



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE  
CEPAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EN MUESTRAS DE  
CEVICHE DE CHOCHOS”**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORAS: DAYANA GABRIELA CUEVA CHANALATA**

**NATALY ALEXANDRA MAYORGA MINIGUANO**

**DIRECTORA: Dra. ANA KARINA ALBUJA LANDI MSc.**

Riobamba – Ecuador

2021

**©2021, Dayana Gabriela Cueva Chanalata & Nataly Alexandra Mayorga Miniguano**

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.

Nosotras, Dayana Gabriela Cueva Chanalata y Nataly Alexandra Mayorga Miniguano, declaramos que el presente trabajo de integración curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 09 de julio del 2021.



**Dayana Gabriela Cueva Chanalata**

**230064688-8**



**Nataly Alexandra Mayorga Miniguano**

**180374636-9**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**


El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular: Tipo Proyecto de investigación, “ **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EN MUESTRAS DE CEVICHE DE CHOCHOS**” realizado por las señoritas:  **DAYANA GABRIELA CUEVA CHANALATA** y  **NATALY ALEXANDRA MAYORGA MINIGUANO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes MSc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

ADRIANA  
ISABEL  
RODRIGUEZ  
BASANTES



Firmado digitalmente por ADRIANA ISABEL RODRIGUEZ BASANTES  
Fecha: 2021.07.09 15:24:23 -05'00'

2021-07-09

Dra. Ana Karina Albuja Landi MSc.  
**DIRECTORA DEL TRABAJO  
DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**



Firmado electrónicamente por:

**ANA KARINA ALBUJA** 2021-07-09

Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD.  
**MIEMBRO DEL TRABAJO  
DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**



Firmado electrónicamente por:

**CARLOS PILAMUNGA** 2021-07-09

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada con mucho amor a:

A Dios por haberme dado la vida y la sabiduría para poder llegar a concluir esta etapa tan importante de mi formación profesional

Con mucho amor y cariño a mi Madre Gladys Chanalata por su esfuerzo, trabajo y sacrificio durante todos estos años, gracias a su apoyo incondicional he logrado llegar hasta aquí y convertirme en una gran profesional.

A mis todos mis familiares por todo el apoyo moral, consejos y palabras de aliento que me ayudaron a no rendirme jamás durante todo el transcurso de mi etapa estudiantil.

**Dayana**

A mis padres quienes han sido un apoyo incondicional en todo momento, por ser mi soporte en mi educación y formación como profesional, por convertirme en una mujer optimista, decidida y responsable en cumplir mis metas de vida, de igual manera a mi hermana y sobrina que han sido una motivación más siendo fuente de inspiración para continuar y en especial a Dios que ha sido mi guía, mi compañía y fortaleza en los momentos difíciles durante mi vida.

**Naty**

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento en primer lugar a Dios por guiarme y ser mi fortaleza en momentos de dificultad y debilidad brindándome sabiduría a lo largo de mi vida para lograr superar cualquier obstáculo presente.

A mi Madre Gladys por ser un pilar fundamental en mi vida por sus consejos y su apoyo incondicional, que me han ayudado a salir adelante, superarme y ser mejor persona cada día

A mi tía Aide Chanalata que siempre ha estado al pendiente de mi con sus consejos y apoyo moral en cada momento.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a la facultad de Ciencias, a los docentes quienes con sus conocimientos aportaron en el desarrollo de mi formación profesional durante todo este tiempo.

A la Dra. Ana Albuja directora del trabajo de titulación, por confiar en nosotras brindándonos de su conocimiento, tiempo y sobre todo de su apoyo para culminar con éxito este trabajo, a la Dra. Sandra Escobar y a nuestra Técnica Docente la BQF. Yolanda Buenaño por su valiosa colaboración, guía y asesoramiento durante el desarrollo de este trabajo.

**Dayana Cueva**

Quiero agradecer a Dios por la sabiduría, la fortaleza, la salud y ser mi guía durante toda mi vida y más aún en esta etapa para lograr mi meta profesional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por la apertura para realizar mi trabajo de titulación, a todos los docentes que formaron parte de mi educación universitaria impartiendo sus conocimientos y dedicación en mi formación como bioquímica farmacéutica.

A mis padres Jaime y Mónica por ser mi apoyo incondicional, los pilares fundamentales mi ejemplo de vida y sobre todo por darme la confianza y amor en todo momento. A mi hermana Anita y mi sobrina Diana por la motivación con sus palabras de aliento, el cariño y la compañía que me han brindado.

A mi directora de trabajo de titulación a la Dra. Ana Albuja por el asesoramiento y guía brindada y estar siempre interesada del desarrollo del proyecto, además a la Dra. Sandra Escobar y a la BQF. Yolanda Buenaño por la valiosa colaboración, el tiempo empleado y el aporte de sus conocimientos para llevar a cabo la ejecución del mismo.

A mis amigos y amigas que formaron parte de esta hermosa etapa y también a las personas que de una u otra manera hicieron posible la culminación exitosa de mi carrera profesional.

**Nataly Mayorga**

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY/ABSTRAC.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3

## CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.1.1. <i>Concepto de Microbiología</i> .....	5
1.1.2. <i>Desarrollo histórico de la microbiología</i> .....	6
1.2. Microbiología de alimentos.....	7
1.2.1. <i>Factores que influyen en el crecimiento microbiano en los alimentos</i> .....	9
1.2.1.1. <i>Factores intrínsecos</i> .....	9
1.2.1.2. <i>Factores extrínsecos</i> .....	11
1.2.2. <i>Principales microorganismos patógenos que se pueden encontrar en los alimentos</i> .....	13
1.3. Colecciones Microbianas o Cepario.....	15
1.3.1. <i>Sistema de Calidad</i> .....	16
1.3.2. <i>Requerimientos para la aplicación de un método de conservación</i> .....	16
1.3.3. <i>Factores que influyen en la conservación microbiana</i> .....	17
1.4. Métodos de Identificación Microbiana.....	17
1.4.1. <i>Métodos Fenotípicos</i> .....	18
1.4.1.1. <i>Tinción Gram</i> .....	19
1.4.2. <i>Pruebas tradicionales bioquímicas</i> .....	20
1.4.3. <i>Métodos Moleculares</i> .....	20
1.5. Métodos de conservación bacteriana.....	21
1.5.1. <i>Métodos de conservación a corto plazo</i> .....	21
1.5.1.1. <i>Cultivo continuo</i> .....	21
1.5.1.2. <i>Conservación de cepas bajo una capa de aceite mineral o una tapa de cera</i> .....	21

1.5.1.3.	<i>Cultivos profundos en Agar</i> .....	22
1.5.2.	<b>Métodos de conservación a medio plazo</b> .....	22
1.5.2.1.	<i>Tierra fértil estéril</i> .....	22
1.5.2.2.	<i>Desecación en papel de filtro</i> .....	22
1.5.2.3.	<i>Desecación en bolitas de alginato</i> .....	23
1.5.3.	<b>Métodos de conservación a largo plazo</b> .....	23
1.5.3.1.	<i>Conservación por Congelación</i> .....	23
1.5.3.2.	<i>Conservación por Liofilización</i> .....	25
1.6.	<b>Medios de cultivo</b> .....	25
1.6.1.	<b>Clasificación de los medios de cultivo</b> .....	26
1.6.2.	<b>Medios de cultivo para el aislamiento bacteriano</b> .....	27

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	33
2.1.	<b>Metodología de la investigación</b> .....	33
2.1.1.	<b>Localización de la Investigación</b> .....	33
2.1.2.	<b>Tipo y diseño de la Investigación</b> .....	33
2.1.3.	<b>Población de estudio y/o tamaño de la muestra y/o método de muestreo</b> .....	33
2.1.3.1.	<i>Criterios de inclusión</i> .....	33
2.1.3.2.	<i>Criterios de exclusión</i> .....	33
2.2.	<b>Recolección de muestras</b> .....	33
2.2.1.	<b>Técnica para la toma de muestras</b> .....	34
2.2.2.	<b>Homogenización de las muestras</b> .....	34
2.3.	<b>Técnica de aislamiento y recuento por diluciones</b> .....	35
2.4.	<b>Metodología para la reactivación de cepas bacterianas</b> .....	36
2.5.	<b>Aislamiento de bacterias</b> .....	37
2.5.1.	<b>Metodología para el cultivo/aislamiento de la familia Enterobacteriaceae</b> .....	37
2.5.2.	<b>Cultivo de cepas bacterianas de la familia Micrococcaceae</b> .....	39
2.6.	<b>Identificación de cepas bacterianas</b> .....	40
2.6.1.	<b>Identificación mediante tinción Gram</b> .....	40
2.6.2.	<b>Pruebas para la identificación de la familia Enterobacteriaceae</b> .....	42
2.6.3.	<b>Pruebas para la identificación de las especies del género Pseudomonas</b> .....	43
2.6.4.	<b>Pruebas para la identificación de las especies del género Staphylococcus</b> .....	44
2.6.5.	<b>Pruebas para la identificación de los microorganismos del género Streptococcus sp.</b> .....	45



<b>2.7.</b>	<b>Conservación de cepas bacterianas a corto plazo .....</b>	<b>46</b>
<b>2.8.</b>	<b>Técnica de Conservación con Glicerol.....</b>	<b>47</b>
<b>2.9.</b>	<b>Determinación de la actividad enzimática de las cepas aisladas .....</b>	<b>48</b>
<b>2.10.</b>	<b>Test de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar (Técnica de Bauer &amp; Kirby).....</b>	<b>49</b>
<b>2.11.</b>	<b>Evaluación de la viabilidad de las cepas aisladas.....</b>	<b>49</b>

### **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>Aislamiento de cepas bacterianas encontradas en el ceviche de chochos. ....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.</b>	<b>Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3.</b>	<b>Test de susceptibilidad antimicrobiana (AST).....</b>	<b>61</b>
<b>3.4.</b>	<b>Actividad enzimática .....</b>	<b>63</b>
<b>3.5.</b>	<b>Evaluación de viabilidad y pureza por el método crio preservación .....</b>	<b>65</b>

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
--------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
-----------------------------	-----------

### **BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Etapas en el desarrollo de la microbiología basado en el clásico esquema de Collard.....	7
<b>Tabla 2-1:</b>	Clasificación de los microorganismos basados en su temperatura óptima.....	11
<b>Tabla 3-1:</b>	Principales microorganismos causantes de ETA.....	13
<b>Tabla 5-1:</b>	Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	19
<b>Tabla 6-1:</b>	Clasificación de medios de cultivo según su estado físico.....	26
<b>Tabla 7-1:</b>	Clasificación de medios de cultivo según su composición química.....	26
<b>Tabla 8-1:</b>	Tipos de medios de cultivo.....	27
<b>Tabla 9-1:</b>	Caldos utilizados para reactivación de cepas.....	27
<b>Tabla 10-1:</b>	Agares utilizados para siembra de microorganismos reactivados.....	28
<b>Tabla 11-1:</b>	Medios de cultivo y ensayos para identificación - pruebas bioquímicas.....	30
<b>Tabla 1-3:</b>	Características fenotípicas de las cepas bacterianas estudiadas.....	51
<b>Tabla 2-3:</b>	Caracterización bioquímica de bacterias de la Familia <i>Micrococcaceae</i> .....	55
<b>Tabla 3-3:</b>	Caracterización bioquímica de bacterias de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	56
<b>Tabla 4-3:</b>	Caracterización bioquímica de bacterias del género <i>Pseudomona</i> .....	59
<b>Tabla 5-3:</b>	Resultados de la identificación mediante la prueba molecular (PCR).....	60
<b>Tabla 6-3:</b>	Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia <i>Micrococcaceae</i> .....	61
<b>Tabla 7-3:</b>	Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	61
<b>Tabla 8-3:</b>	Test de susceptibilidad antimicrobiana de la especie <i>Pseudomona</i> .....	62
<b>Tabla 9-3:</b>	Pruebas de actividad enzimática.....	64
<b>Tabla 10-3:</b>	Viabilidad bacteriana por el método de crio preservación.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b>	Pruebas bioquímicas para la identificación microbiana. ....	17
<b>Figura 2-1.</b>	Pruebas bioquímicas tradicionales de identificación microbiana.....	20
<b>Figura 1-2.</b>	Procedimiento para la reactivación de cepas bacterianas.....	35
<b>Figura 2-2.</b>	Procedimiento para la reactivación de cepas bacterianas.....	36
<b>Figura 3-2.</b>	Procedimiento de cultivos de cepas bacterianas para la familia..... <i>Enterobacteriaceae</i> .....	38
<b>Figura 4-2.</b>	Procedimiento de cultivos de cepas bacterianas para género <i>Staphylococcus</i> . ...	39
<b>Figura 5-2.</b>	Procedimiento de para el desarrollo de la Tinción Gram. ....	41
<b>Figura 6-2.</b>	Procedimiento de pruebas bioquímicas. ....	42
<b>Figura 7-2.</b>	Pruebas para la identificación del género <i>Pseudomonas</i> . ....	43
<b>Figura 8-2.</b>	Procedimiento de clave diferencial para género <i>Staphylococcus</i> . ....	44
<b>Figura 9-2.</b>	Procedimiento de clave diferencial para género <i>Streptococcus</i> . ....	45
<b>Figura 10-2.</b>	Procedimiento para la conservación a corto plazo de cepas bacterianas.....	46
<b>Figura 11-2.</b>	Procedimiento para la conservación a largo plazo de cepas bacterianas.....	47
<b>Figura 1-3.</b>	Características diferenciales para género <i>Staphylococcus</i> y <i>Streptococcus</i> . ....	53
<b>Figura 2-3.</b>	Crecimiento bacteriano de enterobacterias en agar MacConkey.....	54
<b>Figura 3-3.</b>	Fluorescencia en presencia de luz UV en agar MacConkey. ....	59

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Recolección de muestras
- Anexo B:** Homogenización de la muestra
- Anexo C:** Técnica de siembra por diluciones
- Anexo D:** Pruebas enzimáticas
- Anexo E:** Técnica de conservación con glicerol
- Anexo F:** Conservación por crio congelación
- Anexo G:** Evaluación de la viabilidad de las cepas aisladas
- Anexo H:** Composición del agar patata dextrosa
- Anexo I:** Composición del medio mantequilla modificado
- Anexo J:** Composición del medio caseína
- Anexo K:** Composición del medio celulosa
- Anexo L:** Antibiograma Disco-Placa
- Anexo M:** Medición de halos de inhibición del antibiograma

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AM</b>	Ampicilina
<b>AMC</b>	Amoxicilina/clavulánico
<b>AST</b>	Test de susceptibilidad antimicrobiana
<b>Aw</b>	Actividad del agua
<b>CC</b>	Colecciones de Cultivos
<b>CCM</b>	Colección de Cultivos de Microorganismo
<b>CG</b>	Caldo cerebro Corazón+ 30% Glicerol
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa
<b>CN</b>	Gentamicina
<b>E</b>	Eritromicina
<b>EMB</b>	Eosina Azul de Metileno
<b>EMV</b>	Cloranfenicol
<b>ETA</b>	Enfermedades por los alimentos
<b>INEN</b>	Instituto ecuatoriano de normalización
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Normalización
<b>KIA</b>	Agar Hierro de Kligler
<b>L-Dry</b>	Desecación líquida
<b>mBRC</b>	Centros de recursos biológicos microbianos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OX</b>	Oxacilina
<b>P</b>	Penicilina
<b>PCR</b>	Reacción de la Cadena Polimerasa
<b>SIM</b>	Medio de sulfuro indol para movilidad
<b>SS</b>	Salmonella-Shigella
<b>SXT</b>	Trimetoprim Sulfametoxazol
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>WDCM</b>	Centro de Datos Mundiales de Microorganismos
<b>WFCC</b>	Federación Mundial de Colecciones de Cultivos

## RESUMEN

El proyecto de investigación tuvo como objetivo aislar, identificar y conservar cepas bacterias encontradas en muestras de ceviche de chochos que se expenden ambulatoriamente en la ciudad de Riobamba. Las muestras analizadas fueron tomadas aleatoriamente de carritos ambulatorios siguiendo el protocolo establecido en la norma INEN 1529-2:2013 “CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO”, luego se procedió al aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales mediante resiembras sucesivas con la finalidad de obtener cepas puras. Para la identificación se realizaron pruebas fenotípicas y bioquímicas para cada especie bacteriana, dando como resultado microorganismos de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Citrobacter*; además, mediante identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) bacterias del género *Acinetobacter*. En la evaluación de la actividad enzimática se evidenció cinco cepas positivas luego de ser cultivadas en agares enriquecidos y formulados para cada actividad, dando como resultado, *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomona spp.* con actividad amilolítica, *Staphylococcus aureus* con actividad proteolítica y lipolítica, y *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus spp.* con actividad celulolítica. En total se identificaron 13 cepas que fueron conservadas en glicerol al 30% a -196 grados Celsius en un criocongelador, este método de conservación a largo plazo garantiza estabilidad bioquímica y microscópica. Los microorganismos aislados de los ceviches de chochos son considerados un problema de seguridad alimentaria, pues la mayoría de los vendedores ambulantes no cuenta con buenas prácticas de manipulación e higiene durante la preparación de los alimentos, por consiguiente, la capacitación en prácticas correctas de higiene podría ser oportuna para disminuir enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y generar una sociedad más segura y saludable.

