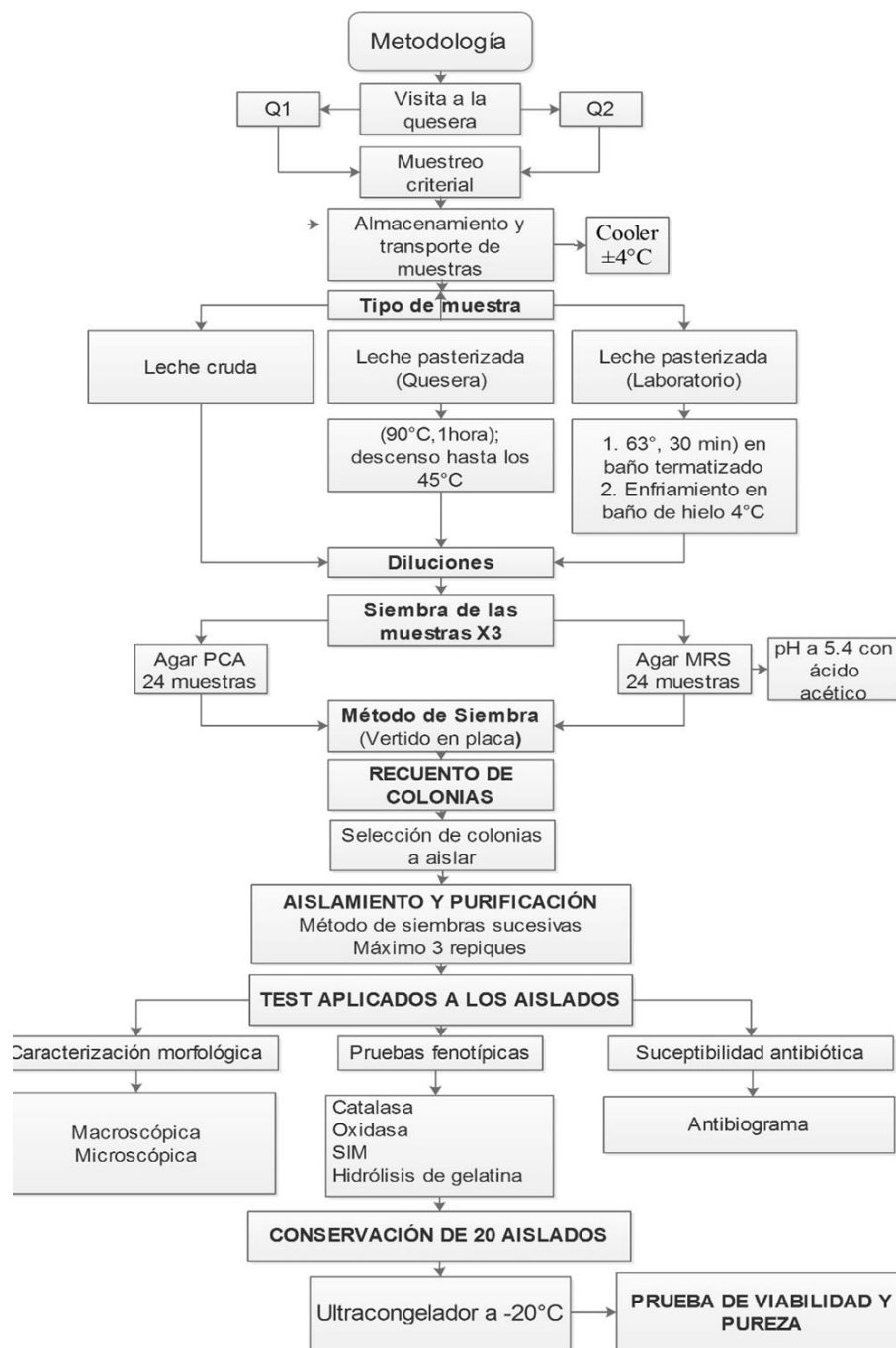
Leche utilizada para la elaboración de quesos frescos en dos Queseras codificadas Q1 y Q2 ubicadas en la parroquia rural de Quimiag, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

2.5. Lugar de la investigación

Las muestras recolectadas se analizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.6. Etapas de la investigación

En el siguiente esquema se muestra la metodología llevada a cabo durante la investigación



Realizado por: Gisela Ramos. 2018

2.7. Métodos y técnicas

En las queseras Q1 y Q2 ubicadas en la Parroquia Rural de Quimiag se realizó el recuento microbiológico de aerobios mesófilos y bacterias ácido lácticas termodúricas; de la leche utilizada para la elaboración de quesos frescos artesanales, las muestras obtenidas fueron recolectadas directamente de las marmitas a frascos estériles de vidrio de 200mL antes (leche cruda) y después del tratamiento térmico (leche pasteurizada), (Anexo A).

Posterior a la recolección, las muestras se almacenaron a una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ y se transportaron en un cooler hasta el Laboratorio de Biotecnología ubicado en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para los estudios microbiológicos.

2.8. Pre ensayos para determinar dilución y temperatura para el crecimiento de bacterias ácido lácticas y termodúricas

En la tabla 1-2 se dan a conocer los pre ensayos realizados para el recuento y verificación de microorganismos termodúricos, los cuales permitan crear un ambiente adecuado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas termodúricas.

Tabla 1-2: Pre ensayos utilizados en la investigación

Pre ensayo	Tipo de muestra	Medio	Tipo de siembra	de Capa sellante	pH	Incubación
1	Leche cruda	MRS	Superficie	No	(6.0 \pm 0.2)	37°C (3 días)
	Leche pasteurizada en laboratorio*	PCA	Superficie	No	(7.0 \pm 0.2)	
2	Leche pasteurizada en laboratorio*	MRS	Vertido en placa	No		(4.5)
			Superficie	No		
3	Leche cruda Leche pasteurizada en laboratorio*	MRS	Vertido en placa	Si (delgada)	(5.4)	30°C (5 días)
				Si (delgada)		37°C (3 días)
4	Leche pasteurizada en laboratorio*	MRS	Vertido en placa	Si (gruesa)	(5.4)	30°C (5 días)

Leche pasteurizada en laboratorio * shock térmico 63°C (30min) baño María termatizado; \downarrow 4°C baño de hielo.

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Una vez determinado que el cuarto pre ensayo es el adecuado para el crecimiento de bacterias termodúricas, se realiza los ensayos para recuento y posterior aislamiento e identificación con pruebas bioquímicas.

2.9. Preparación de Diluciones para la siembra en los medios de cultivo PCA, MRS

En la figura 2-2 se observan las diluciones utilizadas para el recuento de bacterias ácido lácticas

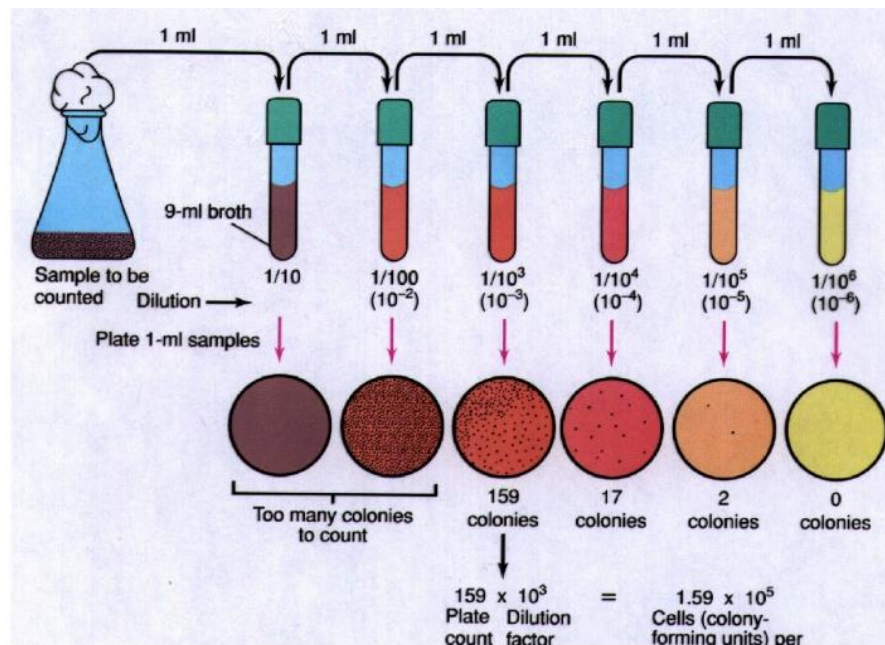


Figura 2-2: Técnica de diluciones.

Fuente: (Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General) p.48

A continuación, se describe el procedimiento utilizado:

- Se preparó tubos estériles con 9mL de agua peptonada
- Se homogenizó los frascos que contienen las muestras de la leche cruda, leche con tratamiento térmico de la quesera y tratamiento in vitro.
- Se tomó 1mL de leche cruda, leche pasteurizada en la quesera y leche pasteurizada en el laboratorio utilizando una micro pipeta automática para posteriormente agregar en los tubos con 9mL de agua peptonada estéril.
- Se mezcló con movimientos suaves cada uno de los tubos; obteniendo la primera dilución (10⁻¹).

- e) Se transfirió 1 mL de la primera dilución con la micro pipeta automática a otro tubo con 90mL de agua peptonada estéril, se homogenizó y se obtuvo la segunda dilución (10^{-2}).
- f) Se repitió este proceso hasta conseguir el número de diluciones requerido para cada tipo de muestra.

Tabla 2-2: Diluciones para Recuento de Bacterias Termodúricas

Muestra	Dilución
Leche cruda	10^{-6} , 10^{-7}
Leche con tratamiento térmico de la quesera	Directo, 10^{-1}
Leche con tratamiento in vitro en el laboratorio	Directo, 10^{-2}

Realizado por: Gisela Ramos, 2018.

2.10. Preparación de medios

2.10.1. Medio MRS

- 1) Se realizó los cálculos correspondientes dependiendo de los mL de medio a preparar, utilizando las indicaciones del envase.
- 2) Se pesó y se diluyó en agua destilada hasta conseguir una disolución completa.
- 3) Se llevó a ebullición hasta que el medio este totalmente clarificado.
- 4) Se acidificó el medio con Ácido acético hasta un pH de 5.4.
- 5) Se esterilizó en autoclave a 121°C (30 min) y 1 atm de presión.