**Palabras clave:** <AISLAMIENTO MICROBIANO>, <IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA>, <CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS>, < MUESTRAS DE CEVICHE DE CHOCHOS>, < CRIOCONGELACIÓN >.



1478-DBRA-UTP-2021

## SUMMARY/ABSTRACT

The objective of the research project was to isolate, identify and conserve bacterial strains found in chochos ceviche samples that are sold outpatients in Riobamba. The analyzed samples were randomly taken from ambulatory carts following the protocol established in the INEN 1529-2: 2013 standard "MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOOD., TAKING, SENDING AND PREPARING SAMPLES FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS". Afterwards, the isolation was carried out in selective and differential culture media by successive reseeded in order to obtain pure strains. For the identification, phenotypic and biochemical tests were carried out for each bacterial species, resulting in microorganisms of the *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Citrobacter* genera; in addition, by molecular identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) bacteria of the genus *Acinetobacter*. In the evaluation of the enzymatic activity, five positive strains were evidenced after being cultivated in enriched agar and formulated for each activity, resulting in *Acinetobacter johnsonni* and *Pseudomona spp.* with amylolytic activity, *Staphylococcus aureus* with proteolytic and lipolytic activity, and *Pseudomona aeruginosa* and *Proteus spp.* with cellulolytic activity. In total, 13 strains were identified that were preserved in 30% glycerol at -196 degrees Celsius in a cryo-freezer, this long-term preservation method guarantees biochemical and microscopic stability. The microorganisms isolated from chochos ceviche are considered a food safety problem, since most street vendors do not have good handling and hygiene practices during food preparation, therefore, training in correct hygiene practices could be timely to reduce food-borne illnesses (ETA) and generate a safer and healthier society.

**Keywords:** <MICROBIAL ISOLATION>, <IDENTIFICATION MICROBIOLOGICAL>, <CONSERVATION OF BACTERIAL STRAINS>, <SAMPLES OF CHOCHOS CEVICHE>, <CRYOFREEZING>.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha evidenciado intereses multidisciplinarios en estudios implicados a los microorganismos en diferentes áreas, incluida la tecnología de los alimentos, la intoxicación alimentaria, la seguridad e higiene de los alimentos, la resistencia antimicrobiana y de manera más reciente las ómicas alimentarias (Suzzi y Corsetti, 2020, p.3).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), constituyen un grave problema de salud a nivel mundial, motivo por el cual la seguridad alimentaria en lo que se refiere a inocuidad de los alimentos ha sido el principal reto del Sistema de Salud Pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los patógenos de transmisión alimentaria pueden ser causa de infecciones o intoxicaciones que pueden ir de leves a graves causando severas consecuencias (OMS, 2020).

A través de la identificación de microorganismos en base a criterios fisiológicos, morfológicos y análisis molecular, se aporta la información necesaria del agente causante de la alteración en un alimento y el promotor de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), lo cual es esencial para la vigilancia del producto a ser comercializado y el control epidemiológico de las enfermedades causadas por dichos microorganismos (González y Rojas, 2005, p.388).

Estos microorganismos han jugado un papel importante en la comunidad científica, es así que las colecciones microbianas mediante la existencia de ceparios, cada día adquieren mayor protagonismo, constituyéndose una fuente sustentable para la preservación *ex situ* de la diversidad microbiana (Fernández Andreu et al., 2012, p.50).

Considerando el tiempo prolongado y los recursos empleados cuando se ejecuta el proceso de aislamiento y resiembra para obtener una cepa pura, se ve la necesidad de crear reservas de microorganismos que garanticen viabilidad, pureza y homogeneidad en estado inactivo durante un periodo de tiempo más largo, de esta manera se proporciona un rápido acceso con la provisión de una cepa conservada y de referencia única (Bagatolli, 2017, p.14).

A escala de laboratorio esta observación ha generado el proyecto de implementación del Cepario Bacteriano en la Facultad de Ciencias, que se ajuste a las condiciones logísticas y técnicas del lugar, así como del tipo de cepas bacterianas a conservar. El aislamiento, identificación y conservación de cepas bacterianas a través de este trabajo de titulación engloba el aporte de una provechosa información de microorganismos de interés microbiológico, además describe las áreas de futuras investigaciones el cual tendrá un interés creciente en diferentes enfoques, el mismo que beneficia a los estudiantes y docentes de la Institución, garantizando la disponibilidad de dicho material biológico para actividades relacionadas a enseñanza, docencia, investigación científica e incluso actividades de laboratorio dentro de la institución (Montes de Oca et al., 2008, p.18).



Para el desarrollo de dicho propósito se utilizaron diferentes técnicas de cultivo que permitieron el aislamiento de cepas bacterias. Asimismo, se aplicaron métodos para su identificación en base a sus características, tales como, pruebas bioquímicas convencionales, pruebas moleculares entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para su conservación glicerol como crio protector. Los microorganismos que fueron aislados e identificados para la preservación son el resultado del proyecto de investigación “EVALUAR LA CALIDAD FÍSICO - QUÍMICA, BACTERIANA Y PARASITARIA EN LOS CEVICHE DE CHOCHOS (Producto Artesanal de Consumo Masivo, Patrimonio culinario), QUE SE PREPARAN Y SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA CONTRIBUYENDO A LA SEGURIDAD ALIMENTARIA’ que ya ha venido ejecutándose desde enero del 2020 en el laboratorio de la Facultad de Ciencias y ahora conforman una colección microbiana valiosa para el centro de investigación que proporciona estabilidad bioquímica y microscópica de las bacterias garantizando su posterior utilización.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Aislar, identificar y conservar cepas bacterias encontradas en muestras de ceviche de chochos que se expenden ambulatoriamente en la ciudad de Riobamba durante el periodo octubre 2020 - marzo 2021.

### **Objetivos Específicos**

- Aislar colonias bacterianas encontradas en muestras de ceviche de chochos que se expenden en carritos ambulorios en la ciudad de Riobamba.
- Describir las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas identificadas.
- Identificar los microorganismos aislados mediante pruebas de caracterización bioquímicas tradicionales y moleculares.
- Aplicar un método viable para la conservación de las cepas bacterianas identificadas.
- Determinar las actividades amilolítica, proteolítica, lipolítica, celulolítica y susceptibilidad microbiana de las bacterias identificadas de las muestras de ceviche de chochos.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Antecedentes de la investigación

En microbiología alimentaria, las bacterias consideradas como patógenas, infecciosas y productoras de toxinas han sido y siguen siendo un problema de seguridad alimentaria. El análisis microbiológico para la detección de microorganismos que contaminan a los alimentos es una actividad de larga historia, pues se han reportado estudios en donde se demuestra que la mayoría de los vendedores ambulantes no cuentan con un sistema de buenas prácticas de manipulación e higiene, lo que conlleva a enfermedades causadas por los alimentos y posterior afectación en la salud de las personas (Quispe y Sánchez, 2001, p.27).

Desde el punto de vista sanitario los alimentos son vehículos de infecciones o intoxicaciones, debido a esta faceta nace la necesidad de incentivar la investigación en esta área con técnicas de control microbiológico de los alimentos, para de esta manera detectar los patógenos responsables de su deterioro y consecuentemente hagan que estos sean perjudiciales para los consumidores (Andino y Castillo, 2010, p.7-8).

El estudio de la preservación de colecciones microbianas se reconoce como esenciales y no solo para la preservación de la biodiversidad sino también para fines de investigación y desarrollo de aplicaciones en la industria biotecnológica, alimentaria e inclusive ambiental. En este contexto las colecciones de cultivos (CC) y los centros de recursos biológicos microbianos (mBRC) juegan un papel fundamental en el progreso de las ciencias de la vida (Luciana de Vero et al., 2019, p.3-5). Sin embargo, estos centros son escasos y los pioneros se encuentran en Europa y Asia (Gutiérrez et al., 2015, p.96).

La primera Colección de Cultivos de Microorganismo (CCM) se estableció en 1890 por Frantisek Král quien presagió la importancia que tendrían estas colecciones para el progreso de la ciencia que juntamente con estas se crearon muchas otras. En la actualidad la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), es la que representa las colecciones microbiológicas a nivel internacional, que tiene como objetivo promocionar el desarrollo de colecciones de microorganismo. El Centro de Datos Mundiales de Microorganismos (WDCM) registra en la actualidad 659 colecciones microbianas en el cual participan 70 países de América Latina entre ellas Colombia con dos registros una en la Universidad Pontificia Javeriana en Bogotá y otra en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Cali. (González y Jiménez, 2013, p.22-24).

Con el descubrimiento de los medios de cultivos sólidos los cuales permitían el crecimiento de los microorganismos y el éxito que presentó el aislamiento de cultivos puros se vio en la necesidad de preservarlos para futuros usos (Bagatolli, 2017, p.38 ). Por lo tanto, se puede mencionar que el

hallazgo de las técnicas de conservación de microorganismos fue el inicio del desarrollo del mundo de la microbiología (Martos, 2015, p.11).

Hoy en día el uso de técnicas de conservación de bacterias es muy importante, pues ha logrado un potencial biotecnológico enorme, para el uso futuro de especies microbianas como son las colecciones de cultivos microbianos que representan una fuente vital de cepas de referencia útiles en la docencia, investigación y la industria. (Terragno et al., 2010, p.12).

Se han utilizado diversos métodos para conservar bacterias a través de los años. Los métodos de preservación se basan en la naturaleza de los microorganismos, el tiempo de almacenamiento y las instalaciones del laboratorio. Entre ellos los más comunes y exitosos están la criopreservación y liofilización. Actualmente el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) son usados como aditivos en la conservación de bacterias a largo plazo, el glicerol brinda permeabilidad a la membrana, proporciona una cubierta que envuelve a las células evitando la formación de cristales de hielo durante la congelación, evitando de esta manera el daño en las membranas celulares y minimizando el metabolismo o cambio físico (Mahmmoud, 2020, p.2174).

Se han llevado a cabo muchos ensayos de conservación criogénica variando las concentraciones de glicerol a diferentes temperaturas y velocidades de congelación. Es así que se ha determinado que el glicerol se aplica con éxito para congelar bacterias como *Serratia marcescens*, *Erwinia aroideae*, fago T4, *Claviceps sp.*, *Acremorium chrysogenum*, *S. cerevisiae* y otras con alto porcentaje de supervivencia y propiedades conservadas (Uzunova y Donev, 2005, p.22).

Según un estudio de la preservación bacteriana, mencionan que la presencia de una solución al 15% de glicerol protegía a *Escherichia coli*, *Diplococcus pneumoniae* y *Treponema pallidum* del daño causado por congelación y descongelación. Además, *T. pallidum* podría conservarse en glicerol al 15% a -70 ° C durante algunos meses sin pérdida detectable de virulencia. Sobre la base de estos hallazgos, los autores sugirieron que las soluciones de glicerol diluidas podrían emplearse en la preservación de otros materiales biológicos. Se ha demostrado que los siguientes organismos conservados mediante este método permanecen viables durante al menos 5 meses: *Aerobacter aerogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium xerose*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexnsri* y *Streptococcus viridans* (HOWARD, 1955, p.625).

### **1.1.1. Concepto de Microbiología**

La microbiología es la rama de la biología que se encarga del estudio de los seres vivos microscópicos denominados microorganismos proviene del vocablo (de Mikros "pequeño", bios, "vida" y logos, "estudio") son un grupo grande y diversos de organismos primitivos y simples que viven a manera de conjunto de células o como células aisladas, el campo de estudio se enfoca

en sus actividades, tales como la forma, estructura, fisiología, metabolismo, identificación y clasificación de dichos organismos vivos así como la manera de explotar y controlar sus actividades (Pelczar, 2019, p.2). Este grupo está constituido por bacterias, arqueas, hongos, algas, protozoos y los virus.

El objetivo del estudio de la microbiología se basa en comprender otros aspectos colaterales relacionados a la interacción con el ser humano, tales como, si las actividades metabólicas de los microorganismos son beneficiosas o perjudiciales para el ser humano o sus aplicaciones biotecnológicas (Rivera, 2015, p.24).

### ***1.1.2. Desarrollo histórico de la microbiología***

Los microorganismos son los seres vivos más antiguos del planeta se encuentran distribuidos en cada nicho terrestre, su diversidad juega un papel importante en la conservación de la biosfera, puesto que presentan una gran diversidad morfológica, molecular y fisiológica, lo cual hace de su uso un punto clave en el enfrentamiento y soluciones de problemas de la humanidad relacionados con la alimentación y salud (Bagatolli, 2017, p.38).

El descubrimiento de las formas invisibles a simple vista en el siglo XVII fue un hito que marcó de manera significativa la historia de la ciencia, puesto que desde el siglo XIII en adelante se realizaron postulados mediante el cual aludían que la responsabilidad de la descomposición de las materias y enfermedades eran causadas por entidades invisibles. A finales del siglo XIX la palabra microbio fue acuñado para describir a todos los microorganismos los cuales se creía que estaban relacionados con mencionadas actividades (Pelczar, 2019, p.2).

Resultado de esto la microbiología finalmente se convirtió en una ciencia especializada a finales del siglo XIX, como el resultado de la inserción de diversos procesos metodológicos que se descubrieron y desarrollaron en los siglos anteriores (Morejón y Pardo, 2008, p.7), en los cuales mencionan que los microbios son un grupo extremadamente grande y diverso de organismos vivos. (Pelczar, 2019, p.2).

Se puede distinguir cuatro periodos o etapas en el desarrollo de la microbiología basado en el clásico esquema de Collard (1976) que se observar en la Tabla 1-1 mostrada a continuación:

**Tabla 1-1:** Etapas en el desarrollo de la microbiología basado en el clásico esquema de Collard

***Etapas o periodos en el desarrollo de la microbiología***

<b><i>Primer periodo</i></b>	Eminentemente especulativo, cual se extendió desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas (Rivera, 2015, p.25).
<b><i>Segundo periodo</i></b>	Los primeros microscopistas, este periodo fue de lenta acumulación de observaciones (desde 1675 aproximadamente hasta la mitad del siglo XIX) (Rivera, 2015, p. 25), que empieza con el descubrimiento de los microorganismos por Antonie Van Leeuwenhoek (1675) Holandés microscopista quien fue el primero en observar bacterias y protozoos, con esto proporcionando el material adecuado para sus próximas observaciones (Pelczar, 2019, p.4).
<b><i>Tercer periodo</i></b>	Basado en los cultivos de microorganismos, se extiende hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch asientan las bases de la Microbiología como una ciencia experimental bien asentada (Rivera, 2015, p.25).
<b><i>Cuarto periodo</i></b>	Etapas modernas van desde principios del siglo XX hasta la actualidad, los microorganismos son estudiados y analizados en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, etc., y que evidencia un extraordinario crecimiento de la Microbiología, que ha conllevado al surgimiento y desarrollo de disciplinas microbiológicas especializadas como la Virología, Inmunología, etc., y la estrecha implicación de las ciencias microbiológicas en el marco general de las Ciencias Biológicas (Rivera, 2015, p.25).

**Fuente:** Rivera, 2015, p.25; Pelczar, 2019, p.4.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## **1.2. Microbiología de alimentos**

La microbiología de los alimentos es una rama de la microbiología que se basa en el estudio científico de la composición microbiana de los alimentos, por medio de diversas técnicas estandarizadas que permiten la detección de los diversos agentes microbianos que existen. (Húngaro et al., 2014, p.213). Esta disciplina estudia tanto los aspectos positivos de los microorganismos en la producción de los alimentos; por ejemplo, en la elaboración de queso, yogur, cerveza, vino etc. como los aspectos negativos que se presentan por la presencia de

microorganismos sobre los alimentos que causan alteraciones y descomposición de los productos alimenticios causando las enfermedades transmitidas por alimentos conocidas como (ETA) (Pelczar, 2019, p.14).

Los alimentos y los humanos tienen una relevante asociación, además de su valor nutricional, estos también proveen un medio ideal para el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. El crecimiento microbiano se caracteriza por una serie de cambios intrínsecos relacionados al propio alimento y extrínsecos en base al entorno de los mismos que interactúan con la comunidad microbiana a través del tiempo (Prescott, 2004, p.1078). De esta manera los microorganismos pueden alterar los componentes del alimento proporcionándole estabilidad para una larga duración, también pueden brindar compuestos que producen sabores característicos como resultado de su producción; a esto se complementa que también hay la acción de microorganismos alterantes en el alimento que puede inducir a un deterioro que lo haga inaceptable para el consumidor (Andino y Castillo, 2010, p.7).

Desde el ámbito sanitario los alimentos se consideran vehículos de infecciones o intoxicaciones, de modo que se han implementado técnicas de control microbiológico en alimentos para la detección de los patógenos que ocasionan la descomposición de los alimentos lo cual constituye una parte importante en la microbiología de alimentos. En la mayoría de las ocasiones, la contaminación del alimento es consecuencia de las inadecuadas medidas higiénicas desde el productor hasta el consumidor en lo que se refiere a la manipulación de materias primas durante la producción, preparación, almacenamiento y transporte (Prescott, 2004, p.1078).

Por este motivo es fundamental la elaboración y conservación de productos con la mínima contaminación bacteriana, sea biótica o abiótica. Se debe considerar los siguientes aspectos:

- Identificar la fuente y los agentes contaminantes en la muestra de alimento.
- Determinar el potencial tóxico del o los agentes patógenos, valorar el impacto real sobre la salud de la persona que lo consume.
- Implementar educación higiénico sanitario en cada uno de los sectores de la cadena alimentaria, tanto productores primarios como secundarios, transporte, consumidores y organismos de control para la producción de alimentos sanos y organolépticamente aceptables.
- Identificar la fuente y los agentes contaminantes en la muestra de alimento, determinar el potencial tóxico del o los agentes patógenos, valorar el impacto real sobre la salud de la persona que lo consume
- Implementar educación higiénico sanitario en cada uno de los sectores de la cadena alimentaria, tanto productores primarios como secundarios, transporte, consumidores y organismos de control para la producción de alimentos sanos y organolépticamente aceptables (Andino y Castillo, 2010, p.8).

### ***1.2.1. Factores que influyen en el crecimiento microbiano en los alimentos***

El desarrollo o proliferación de microorganismo en los productos alimenticios no solo depende de las características físicas y nutricionales de los alimentos, además de ello existen un conjunto de factores denominados intrínseco y extrínseco de los alimentos y sus interacciones. Factores como la temperatura, el pH, actividad de agua y el potencial redox son consideradas como los factores más importantes que incrementan la proliferación microbiana en los alimentos (Húngaro et al., 2014, p.213).

Una ventaja que toma en consideración la industria alimentaria a lo largo de la producción es el hecho de que estos factores anteriormente mencionados pueden ser fácilmente manipulados durante la producción o desarrollo de los alimentos con el fin de prevenir o reducir a contaminación y el desarrollo de los microorganismos en los productos alimenticios (Vásquez, 2003, p.52).

#### ***1.2.1.1. Factores intrínsecos***

Los factores intrínsecos hacen relación a las características fisicoquímicas que presentan cada uno de los alimentos, para que los microorganismos pueden desarrollarse o proliferar en los alimentos requieren de condiciones óptimas y de los nutrientes necesarios como el agua, carbono, nitrógeno, oxígeno entre otros, mismos que lo toman de los alimentos donde se hospedan puesto que allí se encuentran los nutrientes necesarios que requieren para su proliferación (Vásquez, 2003, p.52).

Entre estos factores tenemos los siguientes:

#### **a) pH**

El pH es una medida que ayuda a calcular la acidez o alcalinidad de un ambiente está determinada por la concentración de iones de hidrógenos. Se considera pH neutro cuando presenta valores de 7, (por ejemplo, el agua), un medio ácido cuando su valor es inferior a 7 y es alcalino cuando su valor es superior. Se ha determinado que generalmente el desarrollo o crecimiento de los microorganismos se dan cuando el alimento presenta valores de pH de 7.0 neutro (Húngaro et al., 2014, p.214).

El valor de la concentración de iones de hidrógeno pH influye la clase de microorganismo que se desarrollara en el alimento y los cambios que originara en el mismo por lo tanto el pH que presente el producto alimenticio se considera uno de los principales factores indicativos de la supervivencia y proliferación de los diversos microorganismos durante el proceso de preparación, almacenamiento y distribución (Vásquez, 2003, p.52).



La gran diversidad de microorganismo presenta un pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo. Las bacterias se desarrollan óptimamente a pH de crecimiento entre 6.5 y 7.5, esta es una de las razones por las cuales los alimentos de origen animal, carnes y pescados son los responsables de la gran mayoría de intoxicaciones alimentarias ya que estos alimentos presentan un pH favorable para el desarrollo de dichos microorganismos (Vásquez, 2003, p.52).

#### **b) Potencial oxido-reducción**

El potencial redox, presenta un impacto fundamentalmente sobre el desarrollo microbiano en un alimento, puesto que la presencia de oxígeno en el ambiente determina la capacidad y velocidad de crecimiento microbiano. Por lo tanto, el potencial redox, es un indicador de las reacciones metabólicas de óxido reducción, que los microorganismos requieren con respecto a la presencia o ausencia de oxígeno. (Vásquez, 2003, p.53).

De allí la razón por la cual, los microorganismos aerobios requieren de valores de potencial redox positivos para su desarrollo mientras que los anaerobios con frecuencia requieren de valores redox negativo para su crecimiento. Con esto se comprende por qué existen bacterias donde su crecimiento solo se produce en presencia de oxígeno conocidas como aerobias, mientras que otras se desarrollan en ausencia de estas conocidas como anaerobias y las anaerobias facultativas que se pueden desarrollar en presencia o ausencia de oxígeno. Mientras que las que se conocen como microaerófilos requieren de una pequeña cantidad definida de oxígeno para su crecimiento (Vásquez, 2003, p.53).

#### **c) Actividad de agua (aw)**

La actividad de agua es otro factor esencial para el desarrollo y proliferación de microorganismos en el alimento, debido a que necesitan de la presencia de agua disponible, para llevar a cabo su ciclo de vida y funciones metabólicas dentro de la célula. Los microorganismos bacterianos se desarrollan óptimamente en presencia de una aw próxima a la unidad, sin embargo, cada especie bacteriana presenta requerimientos específicos que van a variar acorde con el tipo de microorganismo, así como también los nutrientes, pH, potencial redox entre otros (Vásquez, 2003, p.53).

Los alimentos frescos presentan una aw de 0.99, de manera general los microorganismos bacterianos requieren de una mayor aw que los hongos, y las bacterias gramnegativas requieren de una mayor aw que las bacterias grampositivas. La gran parte de bacterias responsables del deterioro de los alimentos se consideran que su requerimiento de aw es superior a un valor de 0.91 (Húngaro et al., 2014, p.215).

*Staphylococcus aureus* requieren para su crecimiento una aw de 0,86, por otro lado, el microorganismo *Clostridium botulinum* requiere de una aw de al menos 0,94. Los hongos filamentosos, levaduras pueden llegar a soportar un valor de pH más inferior que las bacterias, y lo mismo ocurre con actividad del agua. Las bacterias halófilas necesitan una aw de 0.75, los mohos xerófilos y las levaduras osmofílicas se pueden desarrollar en un ambiente con una aw de 0.65 y 0.61 respectivamente (Húngaro et al., 2014, p. 215). Cuando se reduce la actividad de agua por debajo del valor optimo se puede producir un incremento en la fase de retraso consecuencia de eso se reduce la tasa de crecimiento, al reducir la aw lo que produce en el microorganismo es un estrés osmótico, además cuando la actividad de agua no se encuentre en los niveles óptimos necesarios también se van a reducir las funciones metabólicas necesarias de la célula y por ende inhibir los procesos fisiológicos como la absorción de los nutrientes necesarios para su desarrollo y la replicación del material genético (Húngaro et al., 2014, p.215).

#### 1.2.1.2. Factores extrínsecos

Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales que rodea al alimento o a sus etapas de producción del mismo entre las más importantes se encuentran las siguientes:

##### a) La temperatura

Uno de los factores ambientales más influyentes e importante en el crecimiento de los microorganismos y por ende en el deterioro de un alimento es sin duda la temperatura. Los microorganismos bacterianos, las levaduras, mohos y en general la microbiota bacteriana que pueden producir una alteración de los alimentos, presentan un rango óptimo de temperatura en la cual sus funciones metabólicas y su desarrollo de crecimiento evidencian un rendimiento máximo (Húngaro et al., 2014, p.215).

Según (Húngaro 2014, p.215), estos microorganismos se pueden clasificar en diversos grupos relacionados a su rango óptimo de temperatura de crecimiento los cuales se pueden observar en la tabla 2-1.

**Tabla 2-1:** Clasificación de los microorganismos basados en su temperatura óptima

Clasificación de microorganismos en relación con la temperatura		
Microorganismo	Temperatura de crecimiento	Temperatura óptima
Psicotrofos	Crece bien a una temperatura de 7°C o menos	Un crecimiento optimo a una temperatura de 20 a 30 °C

<b>Mesófilos</b>	Se desarrollan bien a una temperatura de 20 a 45 °C o más	Con un desarrollo de crecimiento optimo a una temperatura de 30 a 40 °C.
<b>Termófilos</b>	Se desarrollan bien a 45 °C o más	Con un valor óptimo de temperatura de crecimiento de 55 a 65 °C

**Fuente:** Húngaro et al., 2014, p.215.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

La mayoría de los microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas de alimentos ETA a los seres humanos, son microorganismos mesófilos, con excepción de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, y *Clostridium botulinum* tipo E, que presentan un comportamiento psicrófilico. Mientras que *Alicyclobacillus*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus sporothermodurans* son considerados ejemplos de microorganismos termofílicos de importancia en alimentos e industrias de bebidas (Húngaro et al., 2014, p.215).

El uso de las bajas temperaturas es uno de los métodos más importantes que ayudan a frenar la actividad metabólica de los microorganismos en los alimentos, con esto ayudando a preservar la vida útil de alimentos procesados, pasteurizados y la comida cruda. La disminución de las bajas temperaturas va a detener el crecimiento de microorganismo mesófilos y termófilos, mas no de los microorganismos psicrófilos en cuales se pueden ralentizar su actividad metabólica ajustando otros parámetros intrínsecos y extrínsecos (Húngaro et al., 2014, p.215).

#### **b) Humedad relativa (HR)**

La humedad relativa representa la relación que existen entre la cantidad de vapor de agua contenida en el ambiente y cantidad máxima de aire que podría haber en un volumen atmosférico dado, cuando el alimento presenta un porcentaje de agua libre este suele a equilibrarse con la humedad del ambiente o viceversa; generalmente suele ocurrir un cambio entre el agua que presenta el alimento y el ambiente del que se encuentra el alimento, por ello es fundamental conocer la  $a_w$  de los alimentos y la humedad relativa de los sitios donde se almacenaran por productos alimenticios, puesto que es necesario para conocer el desplazamiento de agua (Vásquez, 2003, p.54).

Cuando existe una HR elevada va a favorecer la proliferación de los microorganismos, en especial aquellos que se encuentra a nivel de la superficie del alimento, es por ellos que su almacenamiento se debe de realizarse en condiciones donde exista una humedad relativa baja, caso contrario la humedad que se encuentra presente en el ambiente atmosférico incrementara a cantidad de agua del alimento y con ello el riesgo de la proliferación microbiana.

### 1.2.2. Principales microorganismos patógenos que se pueden encontrar en los alimentos

Los alimentos tienen un rol importante en lo que respecta a la transmisión de enfermedades de origen alimentario (ETA), puesto que la contaminación puede llevarse a cabo mediante factores como el aire, agua, animales, utensilios utilizados durante su producción e incluso el mismo ser humano al practicar malos hábitos higiénicos y/o sanitarios durante el proceso de producción de la materia prima, el transporte, almacenamiento, elaboración y distribución de estos (Vásquez, 2003, p.48). Debido a esto las ETA son una de las causas más importantes de mortalidad en los países industrializados y los que se encuentran en vía de desarrollo.

En la tabla 3-1 se describe los principales microorganismos patógenos que se pueden encontrar en los alimentos.