2.10.2. Caldo MRS

- 1) Se realizó los cálculos correspondientes utilizando las indicaciones del envase.
- 2) Se pesó y se diluyó en agua destilada el caldo.
- 3) Se llevó a ebullición hasta obtener un caldo clarificado
- 4) Se distribuyó 3mL de caldo en cada tubo de ensayo de tapa rosca
- 5) Se esterilizó en autoclave a 121°C (30 min) y 1atm de presión. (Anexo C)

2.10.3. Agar PCA, SIM, Müller-Hinton

- 1) Se realizó los cálculos correspondientes dependiendo del volumen del medio a preparar, utilizando las indicaciones del envase.
- 2) Se pesó los gramos de cada medio y se diluyó completamente en agua destilada.
- 3) Se llevó a ebullición hasta lograr una clarificación completa del medio.
- 4) Se esterilizó en la autoclave a 121°C (30 min) y 1atm de presión.

2.11. Métodos de siembra

2.11.1. Siembra por inmersión o vertido en placa

Una vez preparado el agar y las diluciones necesarias se procede de la siguiente manera a la siembra por triplicado de la muestra a analizar bajo cámara de flujo:

- 1) Se tomó 1mL de la dilución correspondiente y se depositó en una caja petri previamente rotulada.
- 2) Se añadió 15 mL aproximadamente de estéril sobre la muestra.
- 3) Se dio ligeros movimientos circulares y de vaivén hasta que el inóculo y el agar se encuentren completamente homogéneos.
- 4) Se dejó secar y se añade una capa sellante de medio para garantizar el crecimiento de bacterias anaerobias como lo describe (Bianchi y Li 2010: p.2)
- 5) Se invirtió las cajas petri y se incubó a 30°C durante 5días (medio MRS), durante 2 días (medio PCA).

2.11.2. Siembra por punción

A continuación, se describe el método de siembra por punción (Aquihuatl, 2004: p.38)

- 1) Se preparó el medio utilizar y se colocó en tubos de ensayo tapa rosca.
- 2) Con ayuda de una aguja de inoculación se toma la muestra a sembrar y se inoculó en el medio antes preparado.
- 3) Se incubó los tubos y se reportó los resultados.

2.11.3. Siembra por estriamiento

Este método es utilizado para el aislamiento de microorganismos. A continuación, se describe su proceso: (Aquihuatl, 2004: p.40)

1. Se preparó el medio a utilizar y se rotuló previamente las cajas petri.
2. Se procedió a tomar la muestra con un asa de inoculación.
3. Se rozó con el aza la superficie del agar y se empezó a realizar movimientos en forma de estría.
4. Se rozó nuevamente la estría original y se hizo el segundo estriado.
5. Se repitió el proceso durante 4 o 5 veces, sin olvidar que la última estría debe ser más abierta en comparación con las anteriores.

2.12. Recuento de colonias (método de Recuento en placa)

Finalizado el tiempo de incubación se llevó a cabo el recuento de microorganismos termodúricos (Anexo B), por el conteo de colonias visibles en los medios de cultivo, para lo cual se anotó el número de colonias contadas y la dilución correspondiente. En el reporte de las mismas se consideró tanto la dilución de la muestra como el número de colonias contadas. (Camacho et al. 2009: p.9)

2.13. Aislamiento de cepas bacterianas

Las cepas obtenidas en medio MRS fueron aisladas de acuerdo a criterios de selección como forma, color, tamaño, elevación, bordes (Delgadillo, González y Hernández, 2002: p.9); a continuación, con ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia y se realizó siembras sucesivas por el método de estriamiento, para luego ser incubadas en jarras GasPak durante 5 días a 30°C; finiquitado el tiempo de incubación se eligió la colonia más aislada y se procedió a realizar la caracterización fenotípica.

Este proceso se ejecutó tres veces hasta obtener aislados puros de bacterias ácido lácticas termodúricas mediante resiembras sucesivas en medio MRS por estriado (Anexo D).

2.14. Características fenotípicas

2.14.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica de las cepas aisladas se realizó mediante la observación directa de las colonias considerando características como el borde, color, elevación, forma y tamaño. (Delgadillo, González y Hernández, 2002: p.9)

2.14.2. Caracterización microscópica

La caracterización microscópica se realizó mediante la observación en microscopio utilizando la tinción diferencial de Gram, para lo cual se realizó un frotis de la colonia bacteriana previamente aislada. A continuación, se describe la metodología utilizada en la Tinción diferencial Gram. (Anexo F)

- 1) Se colocó una gota de azul de metileno sobre la placa portaobjetos y se dejó actuar durante 1 minuto.
- 2) Se lavó con agua destilada y se colocó una gota de Lugol durante 1 minuto.
- 3) Se lavó nuevamente con agua destilada y se colocó una gota de alcohol acetona y se dejó actuar por 30 minutos.
- 4) Se lavó con agua destilada y se agregó una gota de safranina y se dejó actuar por 1 minutos
- 5) Se lavó y se dejó secar la placa portaobjetos.
- 6) En el portaobjetos seco se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio óptico con lente de 100X.

2.14.3. Caracterización bioquímica

Prueba de Catalasa

Para la determinación de catalasa se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la colonia previamente aislada e inmediatamente se observó si existe o no el desprendimiento de burbujas.

La prueba se reporta como positiva cuando se evidencia la presencia de burbujas; caso contrario el resultado es negativo. (Anexo E)

Prueba de Oxidasa

Utilizando un asa de siembra se tomó una colonia previamente aislada y fresca para colocarla sobre la tira reactiva de oxidasa. Si se observa una coloración morada dentro de los 30 segundos se reporta como positivo; sin embargo, si la tira reactiva mantiene su color blanco original su resultado es negativo. (Anexo E)

Prueba Sulfuro Indol Motilidad (SIM)

Una vez preparado el medio SIM y correctamente rotulados los tubos de ensayo tapa rosca, con ayuda de una aguja de inoculación se tomó una colonia aislada y se procedió a inocular en un tubo; para luego ser incubado a 35°C durante 48 horas. Una prueba SIM se considera positiva cuando el crecimiento no se limita a la zona de inoculación, sino que tiende a crecer en todo el medio.

A su vez, la producción de indol se evidenció mediante la adición de algunas gotas del reactivo de Kovacs sobre el cultivo. (Anexo G)

2.14.4. Prueba de hidrólisis de gelatina

Se preparó agar gelatina utilizando las indicaciones de preparación; con ayuda de una aguja de inoculación se tomó una muestra de la cepa aislada y se inoculó en los tubos con agar gelatina utilizando el método de punción. A continuación, se incubó a 35°C durante el lapso de 2 días.

Para realizar la lectura de las pruebas se sometieron los tubos a una temperatura de 4°C durante dos horas y se observó si evidencia o no la hidrólisis del medio.

2.14.5. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó con un cultivo fresco y puro de cada cepa bacteriana previamente aislada; en donde se preparó un cultivo overnight hasta que la turbidez llegue a la escala de 0,5 MacFarland. Con ayuda de un hisopo estéril se sembró en las cajas petri con medio MRS utilizando la técnica de Kirby-Bauer. Posterior a la siembra se colocó los discos de sensibilidad de los diferentes antibióticos y se incubó a 37°C (48 horas). Finalmente, para el reporte de resultados se midió el halo de inhibición (Anexo 10).

2.15. Conservación de cepas bacterianas

La técnica de conservación de las bacterias aisladas en la leche se detalla a continuación: (Anexo I)

Se preparó por cada cepa aislada un erlenmeyer con caldo MRS y una solución de glicerol al 30%, los mismos que fueron esterilizados a 121°C (15min) y a 1 atm de presión en autoclave de vapor húmedo. Posterior a esto se inoculó una colonia bacteriana aislada en el caldo para realizar un cultivo overnight a 33°C.

El cultivo overnight se agregó sobre la solución estéril de glicerol al 30% y con movimientos leves se agitó hasta lograr una completa homogenización; finalmente se distribuyó en tubos eppendorf previamente rotulados y se conservó en un ultracongelador a -20°C para su mantenimiento.

2.16. Reactivación de cepas bacterianas mantenidas por el método de congelación ordinaria a -20°C

Para corroborar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas termodúricas preservadas se reactivó las cepas con el procedimiento que se detalla a continuación:

Los tubos eppendorf completamente sellados fueron retirados del ultracongelador, antes de proceder a la recuperación de las cepas se esperó que los tubos estén completamente descongelados. Posterior a y esto con ayuda de un asa de siembra se inoculó cada cepa en tubos con caldo MRS previamente

preparado y esterilizado. Finalmente se incubó a 33°C (dos días) para su posterior siembra en medio MRS para su recuento.

2.17. Prueba de Viabilidad

Para llevar a cabo la prueba de viabilidad se siguió el siguiente procedimiento que se detalla a continuación: (Anexo H)

Se preparó 900µL de agua peptonada en viales eppendorf y se esterilizó a 121°C (15min) a 1 atm de presión. Se realizó además las diluciones necesarias de las bacterias reactivadas utilizando agua peptonada. La siembra se realizó de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} , se sembró 100 µL de muestra en medio MRS por el método de vertido en placa. Se incubó a 30°C por 3 días; por último, se realizó el recuento y el correspondiente reporte de los resultados.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recuentos bacterianos

En la tabla 1-3 se observa los resultados del recuento de aerobios mesófilos en medio PCA de la leche cruda, pasteriza en la quesera y pasterizada en el laboratorio de las muestras obtenidas en las queseras Q1 y Q2.