**Tabla 3-1.** Principales microorganismos causantes de ETA

Microorganismo (Nombre Científico)	Agente etiológico	Periodo de incubación del desarrollo de ETAs	Habitad	Síntomas de la intoxicación
<i>Escherichia coli</i>	Serotipos de <i>Escherichia coli</i>	De 10 a 12 horas, rango de 5 a 48 horas	Huésped en el intestino del hombre y animales, su presencia es un indicador de contaminación fecal y como indicadores de calidad higiénica.	Dolor de cabeza, malestar general, fiebre, escalofríos, diarrea, vómitos, dolor abdominal. Duración: unos días
<i>Salmonella</i>	Infección específica por <i>Salmonella spp.</i>	Promedio alrededor de 18 horas; rango de 7 a 72 horas	Habitad natural el intestino del ser humano y animales, las heces son foco de contaminación de los alimentos y el agua. Los alimentos como: huevos crudos, aves mal cocidas, alimento sin refrigeración por varias horas están	Dolores abdominales, diarrea, escalofríos, fiebre, vómitos frecuentes, postración. La infección dura alrededor de 1 día a 1 semana.

			involucrados en este tipo de infecciones.	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Enterotoxina estafilocica	Presenta un promedio de 3 horas.	Presente en la piel, nariz, boca y manos, considerados un foco de infección cuando existen cortes en las manos, presencia de heridas infectadas y los furúnculos. En pequeñas cantidades se encuentran presente en carnes crudas y alimentos que han sido manipulados por periodos largos de tiempos por el ser humano.	Vómitos, diarreas, espasmos intestinales, en ocasiones escalofríos y mareos; es producida por una toxina que desarrolla la bacteria en el alimento.
<b><i>Shigella</i></b>	<i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella boydii</i> .	De 24 a 48 horas; rango de 7 a 48 horas	Manipuladores enfermos o portadores, se transmiten a los alimentos mediante la manipulación por contacto directo o indirectamente por agua contaminada por el hombre.	Calambres abdominales, fiebre, escalofríos, diarrea, espasmos, dolor de cabeza, náuseas. Tiene un tiempo de duración de unos días.
<b><i>Costridium botulinum</i></b>	Toxina de <i>Clostridium botulinum</i>	De 1 a 2 días; rango de 12 horas a más de 1 semana.	Las esporas de la toxina del <i>Clostridium botulinum</i> están ampliamente distribuidas en el suelo.	Frecuentemente náuseas, vómitos y diarrea en las primeras etapas, dificultad para respirar, seguidamente de la muerte ocasionada por la parálisis de los

				músculos de la respiración.
<b>Listeria</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	De 9h a 48h	Su habidad natural suelo, aguas residuales, materia fecal, vegetación en descomposición	Frecuentemente fiebre, náuseas, vómito, diarrea, encefalitis, meningitis, cansancio, dolor muscular
<b>Bacillus cereus</b>	Produce dos tipos de enterotoxina: vomitoxina (cereulida, termoestable) y diarreogénica (termolábil).	1h a 24h	Se encuentra en el suelo, polvo, agua no potable, heces de animales y seres humanos, alimentos crudos, enlatados y procesados.	Los principales síntomas son diarreas, vómitos frecuentes, calambres abdominales.
<b>Campylobacter</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>	2 a 10 días.	Se encuentra con mayor frecuencia en la leche cruda y como principales reservorios y vehículos la carne cruda de res, pollo o pescados o que no se encuentren bien cocidos.	Calambres abdominales, náuseas, vómitos, diarreas, dolores musculares, cefaleas.

**Fuente:** Larrea-Murrell et al., 2013, p.25; Tecnología de alimentos, 2020, p.16.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

### 1.3. Colecciones Microbianas o Cepario

Las colecciones microbianas o Cepario corresponden a depósitos *ex situ* de microorganismo que han sido aislados de su ambiente natural cuyo objetivo es la aseguración, preservación, mantenimiento y biodisponibilidad de las características de los microorganismos, siendo esta la base del conocimiento actual sobre la diversidad microbiana útil para futuros estudios de actividades de docencia, investigación y comerciales (González y Jiménez, 2013, pp.23-24; Bagatolli, 2017, p.24). Durante los últimos años se ha observado una mayor valoración en las colecciones de

cultivos de microorganismo tanto para su preservación como para fines en el desarrollo biotecnológico mundial (Acosta, 2019, p.10).

La conservación de microorganismo es una herramienta de gran importancia y utilidad en diversas áreas entre ellas están los ensayos microbiológicos que requieren que los microorganismo presenten características viables durante su tiempo de conservación para posteriores ensayos, producción de alimentos, desarrollo de tecnologías para diversos diagnósticos, fabricación de vacunas, diseño de modelos para tratamientos de enfermedades, apoyo de estudios de enfermedades de origen infeccioso, en la industria donde requieren de microorganismo que presenten características identificadas para su utilidad entre otras (González y Jiménez, 2013, p.25; Pacheco y Serpas, 2013, p.5).

### ***1.3.1. Sistema de Calidad***

Es importante tomar en cuenta todas las normas de bioseguridad con respecto a la manipulación de agentes químicos, físicos y biológicos (González y Jiménez, 2014, p.28). El propósito de las colecciones de cultivos es garantizar la estabilidad de un producto, de modo que se deben aplicar medidas de aseguramiento y control de la calidad con el fin de que los resultados sean reproducibles. En 1996, se decretan los aspectos fundamentales que deben efectuar las colecciones de cultivos microbianos y se considera un aval para depósitos seguros o patentados, es así, que se da la implementación de normas de calidad altamente reconocidas como la Organización Internacional de Normalización (ISO 9001:2000) y esquemas de acreditación de laboratorio, que, aunque no son específicas para las colecciones, se aplican para garantizar su correcto funcionamiento (Montes de Oca et al., 2008, p.18).

### ***1.3.2. Requerimientos para la aplicación de un método de conservación***

Los diferentes métodos de conservación deben cumplir con tres objetivos para garantizar una correcta conservación de cepas microbianas y estos son:

- los cultivos por conservar deben ser puros, previniendo que se generen contaminaciones durante en proceso de conservación,
- mantener durante el tiempo de conservación un 70-80% de microorganismos vivos y
- finalmente, que los microorganismos sean viables manteniendo una estabilidad bioquímica, microscópica y genética (García y Uruburu, 2012, p.12).

### 1.3.3. Factores que influyen en la conservación microbiana

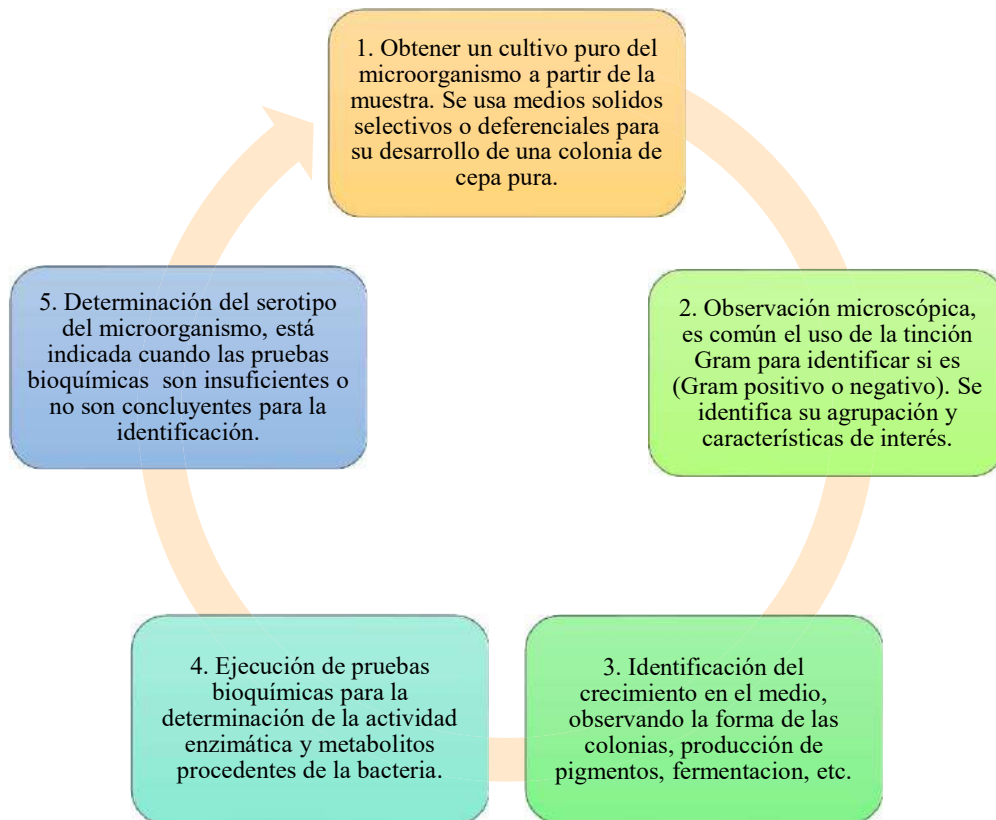
Durante la selección de un método de conservación de microorganismo existen diversos factores que deben ser considerados entre ellos tenemos:

- La naturaleza del microorganismo que se desea conservar debe tener una velocidad de crecimiento alta, fácilmente recuperable en el cultivo específico, ser puro y viable.
- El tipo de conservación, puesto que existe métodos de corto, mediano y largo plazo (García y Uruburu, 2012, p.12).

### 1.4. Métodos de Identificación Microbiana

En la mayoría de los procedimientos no solo se utiliza un único método para la identificación, más bien se hace uso de varios métodos en combinación para lograr el objetivo y llegar a la detección del agente etiológico responsable del cuadro infeccioso o deterioro de un alimento.

En cada procedimiento es preciso el previo aislamiento del microorganismo en la muestra para su posterior identificación. El procedimiento para seguir se describe en la figura 1-1.



**Figura 1-1.** Pruebas bioquímicas para la identificación microbiana.

**Fuente:** Procedimientos Diagnósticos, 2005, p.3.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.



### 1.4.1. Métodos Fenotípicos

Son métodos convencionales en los que se identifican las características fenotípicas del microorganismo, son accesibles, de bajo costo y fácil realización. Las pautas tradicionales de identificación se basan principalmente en la observación microscópica y macroscópica de las bacterias, además simultáneamente el estudio de las enzimas del metabolismo, requerimientos nutricionales a través de pruebas bioquímicas. Cuando el cultivo es factible este medio sigue siendo el método de elección, ya que permite aislar el microorganismo implicado, identificarlo y posteriormente la ejecución de un ensayo de sensibilidad frente antimicrobianos. Cabe recalcar que es importante la elección del medio de crecimiento y los parámetros de incubación (Bou et al., 2011, p.602).

#### a) Características microscópicas

Son todas las cualidades que a través de un estudio microscópico en fresco o tras una tinción, se puede observar de nuestro microorganismo aislado, el cual brinda ventajas para identificar las características bacterianas tales como a través de la tinción, permite aumentar el contraste de la célula bacteriana del medio que lo rodea, permite distinguir el tipo de bacteria de acuerdo con su capacidad de tinción, permite también establecer su morfología, su agrupación, su estructura y su tamaño (Luna Fontalvo, 2012, p.25).

#### b) Características macroscópicas

Son todas las características que se observan a simple vista y abarcan la a apariencia general de un microorganismo ya que la mayoría las bacterias se multiplican rápidamente tienden a formar colonias que son visibles a simple vista (Fernández et al., 2010, p.4). Cómo se lo detalla a continuación en la tabla 4-1.

**Tabla 4-1.** Principales características fenotípicas

<b>Criterio</b>	<b>Característica</b>	<b>Fundamento/Interpretación</b>
<b>Identificación Macroscópica</b>	Morfología de la colonia	<ul style="list-style-type: none"><li>- Forma: circular, filamentosa, puntiforme, fusiforme.</li><li>- Textura: Lisa/Rugosa, Mate/Brillante, Seca/Cremosa, Invasiva/Superficial</li><li>- Borde: enteros, estrellados, redondeado, filamentoso, rizoide</li><li>- Elevación: elevada, plana, convexa.</li><li>- Color, olor, pigmentos (tiñen el medio).</li><li>- Hemolisis: Beta: Zona clara alrededor de la colonia Alfa: Halo verdoso alrededor de la colonia</li></ul>

<b>Identificación Microscópica</b>	Morfología de las células (agrupaciones)	Cocos	- Cocos - Diplococo - Estafilococo: tétradas o racimos - Estreptococo: en parejas o cadenas
		Bacilos	- Bacilo - Diplobacilo - Cocobacilo - Estreptobacilo
		Espirilos	Aparecen agrupados formando cadenas cortas, no es frecuente.
	Tinción diferencial	Tinción Gram	- Gram positivos - Gram negativos
		Ziehl Neelsen	Propiedades ácido alcohol resistentes.

**Fuente:** Romo Mejía, 2012, pp.115-125; Navarrete, 2017, pp.22-23.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

#### 1.4.1.1. Tinción Gram

La tinción de Gram permite diferenciar a las bacterias en dos significativos grupos. Las llamadas Gram positivas las cuales retienen la tinción azul-violeta y las Gram negativas las cuales se decoloran y posteriormente se tiñen con safranina. Esta diferencia en su tinción se debe básicamente a la estructura que poseen ambos tipos de bacterias en lo que se refiere a la pared celular tabla 5-1. Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida de peptidoglicanos y polímeros, además de ser impermeable, esto hace que resista a la decoloración. Por otra parte, las bacterias Gram negativas poseen una capa más delgada de peptidoglucano más una bicapa de lipoproteínas que fácilmente se deshace con la coloración. Actualmente esta tinción sigue siendo un método importante, eficaz, rápido y económico en el laboratorio (Rodríguez y Arenas, 2018, p.166-167).

**Tabla 5-1.** Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

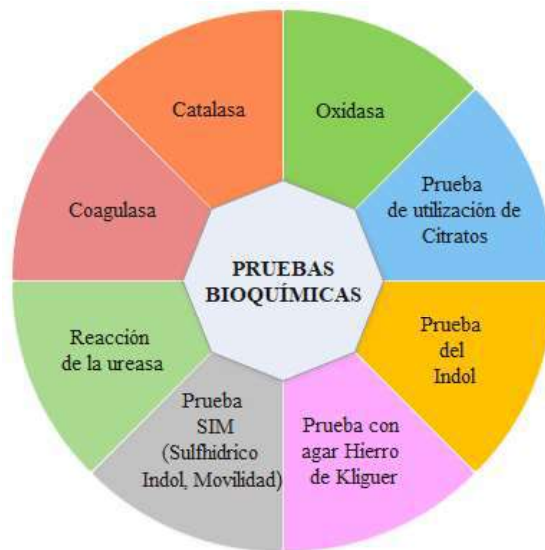
Características	Bacterias Gram Negativas	Bacterias Gram Positivas
Color de la tinción Gram	Rojo	Violeta
Pared celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en la pared celular	Presente	Ausente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Ausente	Presente

**Fuente:** Rodríguez y Arenas, 2018, p.166-167.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

#### 1.4.2. Pruebas tradicionales bioquímicas

Permiten determinar la actividad metabólica de una cepa pura la cual debe ser cultivada en medios específicos con sustancias nutritivas y mediante reactivos específicos determinar los productos generados por la acción de dichos microorganismos se realiza la detección de los componentes metabólicos o sensibilidad del sustrato a metabolizar, empleados principalmente para identificar y clasificar las bacterias objeto de identificación (Luna Fontalvo, 2012, p.40). En la siguiente figura 2-1, algunas de estas pruebas bioquímicas importantes.



**Figura 2-1.** Pruebas bioquímicas tradicionales de identificación microbiana

Fuente: Romo Mejía, 2012, p.115-125.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

#### 1.4.3. Métodos Moleculares

Los métodos microbiológicos convencionales son laboriosos e implica tiempo en la obtención de resultados que puede tomar de días a semanas, además presentan baja sensibilidad. Aunado a ello se ha demostrado que algunas bacterias debido al procesamiento mismo del alimento se encuentran en estado viable pero no cultivable, lo que limita el uso de métodos de cultivo como mecanismo de diagnóstico. Por tal motivo se han desarrollado métodos alternativos para la identificación y tipificación de bacterias que a su vez son rápidos, eficiente y más sensibles en la detección del agente causal de contaminación microbiana y contrarrestar estos inconvenientes (Palomino y Gonzáles, 2014, p.535-537).

Uno de estos métodos moleculares es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), este es un procedimiento muy utilizado debido a su protocolo automatizado, rápido y fácil de utilizar.

Comúnmente para un ensayo de PCR se requiere de 2-3 horas, sin embargo, hoy en día se están desarrollando técnicas de PCR más evolucionadas que permitan obtener resultados en cuestión de minutos. Gracias a este método el cual consiste en amplificar de manera selectiva un fragmento de ADN de interés a millones de copias, se han logrado detectar y cuantificar bacterias patógenas como *la Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, entre otras (Palomino y Gonzáles, 2014, p.535-537).

## **1.5. Métodos de conservación bacteriana**

La conservación es un método que garantiza la supervivencia de los microorganismos mediante la reducción del ritmo metabólico cuyo objetivo es mantener la estabilidad genética, morfológica, viabilidad y pureza de la cepa bacteriana durante largos periodos de tiempo, necesarias para fines pedagógicos, investigativos e incluso para el desarrollo biotecnológico (González y Jiménez, 2013, p.24).

### ***1.5.1. Métodos de conservación a corto plazo***

#### ***1.5.1.1. Cultivo continuo***

Este método consiste en realizar una resiembra periódica del cultivo del medio seco a uno fresco. Este proceso de transferencia tiene sus desventajas, puesto que al mantenerse las células activas se van acumulando desechos tóxicos producto del metabolismo, lo que conlleva al envejecimiento y muerte celular. Además, en cada transferencia hay un riesgo elevado de contaminación, la probabilidad de mutaciones, cambios fenotípicos y en consecuencia la pérdida de los cultivos. Este método de resiembra por medio de tubos en serie inclinados, en medio líquido y en refrigeración tiene una duración de 15 a 20 días de almacenamiento (Gutiérrez et al., 2015, p.96).

#### ***1.5.1.2. Conservación de cepas bajo una capa de aceite mineral o una tapa de cera***

Son técnicas simples y efectivas para prolongar la conservación de varios organismos, para aplicar este método se cubre completamente el cultivo, con una capa de aceite mineral, vaselina estéril o nugol sobre el medio sólido a la par se utiliza de un capuchón metálico o de papel de parafina para su protección (García, 2013, p.7).

Estos cultivos se los puede mantener a temperatura ambiente o de preferencia en refrigeración por periodos de varios años. Sin embargo, algunos autores coinciden que en estas condiciones los microorganismos continúan su reproducción con la aparición de mutaciones que afecta en la

viabilidad de las cepas. Pero estas alteraciones no se observan hasta después de los tres años de conservación (García, 2013, p.8).

#### *1.5.1.3. Cultivos profundos en Agar*

Este es un método apropiado para microorganismos anaerobios que han sido aislados desde el suelo, se utiliza un asa bacteriológica recta esterilizada con la cual se toma el inóculo, luego se introduce en forma vertical en el fondo del medio y se retira en la misma dirección por donde se insertó, por otro lado si el cultivo es en medio líquido se puede utilizar un asa bacteriológica curva esterilizada con la que se toma la cantidad de inóculo, para luego introducir en el centro del medio líquido, agitando luego sin tocar las paredes del tubo, las condiciones de almacenamiento e incubación dependerán del tipo de microorganismo (García, 2013, p.7).

#### *1.5.2. Métodos de conservación a medio plazo*

Para este tipo de métodos se estima una conservación de los cultivos entre dos y cinco años. Se resaltan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena estéril, sílica gel, perlas de vidrio, esferas de plástico o papel filtro) en el que la detención del crecimiento se ocasiona por eliminación del agua disponible, así como el almacenamiento en suelo estéril, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), métodos bien prácticos en especial para los hongos. Para este tipo de conservación se utiliza un soporte sólido para atenuar el metabolismo (García, 2013, p.8).

##### *1.5.2.1. Tierra fértil estéril*

Se añaden las células a sustratos como (sílica gel, arena etc.) que las protegerán de la desecación (García y Uruburu, 2012, p.12). Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante algún tiempo por este método entre ellos los (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*) (García, 2013, p.8).

##### *1.5.2.2. Desecación en papel de filtro*

Para este método se hace uso del papel absorbente (Whatmann n° 3) en el que se impregna una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). Otro medio por el que se puede desecar es a través del procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) para lo que se necesita el liofilizador, tomando en cuenta de que las células no hayan sido congeladas previamente. El vacío que produce el liofilizador deseca las células, pero

hay que controlar este proceso muy detenidamente para evitar congelación incontrolada de células (García y Uruburu, 2012, p.15).

### *1.5.2.3. Desección en bolitas de alginato*

Este método es bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se efectúa mediante soluciones hipertónicas sucesivas y luego la desecación al aire hasta que se pierde un 70% del agua. Las bolitas de alginato se pueden conservar herméticamente en tubos cerrados a una temperatura entre 4- 18 °C, incluso a -80°C debido al escaso contenido de agua de las células que brinda este método. Este método incluso se usa para la conservación de algas y células vegetales (García y Uruburu, 2012, p.15).

### **1.5.3. Métodos de conservación a largo plazo**

Son los mejores métodos para la conservación ya que detiene el crecimiento de las células microbianas, sin provocar su muerte además garantiza la estabilidad genética porque evita el desarrollo de nuevas generaciones sucesivas, entre los que incluyen la congelación (a -70° C y -196° C) y la liofilización (García, 2013, p.9).

#### *1.5.3.1. Conservación por Congelación*

Es un método muy utilizado porque logran un largo tiempo de conservación (si se utiliza nitrógeno líquido puede ser superior a 20 años), en este proceso se debe tomar en cuenta la formación de cristales a partir del líquido contenido en las células mientras ocurre la disminución de temperatura, porque si esta es muy lenta estos cristales podrían ser de gran tamaño y romper las membranas celulares (Hernández y Loaiza, 2014, p.15).

El frío enlentece las funciones vitales, es decir, se suprimen sus reacciones metabólicas, manteniendo las cepas viables por más tiempo (Hernández y Loaiza, 2014, p.16). Si se utiliza equipos de nitrógeno líquido permiten el almacenamiento a temperaturas bastante constantes, en comparación a los congeladores mecánicos que almacenan a temperaturas bajas (de -20 a -80 °C), pero estos están sujetos a variaciones de temperatura y comprometer la calidad de las cepas. Para reactivar las cepas se las recupera incrementando la temperatura, este método es el mejor desde todos los puntos de vista, sin embargo, es un inconveniente adquirir equipamiento especializado, además, un fallo en el sistema puede provocar una subida no deseada en la temperatura de almacenamiento. También resulta complicado realizar envío de cepas por este método (García y Uruburu, 2012, p.16).

### a) Factores que influyen en la estabilidad y viabilidad de las cepas conservadas

El método de conservación por congelación es el método de mayor elección y ventajas, pero hay que considerar algunos aspectos para evitar inconvenientes durante el proceso, existen cuatro que se mencionaran a continuación:

- **Edad de las células:** en la mayoría de los procedimientos se recomienda utilizar las células en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, es decir células maduras, ya que algunos microorganismos presentan en su ciclo vital algún estado que los prepara para condiciones adversas ejemplo los microorganismos que esporulan, por lo cual es preferible alcanzar este estado (García, 2013, p.10).
- **La velocidad de congelación y descongelación:** se recomienda que la variación en la temperatura tanto para congelación y descongelación sean de manera rápida, por lo que se recomienda para la descongelación poner las cepas a 37 °C.
- **Temperatura de almacenamiento:** se debe lograr la más baja temperatura posible, en tubos tapados y sellados, por lo general sumergidos en nitrógeno líquido, que bordea una temperatura de -195°C, o bien en nitrógeno líquido en fase gaseosa, con una temperatura de -140°C (García y Uruburu, 2012, p.17).
- **Empleo de crioprotectores:** estas sustancias son utilizadas para la protección del daño que pueda causar la congelación en las células vivas, es decir protegen de la formación de cristales de hielo porque tienen un bajo punto de congelación (menor a 0°C) y además tienen una baja toxicidad. La ventaja que tienen los crioprotectores es su característica físico-química pues tiene una afinidad por el agua molecular, pues atrapa a la molécula de agua en su interior, de esta manera se impide la formación de cristales geométricos ordenados, entonces la solidificación del medio tiene una distribución molecular desordenada del agua, donde la sustancia pasa a formar parte de un protector vítreo (Sánchez y Ramírez, 2005, p.109-110).
- Los crioprotectores que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada, suero, extracto de carne y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. (García, 2013, p.16). Un crioprotector ideal debe cumplir lo siguiente: ser altamente soluble en agua, penetrar dentro de la célula, tener una baja toxicidad, no ser reactivo (Prakash et al., 2013, p.3).

### b) Tipos de congelación en base a la temperatura

- **Congelación Ordinaria:** este tipo de congelación mantiene temperaturas de -5 a -20°C; en este intervalo, los microorganismos permanecen viables es decir cuando se reactivan conservan todas sus funciones y características por uno o dos años al menos.

- **Congelación Ultrafría:** se lo realiza en congeladores mecánicos con temperaturas entre -50°C y -80°C, aquí el cultivo por congelar se obtiene por medio de centrifugación de una suspensión de microorganismos o también por el raspado de un tubo que contiene una muestra en suspensión con las condiciones adecuadas para el crecimiento. Luego, el cultivo se suspende en un medio con glicerol o dimetilsulfóxido, que se coloca en tubos especiales (crio tubos) adicional a esto se debe controlarse la velocidad de congelación para mantener la viabilidad de la cepa y no sufra daños (Hernández y Loaiza, 2014, p.16).
- **Congelación con nitrógeno líquido:** es un método muy recomendado de conservación ya que se alcanzan temperaturas velocidad de -150 a -196°C. La rapidez de congelación debe ser 1 a 2°C/min hasta alcanzar una temperatura de -30°C, luego 1°C/min hasta -56°C, para luego colocar las muestras directo en el nitrógeno líquido (Hernández y Loaiza, 2014, p.16).

#### 1.5.3.2. Conservación por Liofilización

Esta técnica se basa en detener el metabolismo celular por deshidratación a través del congelamiento del agua libre de la célula seguido por un secado al vacío, lo cual resulta en sublimación del hielo de las células obteniéndose la liofilización. Si esto se logra el cultivo tiene la ventaja de mantenerlo al ambiente (18-20°C) sin pérdida significativa de la viabilidad. Este método es apropiado para conservar varios microorganismos dentro de los cuales están las Gram Positivas que tienen una mejor supervivencia a las Gram Negativas cuando se las liofiliza. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos, muchos hongos y levaduras, que a su vez tiene un tiempo de conservación de 15 a 20 años (García, 2013, p.12).

Para la liofilización, así como la congelación también se recomienda el uso de crio protectores como el inositol para la mayoría de las bacterias y para hongos y actinomicetos leche descremada, en algunos microorganismos se usa como por ejemplo el glutámico glutamato cuando son bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o *chopped meat* (sin carne) para bacterias anaerobias, etc. (García y Uruburu, 2012, p.12).

## 1.6. Medios de cultivo

Un medio de cultivo se define como la mezcla de nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para el desarrollo de microorganismos. Poseen varia diversidad metabólica, por lo tanto, hay una extensa variedad de medios de cultivo, la elección depende principalmente del tipo de microorganismo utilizado y del producto que se quiera conseguir (Gamazo et al., 2005, p.7).



### 1.6.1. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden clasificarse de acuerdo con su estado físico como se describe en la tabla 6-1.

**Tabla 6-1:** Clasificación de medios de cultivo según su estado físico

Medios	Descripción
<b>Sólidos</b>	Comúnmente llamados agares. Contienen una proporción de agar de alrededor del 1,5%. Se pueden colocarse en placas de Petri o en tubos de ensayo y su crecimiento microbiano se desarrolla en la superficie del medio. Ej. agar MacConkey.
<b>Líquidos</b>	Comúnmente llamados caldos. Estos medios no poseen un agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen en todo el medio. El crecimiento es más rápido debido a que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes. Ej. Caldo nutritivo.
<b>Semisólidos</b>	Son aquellos que contienen el agar en menor concentración que los sólidos inferiores al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad. Ej. Agar SIM.

Fuente: Barrero Cuevas, 2009, p.40.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

Según su composición química los medios se clasifican en naturales, sintéticos y semisintéticos, se detallan en la tabla 7-1.

**Tabla 7-1:** Clasificación de medios de cultivo según su composición química

Medio	Descripción
<b>Naturales</b>	Son aquellos que se preparan a partir de sustancias naturales de origen animal o raramente vegetal puede ser extractos de tejidos o infusiones. Su composición no está exactamente definida. Ej. Leche, huevos, etc.
<b>Sintéticos</b>	Son medios que contienen sustancias químicas conocidas que disueltas en agua proporcionan una composición definida y constante. Ej. agar eosina azul de metileno.
<b>Semisintéticos</b>	Son aquellos medios sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento a través de un extracto orgánico complejo, como por Ej. extracto de levadura.

Fuente: López y Torres, 2006, p.15.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

De acuerdo con su utilización se han clasificado como medios comunes, de enriquecimiento, selectivos, diferenciales y mantenimiento. A continuación, en la tabla 8-1 se muestran los tipos de medios de cultivo:

**Tabla 8-1:** Tipos de medios de cultivo

<b>Medios de cultivo</b>	<b>Descripción</b>
<b>Comunes o Universales</b>	Permiten el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.
<b>Enriquecimiento</b>	Benefician el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin la necesidad de inhibir totalmente el crecimiento de los demás.
<b>Selectivos</b>	Favorecen el crecimiento del microorganismo de interés inhibiendo al resto, a través de sustancias inhibitorias.
<b>Diferenciales</b>	Permiten distinguir diferencias metabólicas de varias especies o géneros de bacterias. Se incorpora alguna sustancia que puede ser metabolizada solo por el microorganismo de interés.
<b>Mantenimiento</b>	Medios de variada composición cuyo objetivo es mantener la viabilidad y las características fisiológicas de un cultivo bacteriano.

Fuente: Gamazo et al., 2005, p.8.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

### **1.6.2. Medios de cultivo para el aislamiento bacteriano**

Durante el proceso de aislamiento se utilizan varios agares e incluso caldos nutritivos para el desarrollo y recuperación bacteriana, los cuales se mencionan a continuación.