Tabla 1-3: Recuento de Aerobios mesófilos en medio PCA

Quesera	MUESTRAS											
	Leche cruda				Leche con Tratamiento realizado en la quesera				Leche con Tratamiento realizado en el laboratorio*			
	MUESTREO			MAX**	MUESTREO			MAX***	MUESTREO			MAX***
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Q1	9,19	7,80	8,02	6,17 log	0,00	2,12	2,88	4,69 log	1,56	3,87	3,79	4,69 log
	±	±	±		±	±	±		±	±	±	
Q2	0,01	0,28	0,06	UFC/mL	0,00	0,23	0,17	UFC/mL	0,31	0,18	0,30	UFC/mL
	±	±	±		±	±	±		±	±	±	
	0,16	0,25	0,05		0,07	0,22	0,00		0,05	0,37	0,51	

Leche pasterizada (laboratorio)*: 63°C durante 30min, enfriamiento a 4°C en baño de hielo
 ** NTE INEN 009:2015
 *** NTE INEN 10:2012

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

El recuento de este grupo de microorganismos da a conocer la calidad higiénica de un alimento por lo que son utilizados como indicadores de calidad higiénico – sanitaria (Campuzano F. et al. 2015 p.3), de acuerdo a los recuentos encontrados en la leche cruda de los tres muestreos se evidencia claramente como sobrepasan el límite permisible (6,17 log UFC/mL) establecido por la Norma NTE INEN 009:2015

El recuento elevado de aerobios mesófilos podría deberse a las deficientes prácticas de higiene en la manipulación del ganado durante el ordeño, además una refrigeración y almacenamiento inadecuado después de que esta ha sido obtenida. (Marcela et al. 2016, p. 81)

De acuerdo a la investigación realizada y los resultados obtenidos por (A. Díaz et al. 2016, p. 3) se puede afirmar que una leche cruda con un alto recuento de microorganismos afecta directamente la inocuidad de la leche pasteurizada, desencadenando un problema de salud pública puesto que mediante tratamientos de pasteurización los recuentos de estos microorganismos disminuyen pero no en su totalidad, por lo que es imprescindible mejorar los protocolos de limpieza dentro de las instalaciones de estas queseras.

La leche pasteurizada en el laboratorio (tratamiento de 63°C durante 30min y luego enfriamiento hasta los 4°C en baño de hielo) y la leche pasteurizada en quesera mostraron recuentos que se encuentran dentro de los límites permisibles establecidos por la norma NTE INEN 10:2012. Sin embargo, hay que considerar que esta última recibe un tratamiento más drástico que va desde los 90°C y desciende hasta los 65°C.

Cabe mencionar que un tratamiento térmico aplicado a la leche con temperaturas y tiempos prolongados puede modificar el color, sabor, nutrientes, estabilidad de la solución coloidal y la emulsión de la grasa, afectando no solo su valor nutricional sino también su aspecto físico. (Sarriá 2008, p. 19)

3.1.1. Recuento de bacterias ácido lácticas en medio MRS

Las bacterias ácido lácticas constituyen la microbiota natural de la leche y son importantes en el proceso de elaboración del queso por su capacidad acidificante y por sus atributos de sabor y aroma. De ahí que consideramos interesante el estudiar su capacidad de sobrevivir al tratamiento térmico que se aplica en la elaboración de quesos artesanales.

Para la recuperación de bacterias ácido lácticas a partir de la leche usada para la elaboración de quesos artesanales se empleó el medio Man Rogosa Sharpe como medio selectivo para *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas. Este medio posee cofactores que fortalece a estas bacterias, pero por su pH e

inhibidores añadidos puede afectar negativamente el crecimiento de otros microorganismos. (Laboratories 2015, p1). En la tabla 2-3 se presentan los resultados de los recuentos de bacterias ácido lácticas termodúricas en medio MRS de las muestras obtenidas en las queseras Q1 y Q2, y el porcentaje de reducción alcanzado.

Tabla 2-3: Recuento de bacterias ácido lácticas en medio MRS

Quesera	MUESTRAS										% reducción LPQ****	% reducción LPL*****
	Leche cruda			Leche con Tratamiento realizado en la quesera			Leche con Tratamiento realizado en el laboratorio*					
	MUESTREO			MUESTREO			MUESTREO					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Q1	0,845	0,871	0,865	0,250	0,230	0,629	0,52	0,670	0,417	57%	38%	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
Q2	1,41	0,62	0,21	0,14	0,43	2,09	0,00	0,46	0,83	89%	57%	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
	0,845	0,870	0,854	0,18	0,107	0,000	0,30	0,427	0,377			
	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
	1,41	0,57	0,20	0,71	0,14	0,00	3,54	0,47	1,21			

Tratamiento realizado en el laboratorio*: (63°C durante 30 min, enfriamiento a 4°C en baño de hielo)

LPQ**** Leche pasteurizada en quesera

LPL***** Leche pasteurizada en laboratorio

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Las bacterias termodúricas son utilizadas en la industria como marcadores de calidad higiénico-sanitaria, por lo que su presencia en leche es producto de una inadecuada higiene durante el ordeño (Marcela et al. 2016). Al existir factores favorables como: tiempo de generación corto y temperatura de reproducción óptima una bacteria puede convertirse en un millón de bacterias en 0.5h, dando como resultado alimentos altamente perecederos, por lo que es necesario detener este proceso. (Zavala 2013, p 2).

También existen géneros de microorganismos termodúricos de gran importancia dentro de la industria alimentaria tales como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus*; entre algunos de ellos los géneros *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium* (Ogueke, 2010), pueden ser utilizados como probióticos debido a los beneficios que

brinda en el ser humano y animales. (Sánchez et al. 2011, p 1); además contribuyen significativamente en las características sensoriales (Ramírez et al. 2011, p. 3), valor nutricional y propiedades terapéuticas. (Parra Huertas 2010; p.93).

En cuanto al porcentaje de reducción de los microorganismos termodúricos en la tabla 2-3 se aprecia que el mayor porcentaje correspondió a las muestras Q1 (57%) y Q2 (89%); pudiendo atribuirse a que el tratamiento recibido en las queseras sobrepasa la temperatura de 63°C y por un tiempo que supera al de tratamiento en el laboratorio. Además, el tratamiento en las queseras no aplica choque térmico, tratamiento drástico que reduce de manera considerable la carga microbiana nativa patógena y benéfica (Victoria-León et al. 2006, p.135), reduciendo tanto las características nutritivas y sensoriales del producto final.

Estos resultados no son alentadores considerando que las bacterias ácido lácticas son utilizadas en la industria de alimentos no solamente por su habilidad para acidificar sino también por su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados.

3.2. Caracterización morfológica de bacterias ácido lácticas termodúricas

En general las características de las colonias bacterianas ocurren en diversos grados y combinaciones debido a que poseen medida, forma, textura y color característico dependiendo del medio en el que se encuentran, de la especie bacteriana y bajo las condiciones a las que se encuentran sometidas; es por esto que son utilizadas para la identificación bacteriana. En la tabla 3-3 se muestran los resultados de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los aislados obtenidos a partir de leche cruda que se utiliza en la elaboración de queso.

Tabla 3-3: Morfología macro y microscópica de los aislados de BAL

N° de aislado	Código	Morfología macroscópica						Morfología Microscópica
		Forma	Color	Elevación	Tamaño	Superficie	Borde	Tinción Gram
1	2M	Circular	blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	COCOS (+) no esporulados
2	3M	Circular	blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
3	LCFC1	Circular	blanca	Convexa	3 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
4	LCFC3	Circular	blanca	Convexa	3,5 mm	Lisa	Regular	BACILOS (-) no esporulados
5	LCT1	Circular	blanca	Convexa	3 mm	Lisa	Regular	BACILOS (-) no esporulados
6	LCT3	Circular	blanca	Convexa	3 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
7	UM1	Irregular	blanca	Plana	6 mm	Lisa	Irregular	COCOS (+) no esporulados
8	UM14	Circular	blanca	Convexa	1,5 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
9	UM15	Circular	blanca	Convexa	1,5 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
10	UM17	Circular	blanca	Convexa	3,5mm	Lisa	Regular	COCOS (+) no esporulados
11	UM18	Circular	blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
12	UM19	Circular	blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
13	UM20	Circular	blanca	Convexa	3 mm	Lisa	Regular	COCOS (+) no esporulados
14	UM21	Circular	blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
15	UM22	Circular	blanca	Convexa	2,5 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
16	UM23	Circular	Blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
17	UM5	Circular	Blanca	Convexa	1,5 mm	Lisa	Regular	COCOS (+) no esporulados
18	UM6	Circular	Blanca	Convexa	2 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados
19	UM8	Circular	Blanca	Convexa	1,5 mm	Lisa	Regular	COCOS (+) no esporulados
20	UM9	Circular	Blanca	Convexa	2,5 mm	Lisa	Regular	BACILOS (+) no esporulados

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

De acuerdo a la evaluación realizada se encontró que el 95% (19/20) de aislados posee características típicas pertenecientes a las bacterias ácido lácticas como lo describe (Samaniego Fernandez Luz M. 2010; p.4). Estas colonias presentaron bordes enteros, regulares con superficie lisa y forma convexa (Figura 1-3), mientras que el 5% (1/20) de los aislados no poseen estas características (Figura 2-3).



Figura 1-3: Colonias de borde regular

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

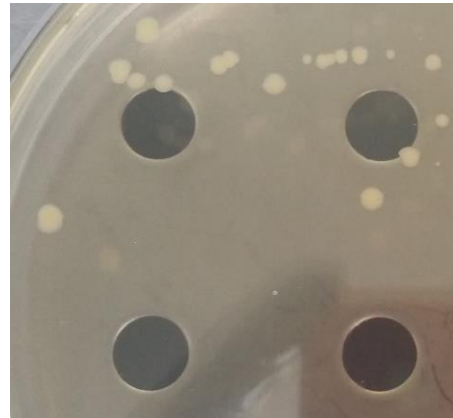


Figura 2-3: Colonias de borde irregular

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

La taxonomía de la mayoría de estos microorganismos los describe como cocos y bacilos Gram positivos (Ortíz, 2006. p. 13); de acuerdo a la tinción Gram se realizada en cada una de los aislados, se evidenció la presencia (Figura 4-3) del 60% (12/20) de bacilos Gram positivos, (Figura 5-3) del 10% (2/20) de bacilos Gram negativos y (Figura 3-3) un 30% (6/20) de cocos Gram positivos.

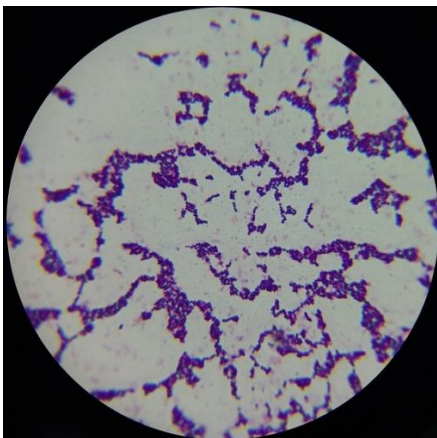


Figura 3-3: Cocos Gram positivos.