**Tabla 9-1:** Caldos utilizados para reactivación de cepas

<b>Medio</b>	<b>Uso</b>	<b>Fundamento</b>
<b>Caldo Nutritivo</b>	Medio para crecimiento en general de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.	Es un medio no selectivo, contiene pluripectona (peptona de carne y caseína) además extracto de carne que compone una fuente de carbono y nitrógenos muy útil para el desarrollo bacteriano.
<b>Caldo Soya Tripticasa</b>	Medio ideal para el crecimiento de microorganismos exigentes. Y para pruebas de esterilidad.	La tripteína y la peptona de soya ofrecen nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos, minerales y vitaminas. El cloruro de sodio controla el balance osmótico. La glucosa

		es fuente de energía y el fosfato dipotásico actúa como buffer.
<b>Caldo Tetracionato</b>	Medio utilizado para el enriquecimiento y recuperación de cepas del género Salmonella, con adición de solución de yodo, a partir de muestras de heces, alimentos y otras muestras de interés sanitario.	Contiene peptona que brinda los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano además del carbonato de calcio que retiene y neutraliza los metabolitos tóxicos. La selectividad es dada por las sales biliares que, junto con la solución de yodo, inhibe el crecimiento de la flora Gram positiva y varias enterobacterias.

Fuente: Laboratorios Britania, 2020.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Tabla 10-1:** Agares utilizados para siembra de microorganismos reactivados

Medio	Uso	Fundamento
<b>Agar Manitol Salado</b>	Es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento y enumeración de microorganismos Gram positivos pertenecientes al género <i>Staphylococcus</i> .	Gracias a la elevada salinidad que contiene este medio actúa como inhibidor y evita el crecimiento de flora Gram negativas. Es diferencial por la presencia del carbohidrato manitol y al indicador de pH rojo de fenol, a partir de este, los microorganismos capaces de fermentar el manitol acidifican el medio, volviéndose las colonias y el medio de color amarillo. Los estafilococos pueden o no fermentar el manitol.
<b>Agar MacConkey</b>	Se usa para el aislamiento selectivo y la identificación de <i>Enterobacteriaceae</i> . También es útil para el aislamiento de bacterias Gramnegativas entéricas.	Las peptonas aportan nutrientes para el desarrollo microbiano, la lactosa es el carbohidrato ha fermentar, las sales y el cristal violeta inhiben el desarrollo de flora Gram positiva, entonces cuando fermenta la lactosa, disminuye el pH y se evidencia un viraje de color del indicador de pH (rojo neutro) y las colonias son rosadas con un halo de precipitación biliar. Las bacterias que no fermentan lactosa producen colonias incoloras.

<p><b>Agar EMB (Eosina Azul de Metileno)</b></p>	<p>El agar con eosina azul de metileno es un medio de diferenciación usado para el cultivo de <i>Enterobacteriaceae</i>.</p>	<p>Contiene peptona por lo que se considera agar nutritivo, la diferenciación se da debido a la presencia de lactosa, por lo tanto, hay microorganismo que fermentan lactosa y otros que no lo hacen, por otra parte, los indicadores eosina y azul metileno ejercen inhibición sobre la mayor parte de flora grampositiva. Las colonias de <i>Escherichia coli</i> y <i>Citrobacter spp.</i> poseen un brillo metálico, y las que utilizan lactosa tienen un centro oscuro con periferia azul o rosada.</p>
<p><b>Agar Müller Hinton</b></p>	<p>Es un medio enriquecido no selectivo utilizado para ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos (antibiograma).</p>	<p>Su composición hace que las sustancias se dispersen con facilidad sobre él, siendo esencial en la prueba de susceptibilidad por el método de difusión en disco, posee poca presencia de inhibidores, permite que se evalúen las sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas. Se puede agregar sangre al 5% para prueba de sensibilidad de <i>Streptococos</i>.</p>
<p><b>Agar Sangre</b></p>	<p>Es un medio enriquecido para el cultivo de microorganismos exigentes y la determinación de reacciones de hemolisis.</p>	<p>Se puede preparar con agares base como: agar Columbia, agar tripticasa de soya entre otras. La infusión del musculo corazón y la peptona, proveen al medio un importante valor nutritivo, además del agregado de sangre estéril que brinda las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos exigentes sin interferir en la reacción de hemolisis.</p>
<p><b>Agar SS Salmonella - Shigella</b></p>	<p>Medio utilizado para el aislamiento de Salmonella y Shigella, a partir de muestras de alimentos y otros en los que pueda ser sospechosa su presencia.</p>	<p>El verde brillante, las sales biliares, el citrato y tiosulfato, inhibe el crecimiento de cocos grampositivos y otros bacilos gramnegativos. La presencia de lactosa permite diferenciar <i>Salmonella/Shigella</i> debido a que no fermentan lactosa. Las colonias lactosa-positiva se presentan de color rosa o rojo mientras que las lactosa-negativas son incoloras. También se visualiza bacterias que producen <math>H_2S</math> por la</p>

		reducción del tiosulfato, que en presencia de iones hierro dan una coloración en el centro negra.
--	--	---

**Fuente:** Laboratorios Britania, 2020; Álvarez et al., 1995.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

Para estudiar y conocer qué tipo de microorganismo aislado está presente en una muestra se acude a la identificación taxonómica de las bacterias a través de pruebas bioquímicas, que se mencionan a continuación en la tabla 11-1.

**Tabla 11-1:** Medios de cultivo y ensayos para identificación - pruebas bioquímicas

<b>Medio</b>	<b>Uso</b>	<b>Fundamento</b>
<b>Catalasa</b>	Técnica utilizada para la identificación de la enzima catalasa en aquellas bacterias aerobios y anaerobias facultativas que contienen citocromo oxidasa. El objetivo es apartar <i>Micrococaceae</i> (positiva) de <i>Streptococcus spp.</i> y <i>Enterococcus spp.</i> (negativa) (Fernández et al., 2010, p.6).	Las bacterias que sintetizan catalasa catalizan la ruptura del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se produce su liberación en forma de burbujas (Fernández et al., 2010, p.6).
<b>Coagulasa</b>	Se utiliza para evidenciar la presencia de la enzima coagulasa y cuando en tinción se presentan como cocos Gram positivos, catalasa positivos. Técnica eficaz para la diferenciación de <i>S. aureus</i> (positivo) de otras especies de <i>Staphylococcus</i> (Luna Fontalvo, 2012, p.41).	Se basa en que los <i>Staphylococcus</i> desprenden una sustancia (procoagulasa) que, al unirse con el activador presente en el plasma, permiten la formación de la coagulasa que actúa como agente coagulante (Luna Fontalvo, 2012, p.41).
<b>Oxidasa</b>	Técnica que permite medir la actividad del citocromo C presente en algunos géneros bacterianos como <i>Pseudomonas</i> y <i>Neisseria</i> . Para la determinación se usa la técnica de tiras de papel de oxidasa (Luna Fontalvo, 2012, p.42).	La actividad es determinada a través de la oxidación de un reactivo indicador como el para-amino-dimetilamina o el tetra-metil-para-fenilendiamina (hidrocloruro) y se manifiesta por el desarrollo de un color que va del

		rosa a la púrpura (Luna Fontalvo, 2012, p.42).
<b>Agar Hierro de Kligler (KIA)</b>	Medio de cultivo diferencial eficaz para la determinación de la capacidad de los microorganismos de fermentar azúcares y producir H <sub>2</sub> S de enterobacterias. Contiene dos azúcares: lactosa y glucosa (Laboratorios Britania, 2020, p.1).	El medio contiene peptona de carne y tripteína que aportan los nutrientes para el crecimiento. La lactosa y la glucosa son los carbohidratos fermentables que producen ácidos que mediante el indicador rojo fenol viran al color amarillo. El tiosulfato de sodio reduce al sulfuro de hidrogeno que al reaccionar con una sal de hierro forma el sulfuro de hierro presentando una coloración negra (Laboratorios Britania, 2020, p.1).
<b>Agar Citrato de Simmons</b>	Utilizada para la diferenciación de enterobacterias que pone de manifiesto la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono y energía (Laboratorios Britania, 2020, p.1).	Su composición hace que las bacterias extraen el nitrógeno de la sal de amonio, originando la alcalinidad del medio. Esta alcalinidad es detectada por indicador del pH como el azul de bromotimol, que se mantiene azul si el pH es superior a 7,6, de lo contrario vira a verde si es neutro y a amarillo si es inferior a 6 (Romo,2012, p.117).
<b>Agar Base Urea</b>	Utilizado para identificar microorganismos en base a la capacidad de hidrolizar la urea, entre ellos Proteus spp. Algunas enterobacterias y estafilococos (Laboratorios Britania, 2020, p.1).	La tripteína y la glucosa aportan los nutrientes para el crecimiento microbiano, las bacterias que hidrolizan a la urea mediante la ureasa, liberan amoniaco y dióxido de carbono, los mismos que alcalinizan el medio haciendo vira el indicador rojo de fenol de color amarillo a rojo (Laboratorios Britania, 2020, p.1).

<p><b>Agar SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)</b></p>	<p>Medio semisólido utilizado para comprobar en bacterias de la familia Enterobacteriaceae la movilidad y la producción de ácido sulfúrico e indol (Laboratorios Britania, 2020, p.1).</p>	<p>A partir del triptófano elemento de las peptonas del medio puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol que al combinarse con el reactivo de Kovac's origina un anillo rojo en la superficie. El tiosulfato de sodio algunos microorganismos forman ácido sulfúrico que al reaccionar con el hierro presentan una coloración negra. La movilidad se determina por el enturbiamiento del medio o crecimiento presente más allá de la línea de siembra (Laboratorios Britania, 2020, p.1).</p>
<p><b>Agar Manitol Salado</b></p>	<p>Es un medio utilizado para el aislamiento de microorganismos estafilococos Gram positivos a partir de diversas muestras (Laboratorios Britania, 2020, p.1).</p>	<p>Debido a la presencia del carbohidrato manitol y al indicador de pH rojo de fenol, hace que las bacterias capaces de fermentar el manitol acidifican el medio, volviéndose las colonias y el medio de color amarillo (Laboratorios Britania, 2020, p.1).</p>

**Fuente:** Fernández et al., 2010; Luna Fontalvo, 2012; Laboratorios Britania, 2020.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## CAPÍTULO II

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1. Metodología de la investigación**

##### ***2.1.1. Localización de la Investigación***

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, localizada en la ciudad de Riobamba Panamericana Sur Km 1 ½.

##### ***2.1.2. Tipo y diseño de la Investigación***

El presente estudio tiene un diseño no experimental, descriptivo y transversal.

##### ***2.1.3. Población de estudio y/o tamaño de la muestra y/o método de muestreo***

La población de estudio serán las bacterias presentes en las muestras de ceviches de chochos de venta ambulatoria en la ciudad de Riobamba. La recolección de la muestra alimenticia se realizará mediante un muestreo aleatorio simple.

###### ***2.1.3.1. Criterios de inclusión***

Cepas bacterianas puras, viables, estables tanto microscópica, genética y bioquímicamente.

###### ***2.1.3.2. Criterios de exclusión***

Bacterias no viables, cepas contaminadas.

#### **2.2. Recolección de muestras**

Se realizó un muestreo aleatorio de cuatro muestras de ceviche de chochos que se expendían en carritos ambulorios en la ciudad de Riobamba.



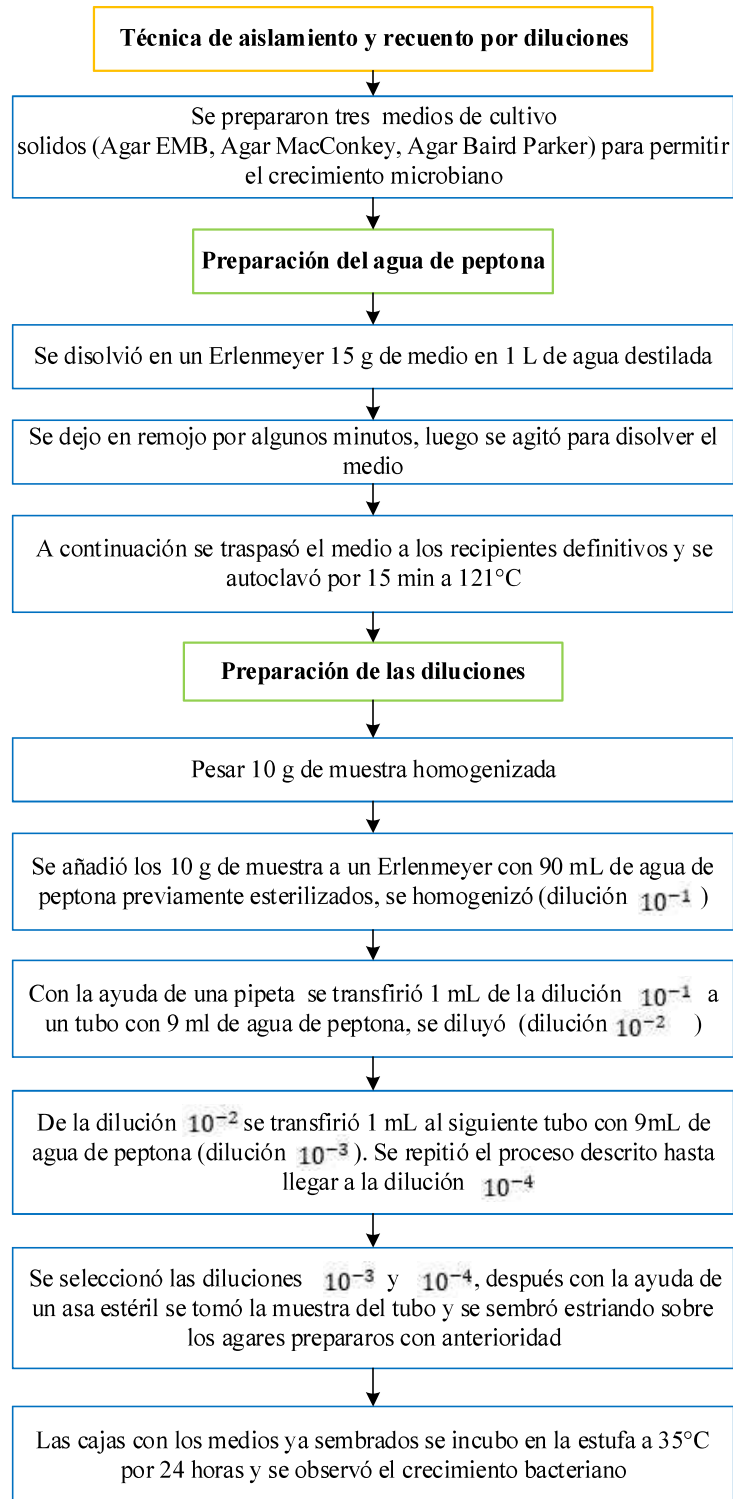
### ***2.2.1. Técnica para la toma de muestras***

- Las muestras de ceviche de chochos fueron recolectadas desde los carritos ambulantes que se expenden en la vía pública a través de un muestreo aleatorio.
- En condiciones asépticas se tomaron muestras representativas por duplicado y se conservaron en similares condiciones a las del momento de la toma.
- Los envases fueron sellados, etiquetados con la información del lugar de donde se tomó y la hora para el posterior análisis.
- Una vez recolectadas las muestras se trasladó al laboratorio de microbiología.
- Antes de abrir el envase se limpió la zona con alcohol al 70% sin flamear, asépticamente.
- El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm<sup>3</sup> o gramos, mínimo. Se seleccionó las muestras para ser utilizadas en el análisis microbiológico según lo especificado en la Norma de Calidad INEN ( NTE INEN 1529-2, 2013, pp.2-4).