(Aumento 100x)

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

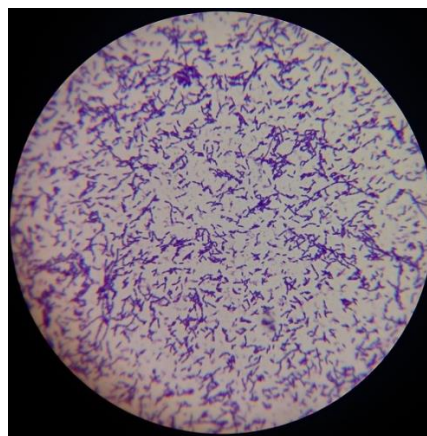


Figura 4-3: Bacilos Gram positivos

(Aumento 100x)

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

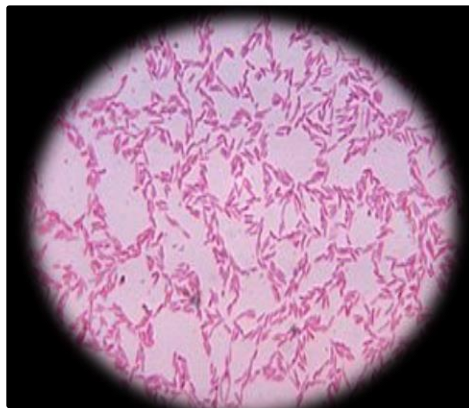


Figura 5-3: Bacilos Gram negativos

(Aumento 100x)

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

3.3. Caracterización Fenotípica

Ensayos metabólicos tales como catalasa, oxidasa, SIM, hidrólisis de gelatina contribuyen a la caracterización de los microorganismos. A continuación, en la Tabla 4-3 se encuentran los resultados de estas pruebas.

Tabla 4-3: Pruebas Fenotípicas de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas

N°	CÓDIGO	CATALASA	OXIDASA	SIM	INDOL	H. GELATINA
1	2M4	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
2	3M4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	LCFC1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	LCFC3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	LCT1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	LCT3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	UM1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	UM14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	UM15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	UM17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	UM18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	UM19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	UM20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

14	UM21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	UM22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	UM23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	UM5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	UM6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	UM8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	UM9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Realizado por: Gisela Ramos, 2018

El 100% (20/20) de los aislados fueron catalasa y oxidasa negativas, característica típica de las bacterias ácido lácticas, no obstante existen algunas cepas atípicas capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno (Samaniego Fernandez Luz M. 2010 p.4).

A su vez estas bacterias pueden ser móviles o muy poco móviles debido a la presencia de flagelos en su estructura (Ortíz, 2006 p. 12); el 95% (19/20) de los aislados de este estudio no presentaron movilidad mientras que el 5% (1 fueron móviles).

Ningún aislados produjo indol ni hidrolizó la gelatina, coincidiendo con lo mencionado por (Samaniego Fernandez Luz M. 2010; p.4).

3.4. Susceptibilidad antibiótica

El uso de antibióticos dentro de la medicina veterinaria y humana supone gran importancia en el tratamiento de infecciones de origen bacteriano; sin embargo, existe preocupación por el rastro que estos dejan debido a su excreción a través de leche y carne; generando problemas en procesos tecnológicos y en salud pública. (Mora y García 2007; p. 44)

Los alimentos como el queso elaborados con leche que contiene rastros de antibióticos muestran un sabor ligeramente amargo y una consistencia esponjosa (Mora y García 2007; p. 49); provocando que este se convierta en un producto desagradable para el consumidor, al ser el queso un producto agroindustrial es susceptible de la contaminación con antibióticos. De ahí el interés de realizar este ensayo en el presente estudio. Adicionalmente muchas bacterias pueden presentar una resistencia intrínseca a determinados antibióticos, lo cual puede ser un rasgo característico.

Para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana no se utilizó e Agar Müller Hinton especificado por el CLSI debido a que no sustentó el crecimiento de BAL, en su lugar se empleó el Agar MRS.

En la tabla 5-3 se aprecian los resultados de la prueba de susceptibilidad a antibióticos utilizada como una prueba de caracterización, en la misma se puede visualizar que la reacción ante los antibióticos expuestos es diferente.

Tabla 5-3: Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio MRS

N°	CÓDIGO	ZONA DE INHIBICIÓN (mm)									
		Eritromicina 15mcg		Gentamicina 10mcg		Vancomicina 30mcg		Amoxicilina 25mcg		Tetraciclina 30mcg	
1	2M4	S	40 ± 0,58	R	10 ± 0,71	R	0 ± 0,00	S	30 ± 1,00	S	32 ± 0,58
2	3M4	S	40 ± 0,58	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	40 ± 0,58	S	30 ± 0,00
3	LCFC1	S	38 ± 1,00	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	46 ± 0,58	S	32 ± 0,58
4	LCFC3	S	40 ± 0,58	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	30 ± 0,58	S	35 ± 0,58
5	LCT1	S	38 ± 0,58	I	13 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	40 ± 0,00	S	32 ± 0,00
6	LCT3	S	40 ± 0,00	R	8 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	36 ± 0,58	S	26 ± 0,58
7	UM1	S	36 ± 1,00	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	36 ± 0,58	S	30 ± 0,58
8	UM14	S	40 ± 0,58	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	44 ± 0,58	R	0 ± 0,00
9	UM15	S	34 ± 1,00	S	30 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	46 ± 0,58	S	32 ± 0,00
10	UM17	S	44 ± 1,53	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	48 ± 0,58	S	40 ± 0,58
11	UM18	S	32 ± 1,53	R	10 ± 0,44	R	0 ± 0,00	S	46 ± 0,00	S	34 ± 0,58
12	UM19	S	36 ± 1,00	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	44 ± 0,00	S	30 ± 0,00
13	UM20	S	36 ± 1,00	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	46 ± 1,53	S	33 ± 0,58
14	UM21	S	37 ± 1,15	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	44 ± 0,58	S	32 ± 0,58
15	UM22	S	40 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	14 ± 1,15	S	50 ± 0,58	S	36 ± 1,15
16	UM23	S	34 ± 0,58	R	10 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	44 ± 0,58	S	32 ± 0,58
17	UM5	S	34 ± 1,00	R	12 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	46 ± 0,00	S	36 ± 0,58
18	UM6	S	30 ± 1,00	R	0 ± 0,00	R	0 ± 0,00	S	46 ± 0,00	S	34 ± 0,58
19	UM8	S	30 ± 1,00	R	12 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	30 ± 0,58	S	28 ± 1,00

20	UM9	S	32 ± 0,58	R	7 ± 0,58	R	0 ± 0,00	S	43 ± 0,58	S	24 ± 0,58
S: Sensible I: Intermedia sensibilidad R: Resistente											

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

De acuerdo a los resultados obtenidos; el 100% (20/20) de los aislados presentaron alta sensibilidad a eritromicina, amoxicilina y solo un aislado (19/20) es resistente a tetraciclina; lo que coincide con los estudios realizados por (Zhou et al. 2005; p.214), evidenciándose que a pesar de ser antibióticos muy utilizados en veterinaria y de su presencia residual en leche y carne, el ganado de esta zona no posee una resistencia a estos antibióticos.

Estas bacterias también mostraron el 90% (18/20) de resistencia a gentamicina. Sin embargo, el 10% (2/20) de aislados aún son sensibles, resultados similares se a lo mencionado por (Blandino, Milazzo y Fazio 2008; p.6) que encontraron una resistencia del 100% a este antibiótico en ganado bovino.

Otros estudios realizados por (Blandino, Milazzo y Fazio 2008; p.6) y (Ma et al. 2017; p. 11) revelan una resistencia de bacterias ácido lácticas a vancomicina en un 79 y 63% respectivamente. En este estudio se evidenció una resistencia del 99% (19/20); indicando una resistencia intrínseca a este antibiótico.

Todos los resultados de susceptibilidad frente a estos dos últimos antibióticos se explicarían por el hecho de la transferencia horizontal de genes que puede ocurrir entre diferentes especies e inclusive diferentes géneros de bacterias.

3.5. Conservación bacteriana

Con la finalidad de realizar estudios posteriores de las bacterias ácido lácticas aisladas se realizó el proceso de conservación bacteriana de 20 aislados (10 viales por cada aislado), los mismos que fueron sometidos a un proceso de conservación ordinaria por congelación a -20°C . Estos aislados fueron caracterizados morfológica y fenotípicamente. El agente crioprotector utilizado fue el glicerol debido a que su efector protector resulta en la disminución de la concentración de solutos por competencia. (Instituto de Biotecnología.2016)

A continuación, en la Tabla 6-3 se dan a conocer los resultados de pureza y viabilidad realizados, posteriores al proceso de conservación bacteriana.

Tabla 6-3: Prueba de Viabilidad y Pureza

N°	FECHA	ORIGEN	CÓDIGO	VIABILIDAD UFC/mL	TINCIÓN GRAM
1	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11C+	$2,83 \times 10^6$	COCOS (+)
2	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+	$4,086 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
3	09/06/2017	QUESERA 2	BALT11B-	$3,23 \times 10^{12}$	BACIOS (-)
4	12/06/2017	QUESERA 1	BALT11B+PE	$8,91 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
5	05/07/2017	QUESERA 1	BALT11B+3M	$2,67 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
6	12/07/2017	QUESERA 1	BALT11C+UM5	$102,2 \times 10^6$	COCOS (+)
7	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11C+UM	$22,7, \times 10^6$	COCOS (+)
8	12/07/2017	QUESERA 1	BALT11C+UM1	$62,4 \times 10^6$	COCOS (+)
9	23/06/2017	QUESERA 2	BALT11C+2M	$4,54 \times 10^{11}$	COCOS (+)
10	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM22	$1,19 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
11	12/07/2017	QUESERA 1	BALT11C+UM8	$1,135 \times 10^{12}$	COCOS (+)
12	09/07/2017	QUESERA 2	BALT11B-PE	$2,27 \times 10^{12}$	BACILOS (-)
13	12/07/2017	QUESERA 1	BALT11B+UM9	$1,476 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
14	09/07/2017	QUESERA 1	BALT11B+PE1	$3,405 \times 10^{11}$	BACILOS (+)
15	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM14	$2,27 \times 10^{12}$	BACILOS (+)
16	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM21	$2,55 \times 10^{12}$	BACILOS (+)

17	12/07/2017	QUESERA 1	BALT11B+UM6	1,362x10 ¹²	BACIOS (+)
18	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM23	1,70x10 ¹²	BACILOS (+)
20	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM18	7,945x10 ¹¹	BACILOS (+)
21	12/07/2017	QUESERA 2	BALT11B+UM15	1,589x10 ¹²	BACILOS (+)

Realizado por: Gisela Ramos. 2018

Para demostrar que el método aplicado se llevó a cabo de manera adecuada se realizó la recuperación de las bacterias en donde se demostró que a los ocho días de finalizada la conservación a una dilución de 10⁻⁷ el número de UFC/mL supera una concentración de 10⁵ UFC/mL (Leal y Ramírez, 2005: p.5). Sin embargo, el éxito de una conservación depende de la especie bacteriana, es así que se estima que las BAL termodúricas conservadas puedan permanecer viables un período comprendido entre seis meses a un año.

También se elaboró una base de datos bajo un código de identificación en formato físico y digital que permita un adecuado manejo de la información de cada aislado mantenido desde el momento de su conservación.

CONCLUSIONES

1. No fue posible realizar la identificación de bacterias ácido lácticas termodúricas por limitaciones de recursos económicos asociadas al proyecto; sin embargo, se elaboró el banco de cepas que a futuro permitirá el cumplimiento de este objetivo.
2. El incumplimiento de los criterios microbiológicos de la norma NTE INEN 009: 2015 sobre el recuento de aerobios mesófilos en leche cruda sugiere deficiencias en la higiene y en la aplicación de protocolos de limpieza dentro de las queseras Q1 y Q2, en contraste, los niveles de aerobios mesófilos en la leche con tratamiento térmico en las queseras y en el laboratorio si cumplen con la normativa nacional debido a que los tratamientos térmicos empleados disminuyen la carga microbiana corroborando que la pasteurización es un tratamiento higienizante de la leche que asegura su inocuidad aunque disminuya las características sensoriales de un queso.

De otro lado el tratamiento térmico en las queseras pese a la falta de choque térmico redujo más la carga microbiana de BAL en leche respecto a la pasteurización en el laboratorio, lo cual explicaría las características (sabor, aroma) menos acentuados en quesos elaborados con este tipo de leche.

3. Los aislados puros revelaron características macro y microscópicas con alta similitud a cepas típicas de bacterias ácido lácticas, por lo cual se procedió a la preservación para posteriores estudios.
4. En el mismo sentido los ensayos fenotípicos aplicados revelaron algunas capacidades metabólicas que puede concordar con sus características genéticas.
5. La preservación ordinaria en ultracongelador a -20°C de los aislados de BAL y el control del procedimiento garantiza la viabilidad y pureza del banco, así como su integridad durante un año.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el estudio y realizar una secuenciación molecular del gen 16S rRNA o el Analytical Profile Index (API) para poder identificar los aislados que no pudieron ser identificadas en este trabajo de investigación.

Se debe tener precaución con el ácido acético utilizado para acidificar el medio MRS, puesto que el mismo tiene una vida útil de 15 días luego de preparada la solución.

Se sugiere realizar pruebas que confirmen que las bacterias ácido lácticas termodúricas aisladas poseen una susceptibilidad intrínseca a antibióticos como gentamicina y vancomicina.

Debido a que el mantenimiento que se llevó a cabo es una conservación bacteriana a corto plazo (congelación ordinaria -20°C) es necesario que se realice un oportuno mantenimiento de las cepas bacterianas cada cierto tiempo para garantizar su viabilidad para posteriores investigaciones.

Para una mayor estabilidad de los aislados se sugiere emplear la liofilización como método de conservación.

BIBLIOGRAFÍA

- AQUIAHUATL, M. de los A. y CHABELA, M. de L.P.** *Manual de practicas del laboratorio general de Microbiología.* 2004, S.l.: s.n. ISBN 9703101410.
- ARGUELLO P., et al.** Calidad Microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba. *Revista Perspectiva*, 2015, pp. 65-74.
- BERNAL R., M. y GUZMÁN, M.** El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 1984, [en línea], vol. 4, no. 3-4, pp. 112. ISSN 0120-4157. DOI 10.7705/biomedica.v4i3-4.1891. Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>.
- BIANCHI, F. y II, E.** Siembra Y Recuento De Microorganismos. 2010 , vol. 1, pp. 1-40.
- BLANDINO, G., MILAZZO, I. y FAZIO, D.** Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2008, vol. 20, no. 4, pp. 199-203. ISSN 0891060X. DOI 10.1080/08910600802408111.
- BROOKS, G.F., et. al.** *Microbiología Médica.* 2011, S.l.: s.n. ISBN 978-607-15-0503-3.
- BURGUET, N., SIERRA, N. y BRITO, L.** Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2012, vol. 43, no. 3, pp. 1-4.
- CAMACHO, et.al.** Técnica de recuento en placa. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 2009, pp. 1-10.
- CAMPUZANO F., et. al.** Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Determination of microbiological and sanitary quality of prepared food sold in the street of the city of Bogota, D.C., 2015*, [en línea], vol. 13, no. 23, pp. 81-92. ISSN 17942470. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a08.pdf%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=109036498&lang=es&site=ehost-live>.
- CARMONA SOLANO, G. y VINDAS, S.** Uso racional de medicamentos veterinarios en ganado bovino. *Corfoga*, 2006, [en línea], pp. 60. Disponible en: <http://www.corfoga.org/pdf/UsorRacionalMedicamentos.pdf>.

- COOREVITS, A., et.al.** Bacillus thermolactis sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of bacillus thermoamylovorans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, vol. 61, no. 8, pp. 1954-1961. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijms.0.024240-0.
- DELGADILLO, A., GONZÁLEZ, V.S. y HERNANDEZ, M.** Morfología de las colonias bacterianas. *Comunicacion Breve*, 2002, pp. 5.
- DOMÉNECH, A. y GARCÍA, E.** Medios de Cultivo. 2009, [en línea]. S.l.: s.n., Disponible en: [http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1 Medios de cultivo.pdf](http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf).
- DOMINGUEZ-LOPEZ, A., et.al.** Alimentos artesanales y tradicionales: El queso Oaxaca como un caso de estudio del centro de Mexico. (Artisan-Made and Traditional Fgoods: The Oaxaca Fresh Cheese as Study Case in Central Mexico. With English summary.). *Estudios Sociales*, 2011, [en línea], vol. 19, no. 38, pp. 165-193. ISSN 01884557. Disponible en: <http://www.ciad.mx/coordinaciones/desarrollo-regional/revista-estudios-sociales/numeros-revista-electronica.html%5Cnhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ecn&AN=1301765&site=ehost-live&scope=site>.
- FERNÁNDEZ OLMOS, A., et. al.** Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2010, vol. 37, no. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, pp. 1-28. ISSN 0213005X. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
- GLEESON, D., O'CONNELL, A. y JORDAN, K..** Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 2013, vol. 52, no. 2 SPEC. ISSUE 2, pp. 217-227. ISSN 07916833.
- GONZÁLEZ, G.** Microbiología. *Microbiología*, 2015, [en línea]. S.l.: Universidad Autónoma de Nueva León, pp. 22. Disponible en: http://www.medicina.uanl.mx/microbiologia/wp-content/uploads/2015/05/Programa_de_Microbiologia_a_MCP_sem_Ene-Jul_2015_v3.pdf.
- GONZÁLEZ, G., MOLINA, B. y COCA, R.** CALIDAD DE LA LECHE CRUDA. *Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz*. 2010, Veracruz
- GROUP, M.** Mueller Hinton Agar. 2017a

GROUP, M. Plate Count Agar. , 2017b

INEN 0010. Leche pasteurizada. Requisitos. *Octubre, 2012*, [en línea], vol. 10. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0010.2012.pdf>.

I NEN 009. Leche Cruda: Requisitos. , 2012, vol. 9, pp. 9.

INEN 1528. Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos. *Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos, 2012*, [en línea], vol. 1528, pp. 1-11. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>.

INEN 2395, 2011. Leches Fermentadas. Requisitos. ,

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA. Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias ,hongos y levaduras. 2016, pp. 1-30.

LABORATORIES, H. Lactobacillus MRS Agar M641I. *HiMedia - Technical Data, 2015*, [en línea], Disponible en: <http://www.himedialabs.com/TD/M641I.pdf>.

LEAL, L.C.S. y RAMÍREZ, L.C.C. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 2005, [en línea], vol. 3, no. 4, pp. 21-29. ISSN 1794-2470. DOI ISSN: 1794-2470. Disponible en: <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/42/83>.

LEÓN, L., LUIS, A. y MEJÍA, F. Aseguramiento de la inocuidad de leche cruda y pasteurizada en el departamento de Caldas Safety assurance of raw and pasteurized milk in the department of Caldas. *Agronomia colombiana, 2016*, [en línea], vol. 34, pp. 984-989. DOI 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58203. Disponible en: <http://iicta.com.co/wp-content/uploads/2017/02/984D092.pdf>.

LIRA, Q.F.B.L.B., et.al. Atlas de Microbiología. , 2003, pp. 1-175.

LÓPEZ-HONTANGAS, J.L., CASTILLO, F.J. y SALAVERT, M. Técnicas de identificación. *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico, 2007*, [en línea], pp. 27-41. Disponible en: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>.

MA, Q., et.al. Antimicrobial resistance of Lactobacillus spp. from fermented foods and human gut. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, vol. 86, pp. I. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2017.07.059.

- MAGARI, H.** PRODUCCIÓN HIGIÉNICA DE LA LECHE CRUDA. 2000, Chile:
- MARCELA, M., et.al.,** 2016. Evaluación de la calidad de la leche cruda recibida en industrias lácteas de Manizales. 2016 , vol. 11, no. 1, pp. 75-84.
- MEDINA, M.** Medios de Cultivo. *Revista de Investigación*, 2012 [en línea], vol. 2, no. 4, pp. 1-42. Disponible en: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>.
- MORA, N. y GARCÍA, A.** Susceptibilidad De Bacterias Ácido Lácticas (Bal) Frente a Diversos. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 2007, pp. 127.
- MORENO, E.** Evaluación de microorganismos termodúricos y principales fuentes de contaminación en el Tambo. 2011, Universidad de la República.
- NICHOLSON, L., et.al.** Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology nd Molecular Biology Reviews*, 2000, [en línea], DOI 10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000.Updated. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/26/5/1027.full.pdf>.
- ORTÍZ, A. y MARTÍNEZ, M.** Inocuidad Alimentaria. *Conexión Agropecuaria JDC*, 2011, pp. 35-44.
- ORTÍZ, M.** *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo*. 2006.
- PANREAC QUIMICA SA.** Manual Básico de Microbiología. *Cultimed*, vol. 3., 2000.
- PARRA HUERTAS, R.A.** Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2010, [en línea], vol. 8, no. 1, pp. 93-105. ISSN 1692-3561. DOI 1692-3561. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.
- PICAZO, J.J., et.al.** Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2000, [en línea], vol. 11, no. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf%0Ahttps://www.seimc.org/contenidos/documentoscientifi>

cos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14.pdf.