### ***2.2.2. Homogenización de las muestras***

- Se procedió a desinfectar con alcohol el área de trabajo, los equipos y materiales a usar.
- Se colocó cada una de las muestras en fundas plásticas rotuladas.
- Se ubicó cada funda con la muestra en el Homogeneizador STOMACHER a 230 rpm por un tiempo de 5 minutos.
- Se retiró del equipo y se las llevó a la cámara de flujo laminar para evitar contaminación.

### 2.3. Técnica de aislamiento y recuento por diluciones



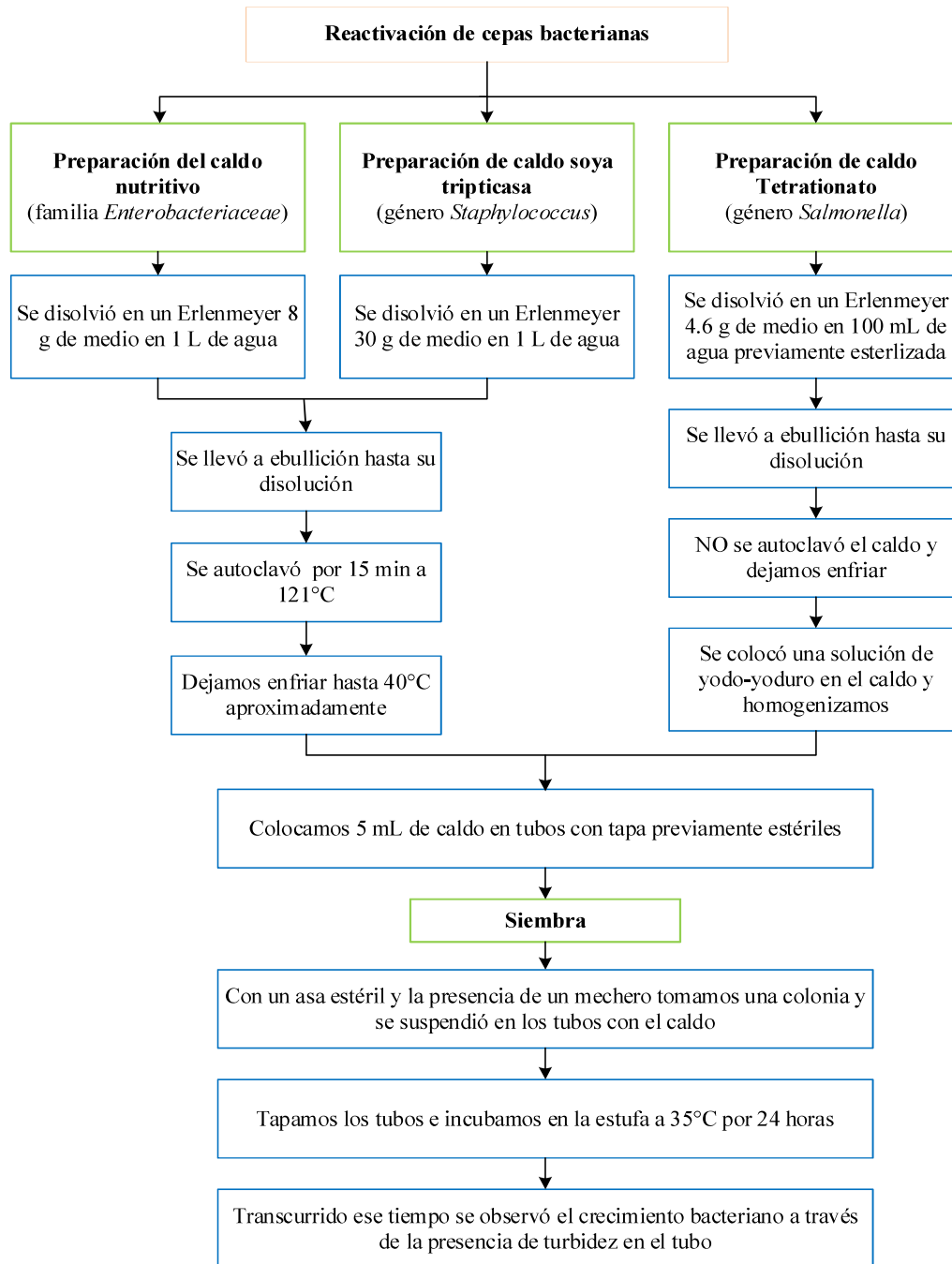
**Figura 1-2.** Procedimiento para la reactivación de cepas bacterianas.

**Fuente:** NTE INEN 1529-1, 2013. (Norma Técnica Ecuatoriana para Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## 2.4. Metodología para la reactivación de cepas bacterianas

Se detalla en la, figura 2-2, la reactivación de las cepas que permanecen en estado latente cuando se encuentran en refrigeración, se utilizó caldos nutritivos, cumpliendo con los requerimientos de cada microorganismo.



**Figura 2-2.** Procedimiento para la reactivación de cepas bacterianas.

**Fuente:** NTE INEN 1529-1, 2013. (Norma Técnica Ecuatoriana para Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

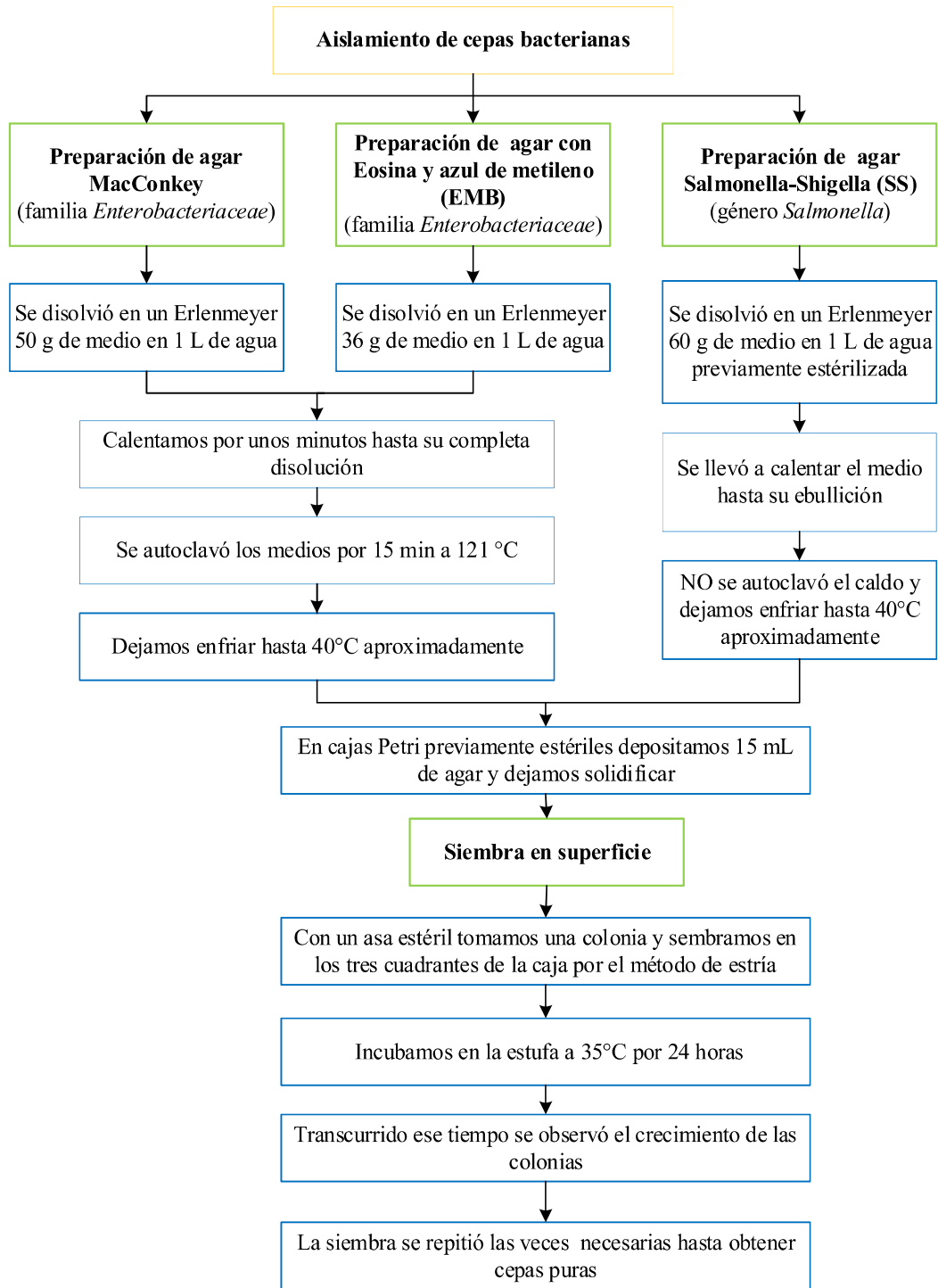
## **2.5. Aislamiento de bacterias**

El método más frecuente utilizado para el aislamiento es el traspaso o resiembra de un medio a otro, el objetivo es lograr que sigan sobreviviendo y se desarrollen en medios enriquecidos y específicos para cada microorganismo de manera que las cepas sean más puras.

### ***2.5.1. Metodología para el cultivo/aislamiento de la familia Enterobacteriaceae***

Para la identificación y conservación de microorganismos es necesario que las cepas bacterianas sean puras, para lo cual se realizó un proceso consecutivo de aislamiento.

Los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, se sembraron en agar MacConkey y las bacterias del género *Salmonella* en agar SS (Salmonella-Shigella) siguiendo la metodología que se describe a continuación, figura 3-2:



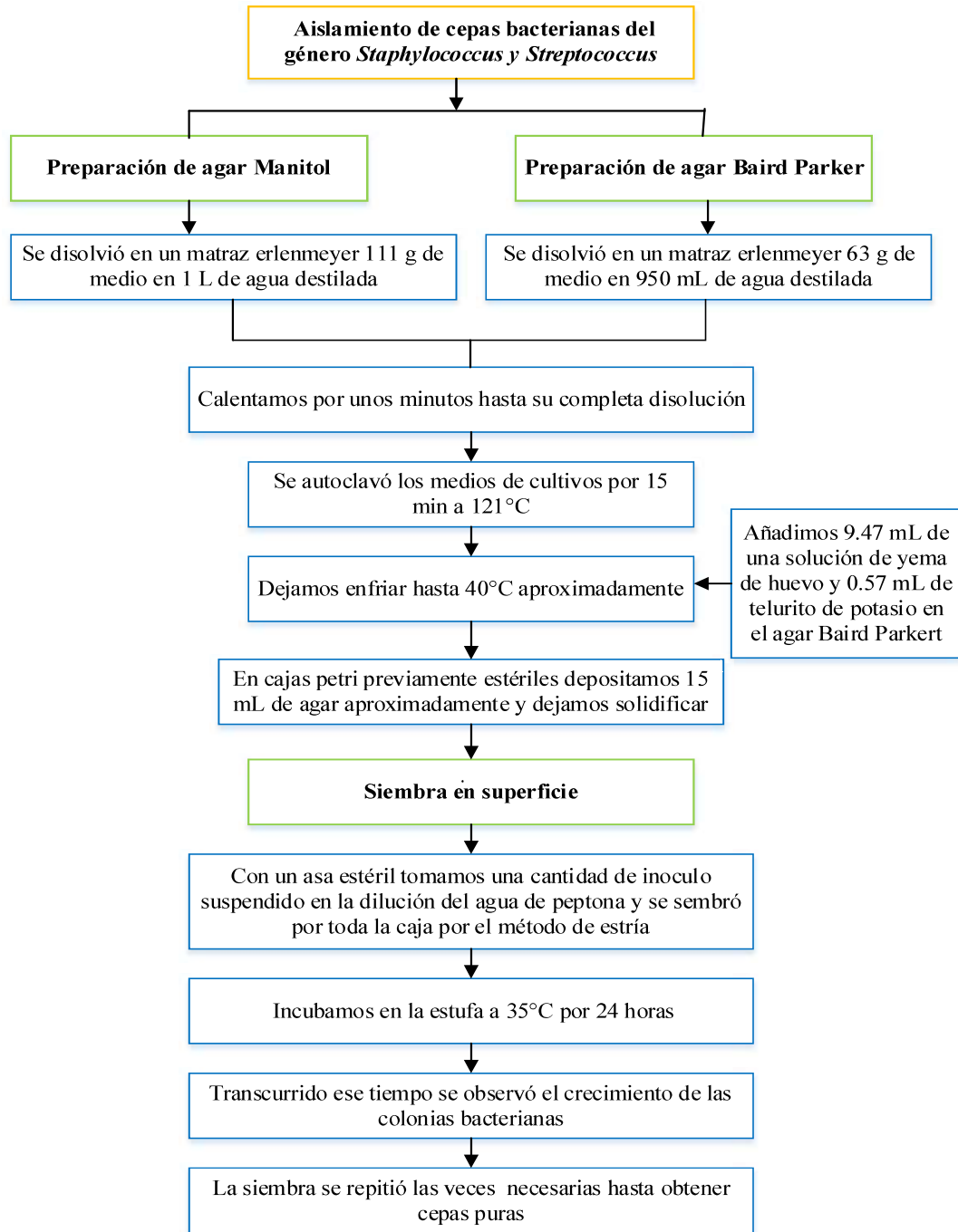
**Figura 3-2.** Procedimiento de cultivos de cepas bacterianas para la familia *Enterobacteriaceae*.