- RAMÍREZ, J.C., et.al.** Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2011, [en línea], vol. Año 2, no. 7, pp. 16. Disponible en: http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_305_bacterias_lacticas_importancia_en_alimentos.pdf.
- REGINENSI, S., et.al.** Microorganismos termodúricos en la leche causantes de defectos en la producción quesera. *V Congreso Uruguayo de Producción Animal*. Montevideo, 2014, pp. 38-40.
- RUGAMA., F.A. y CASTILLO., Y.** Microbiología de los alimentos. *Universidad Nacional de Ingeniería(UNI)*, 2010, pp. 63.
- SAMANIEGO FERNANDEZ LUZ M., S. del C.M.** *Lactobacillus spp*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. *Centro de Estudios Biotecnológicos . Facultad de Agronomía. Universidad de Matanza*, vol. reseña, 2010, pp. 34.
- SAMPAYO, F., et.al.** Influencia de las buenas prácticas en la contaminación fúngica del queso de arzúa. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2001, pp. 169-172.
- SÁNCHEZ, L., et.al.** Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidato a probióticas. *Revista de Salud Animal*, vol. 33, no. 3, 2011, pp. 154-160. ISSN 0253-570X.
- SARRIÁ, B.** Efectos del tratamiento termico de fórmulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica. *Intituto de nutrición y bromatología CSIC.UCM* , 2008, [en línea], vol. 1, pp. 338. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/X/3/X3068001.pdf>.
- SCIENCE, F.** Thermoduric Bacteria in Raw Milk. *Dairy Foods Science Notes*, no. Dmcc, 2007, pp. 14853.
- SEIJA, V. y VIGNOLI, R.** Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología Médica*, 2006, pp. 631-647.
- SIGNORINI, M.L., et.al.** Utilización de microorganismos marcados para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Revista Científica*, vol. XVIII, 2008, pp. 207-217.

- TAYLOR, P. y AKHTAR, S.** Food Safety Challenges — A Pakistan ' s . , no. January, 2015, pp. 37-41. DOI 10.1080/10408398.2011.650801.
- VALBUENA, E., et.al.** Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, vol. 14, no. 1. 2004, ISSN 07982259.
- VICTORIA-LEÓN, T., et al..** Efecto De Bacterias Ácido Lácticas Termoresistentes En Salchichas Cocidas Thermoresistan Lactic Acid Bacteria Effect on Cooked Sausages. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2006, [en línea], vol. 5, no. 2, pp. 135-141. ISSN 1135-8122. DOI 10.1080/11358120609487684. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120609487684>.
- VIZCARRONDO, M. y GUTIÉRREZ, S.** Morfología Y Tinción De Los Microorganismos. *Universidad Central de Venezuela*, 2008, pp. 64-85.
- VOLFREDO, J.** Los antimicrobianos en la práctica médica. *Medicina Intensiva*, 2010, pp. 272.
- WHO/FOS.** Estimaciones de la oms sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria, 2010.
- ZAVALA, J.M.** Cambios Organolépticos Y Nutricionales de la Leche. *Sitio Argentino de Produccion Animal*, 2013, pp. 1-10.
- ZHOU, J.S., et. el..** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 98, no. 2, 2005, pp. 211-217. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011.

ANEXOS

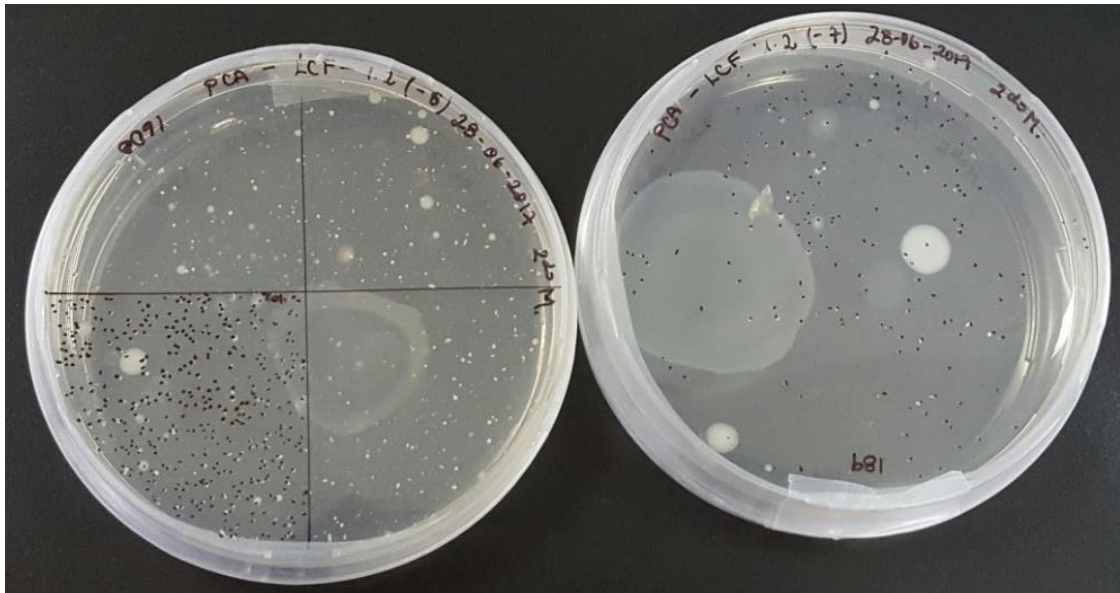
ANEXO A. MUESTREO DE LA QUESERA Q1 y Q2



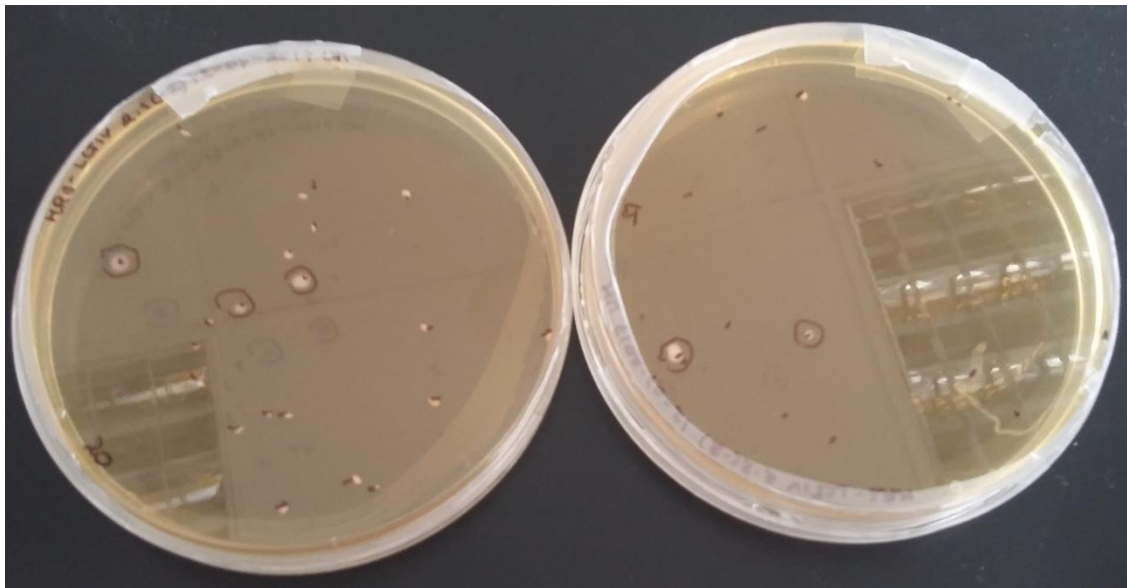
MUESTREO DE LA QUESERA Q2



ANEXO B. RECUENTOS BACTERIANOS

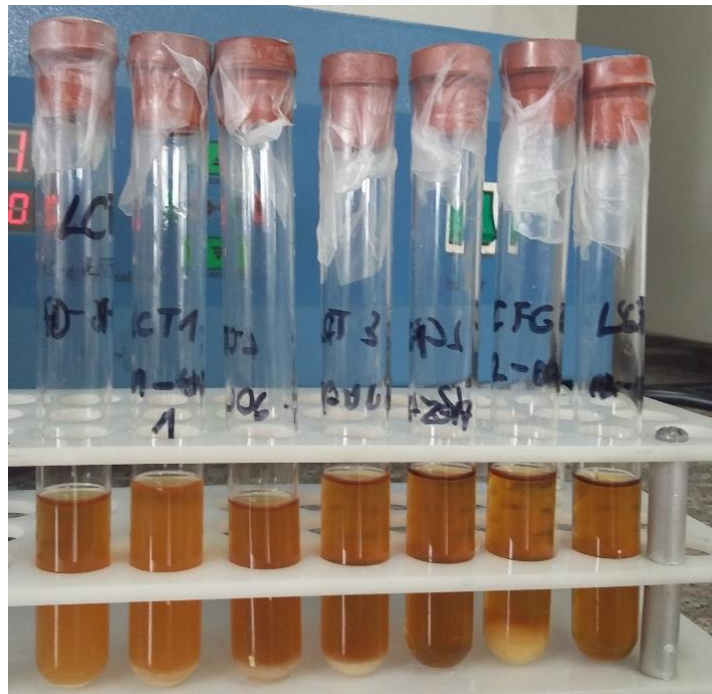


A. Siembra de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas en Agar PCA

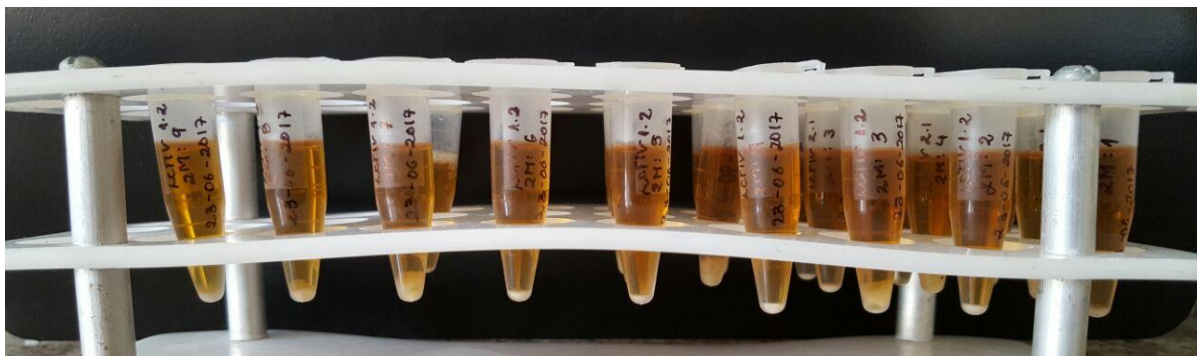


B. Siembra de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas en Agar MRS

ANEXO C. CULTIVO BACTERIANO EN CALDO MRS

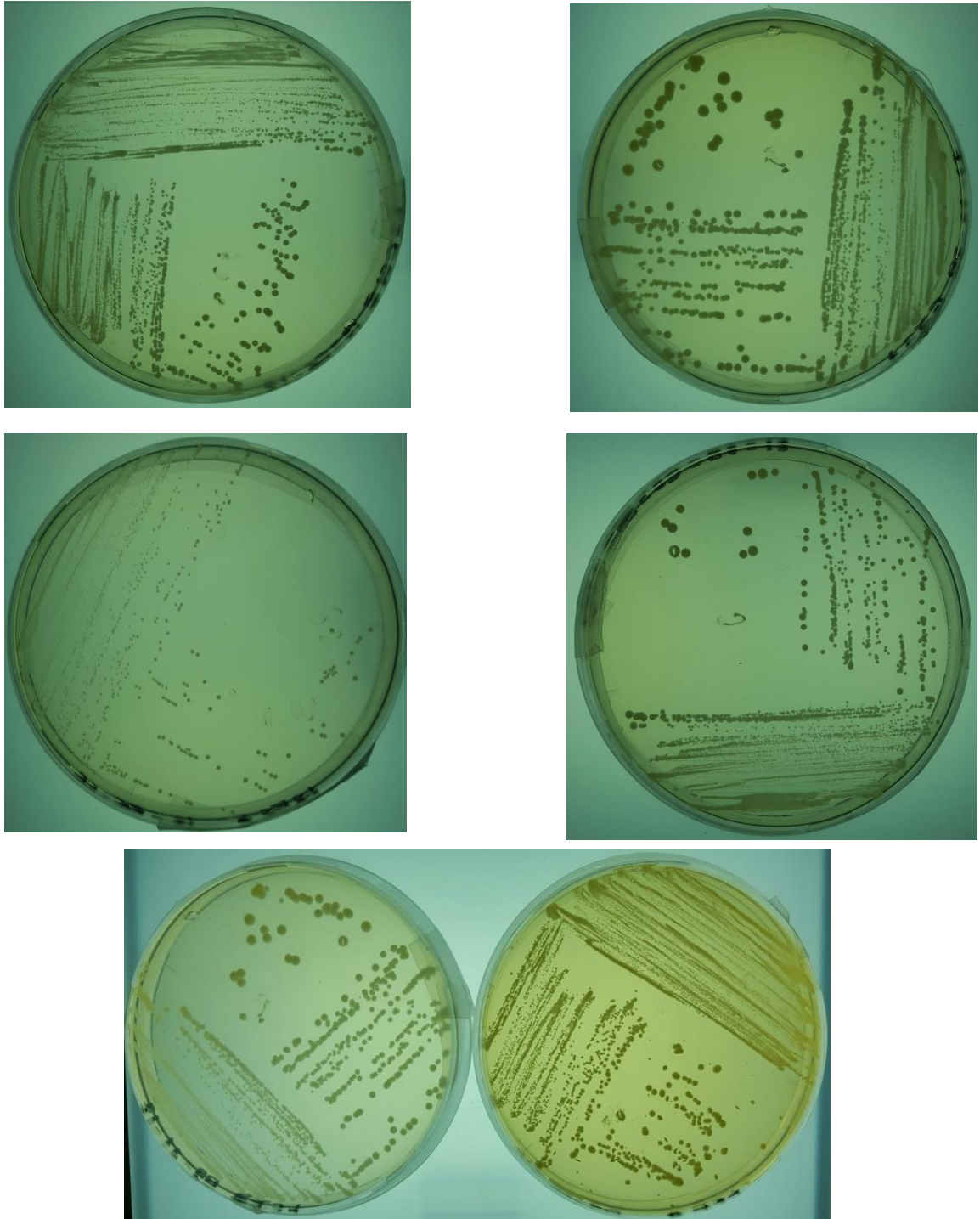


A. Inóculo en Tubos de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas



B. Inóculo en viales eppendorf de Bacterias Ácido Lácticas Termodúricas

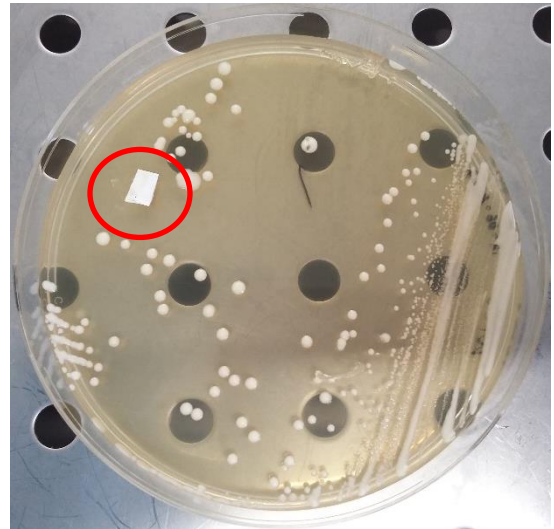
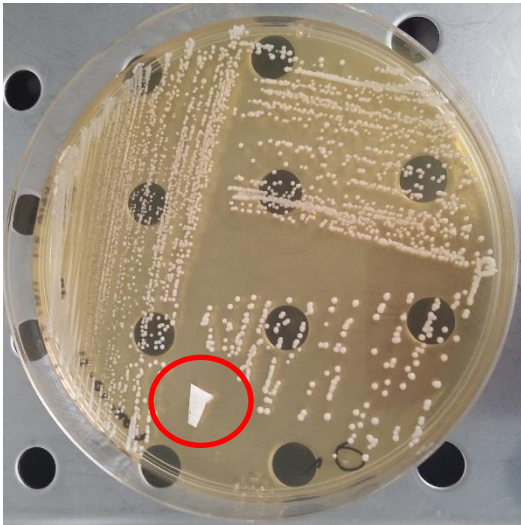
ANEXO D. AISLAMIENTO DE BACTERIAS TERMODÚRICAS



A. Bacterias ácido lácticas aisladas en agar MRS (siembra por estriamiento)

ANEXO E. PRUEBAS BIOQUÍMICAS RÁPIDAS

PRUEBA DE OXIDASA



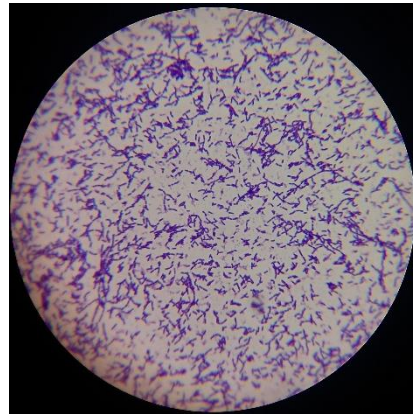
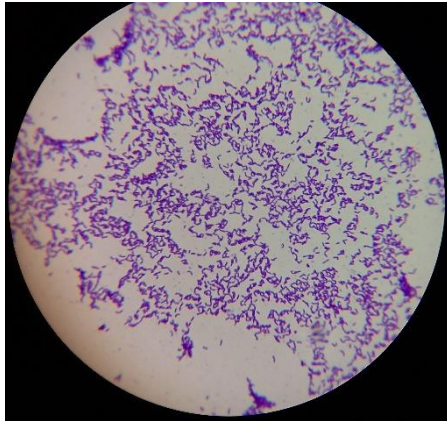
A. Colonias oxidasa Negativo

PRUEBA DE CATALASA



B. Colonias catalasa negativo

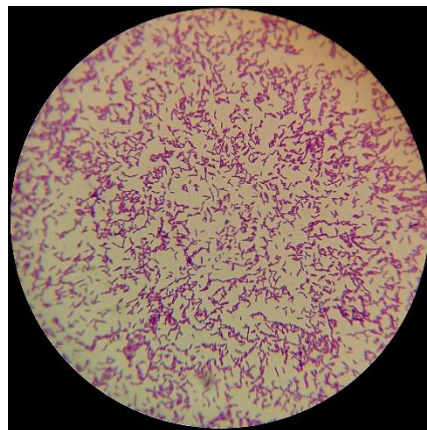
ANEXO F. TINCIÓN GRAM



A. Bacilos Gram Positivos (Aumento 100x)

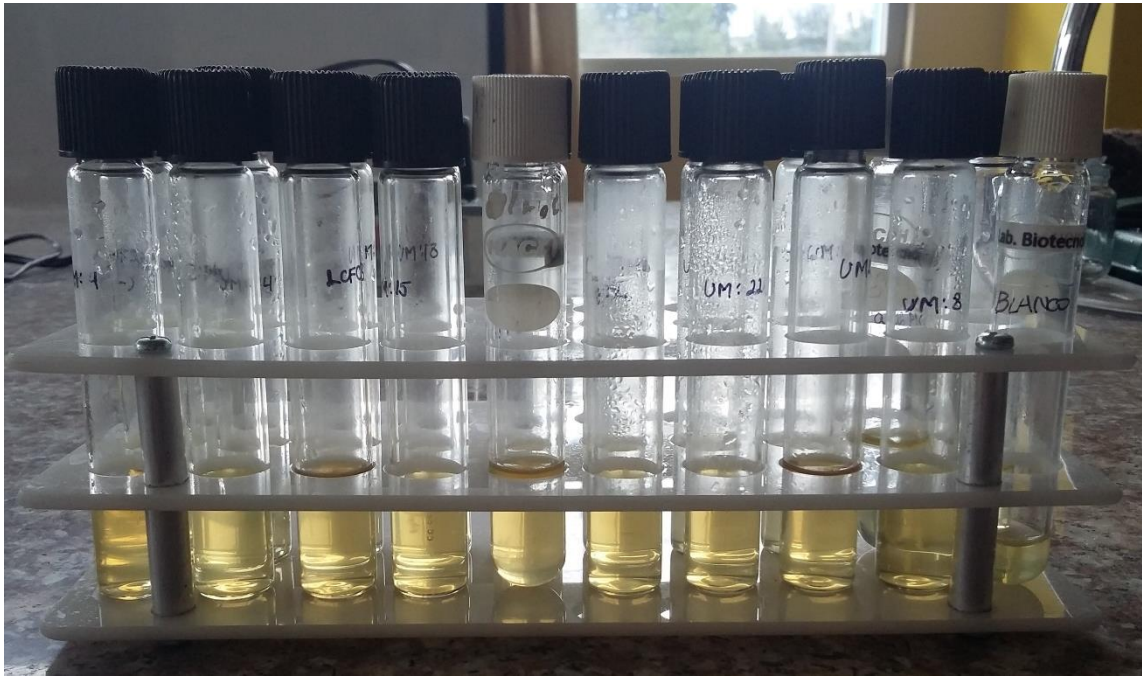


B. Cocos Gram Positivos (Aumento 100x)



C. Bacilos Gram Negativos (Aumento 100x)

ANEXO G. PRUEBA DE MOTILIDAD (SIM)



A. Tubos con medio SIM

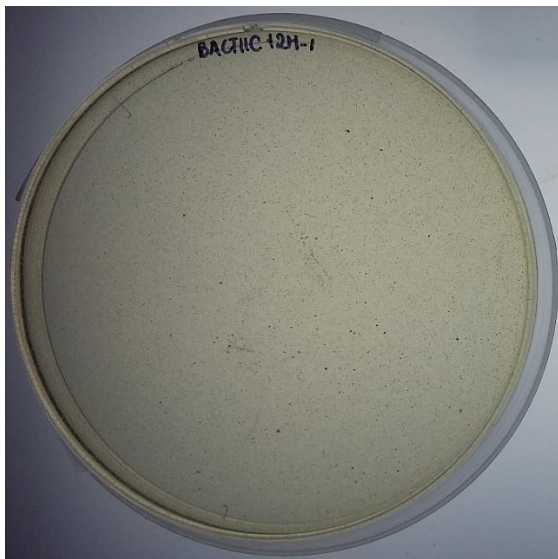


B. Aislado de BAL con motilidad negativa

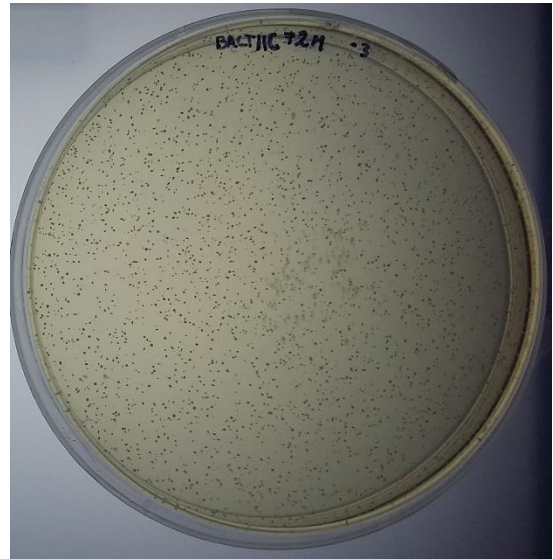


C. Aislado de BAL con motilidad positiva

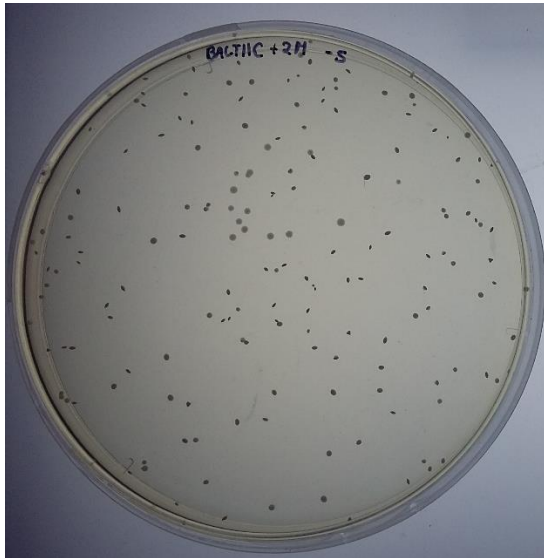
ANEXO H. VIABILIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS TERMODÚRICAS



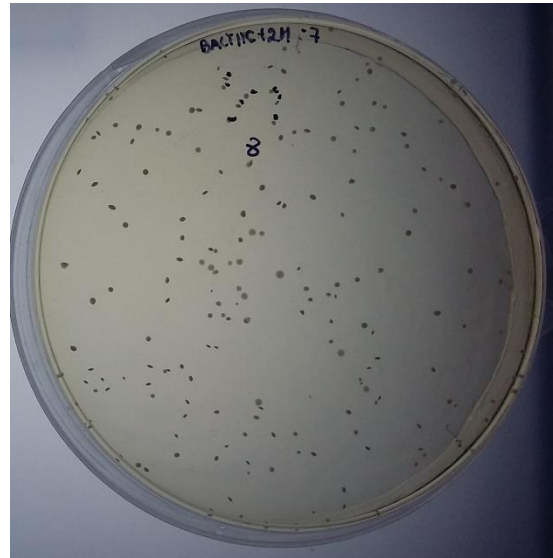
A. Dilución 10^{-1}



B. Dilución 10^{-3}

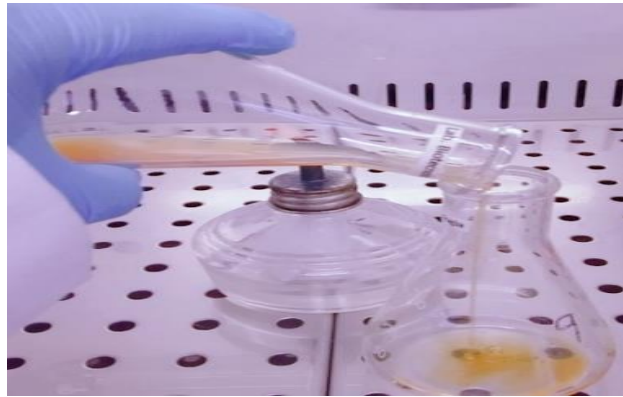


C. Dilución 10^{-5}



D. Dilución 10^{-7}

ANEXO I. ELABORACIÓN DEL CEPARIO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS TERMODÚRICAS



A. Aislado de un cultivo puro de BAL a ñas solución de glicerol 30%



B. Llenado de viales eppendorf de 1.5mL

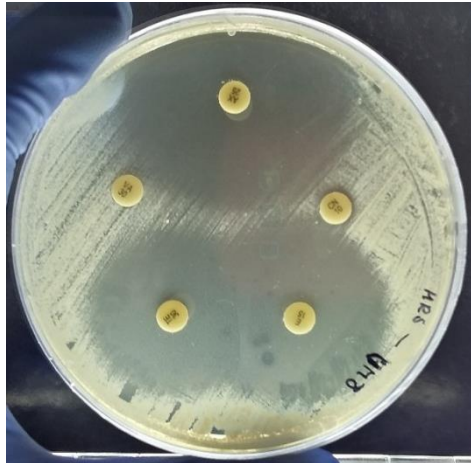


C. Aislados de BAL en MRS y glicerol al 15% en viales sellados y rotulados

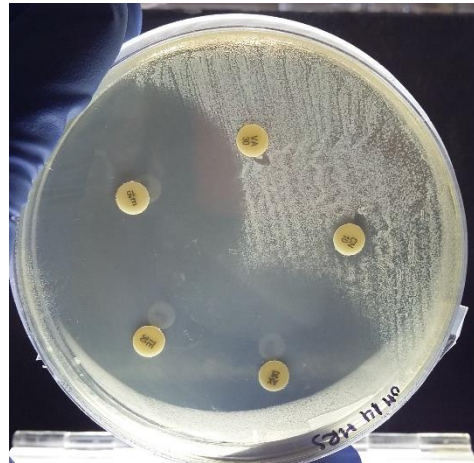


D. Banco de Bacterias ácido lácticas

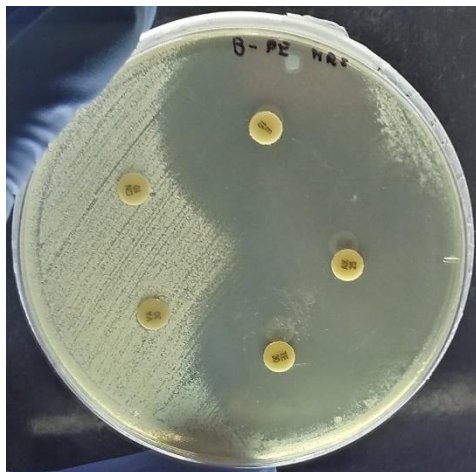
ANEXO J. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO MRS



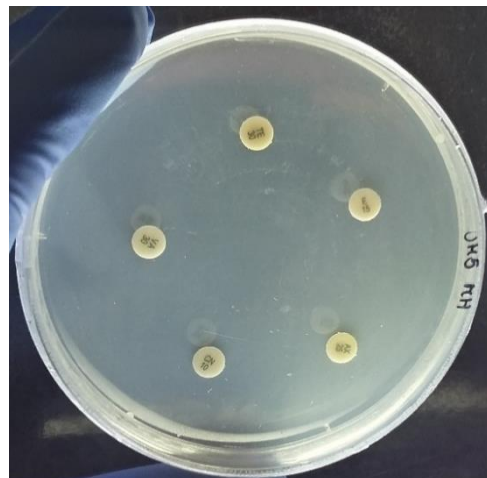
A. Alta sensibilidad a amoxicilina, eritromicina y moderada sensibilidad a tetraciclina



B. Alta sensibilidad amoxicilina, eritromicina y tetraciclina



C. Alta Sensibilidad a eritromicina, amoxicilina y tetraciclina



D. Resistencia a amoxicilina, eritrocina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina

ANEXO K.

Fichas técnicas de Conservación Bacteriana

(Congelación ordinaria a -20°C)

Ubicación:

Laboratorio de Microbiología de Recursos Naturales