**Fuente:** NTE INEN 1529-1, 2013. (Norma Técnica Ecuatoriana para Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

### 2.5.2. Cultivo de cepas bacterianas de la familia *Micrococcaceae*

El cultivo de cepas bacterianas del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, se llevó a cabo en el agar Baird Parker y agar Manitol Salado mediante la siguiente metodología, figura 4-2:



**Figura 4-2.** Procedimiento de cultivos de cepas bacterianas para género *Staphylococcus*.

**Fuente:** Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013. (Norma Técnica Ecuatoriana para Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

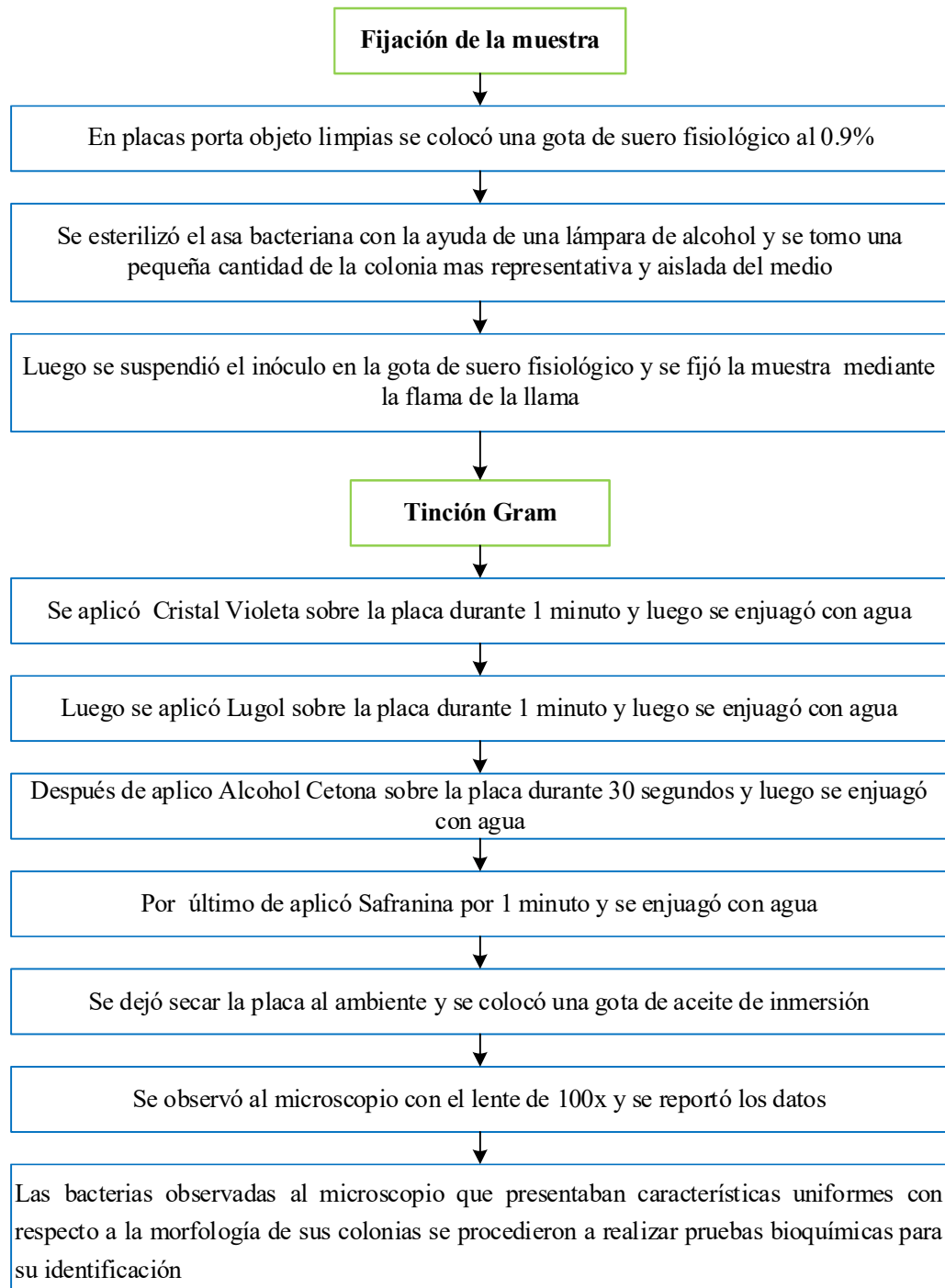
Se observó en el agar Baird Parker el crecimiento de colonias con una coloración negra, mientras que en el agar Manitol la coloración de las colonias se tornaron fucsias que son características de cada especie bacteriana.

## **2.6. Identificación de cepas bacterianas**

Para la identificación se realizó pruebas fenotípicas entre ellas la tinción Gram y pruebas bioquímicas que permitieron determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación.

### ***2.6.1. Identificación mediante tinción Gram***

La tinción Gram es un procedimiento diferencial que nos permitió la identificación de dos importantes grupos de bacterias que son Gram positivas/negativas, se describe en la figura 5-2.



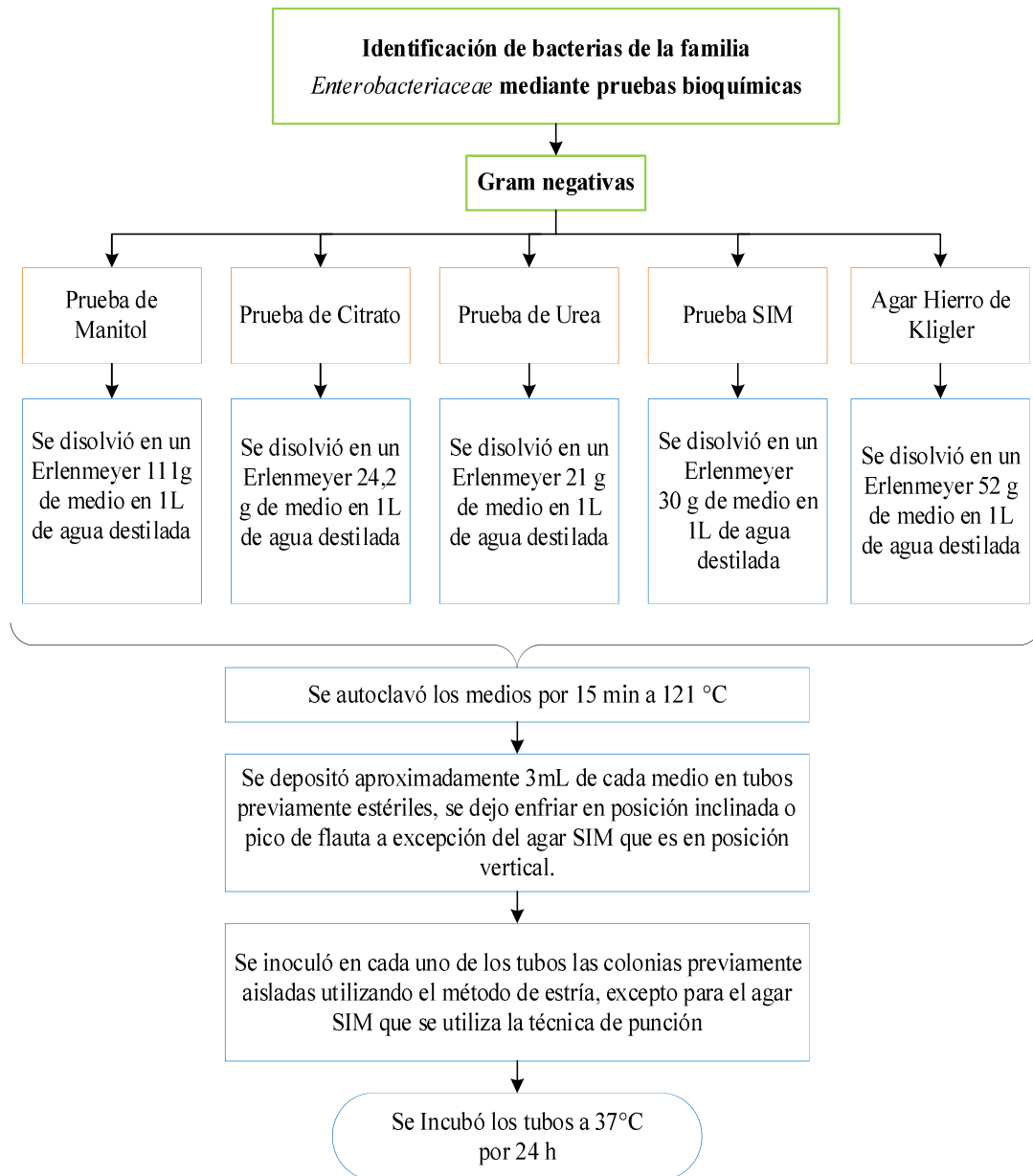
**Figura 5-2.** Procedimiento de para el desarrollo de la Tinción Gram.

**Fuente:** NTE INEN 1529-1, 2013. (Norma Técnica Ecuatoriana para Control Microbiológico de los Alimentos. Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.



## 2.6.2. Pruebas para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae*.



**Figura 6-2.** Procedimiento de pruebas bioquímicas.

**Fuente:** NTE INEN 1529-8 Primera revisión, 2016. (Norma Técnica Ecuatoriana. Control Microbiológico de los Alimentos. Detección y Recuento)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

2.6.3. Pruebas para la identificación de las especies del género *Pseudomonas*

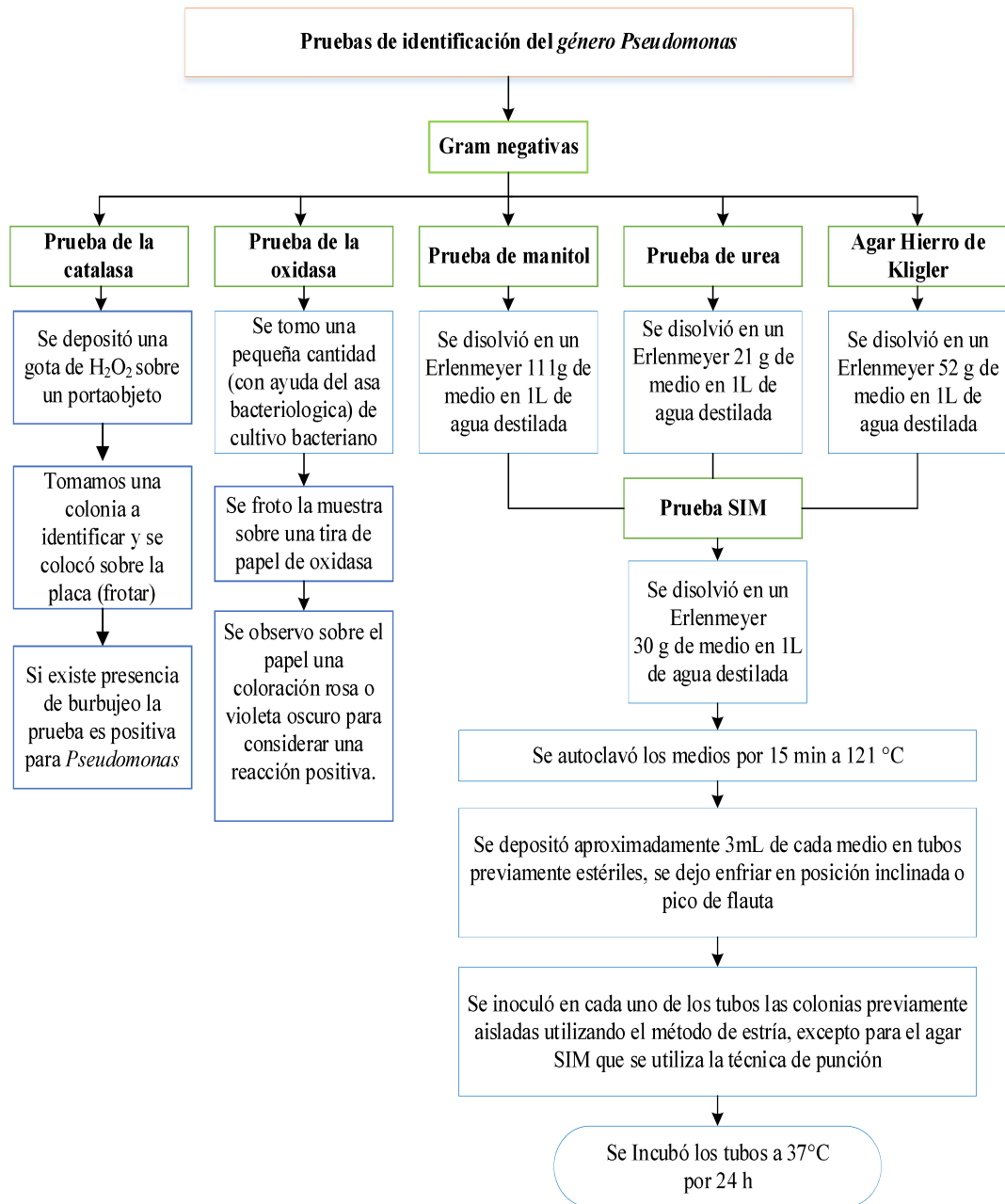
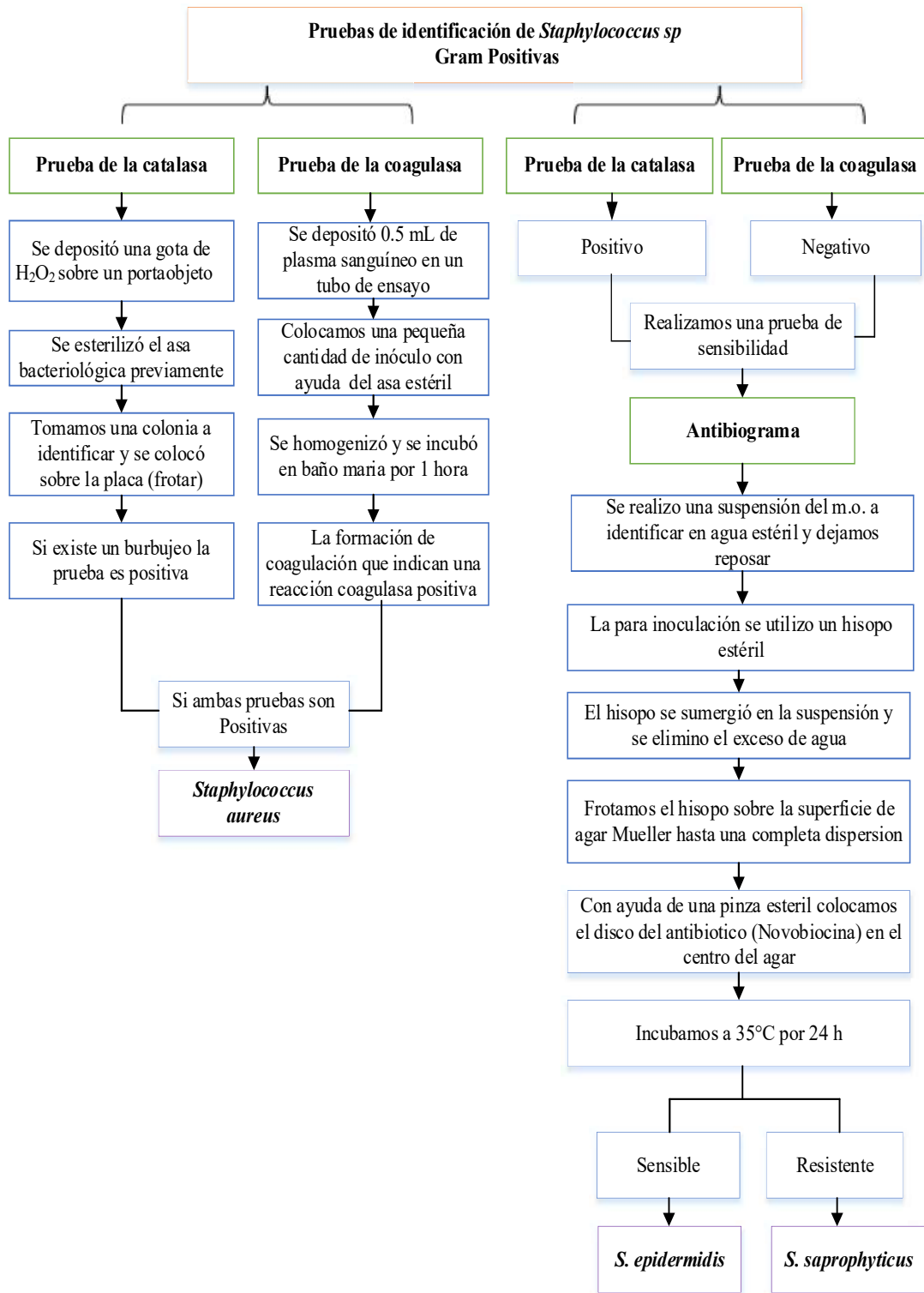


Figura 7-2. Pruebas para la identificación del género *Pseudomonas*.

Fuente: Luna Fontalvo, 2012, p.42.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

2.6.4. Pruebas para la identificación de las especies del género *Staphylococcus*



**Figura 8-2.** Procedimiento de clave diferencial para género *Staphylococcus*.

Fuente: Álvarez et al., 1995.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

2.6.5. Pruebas para la identificación de los microorganismos del género *Streptococcus* sp.

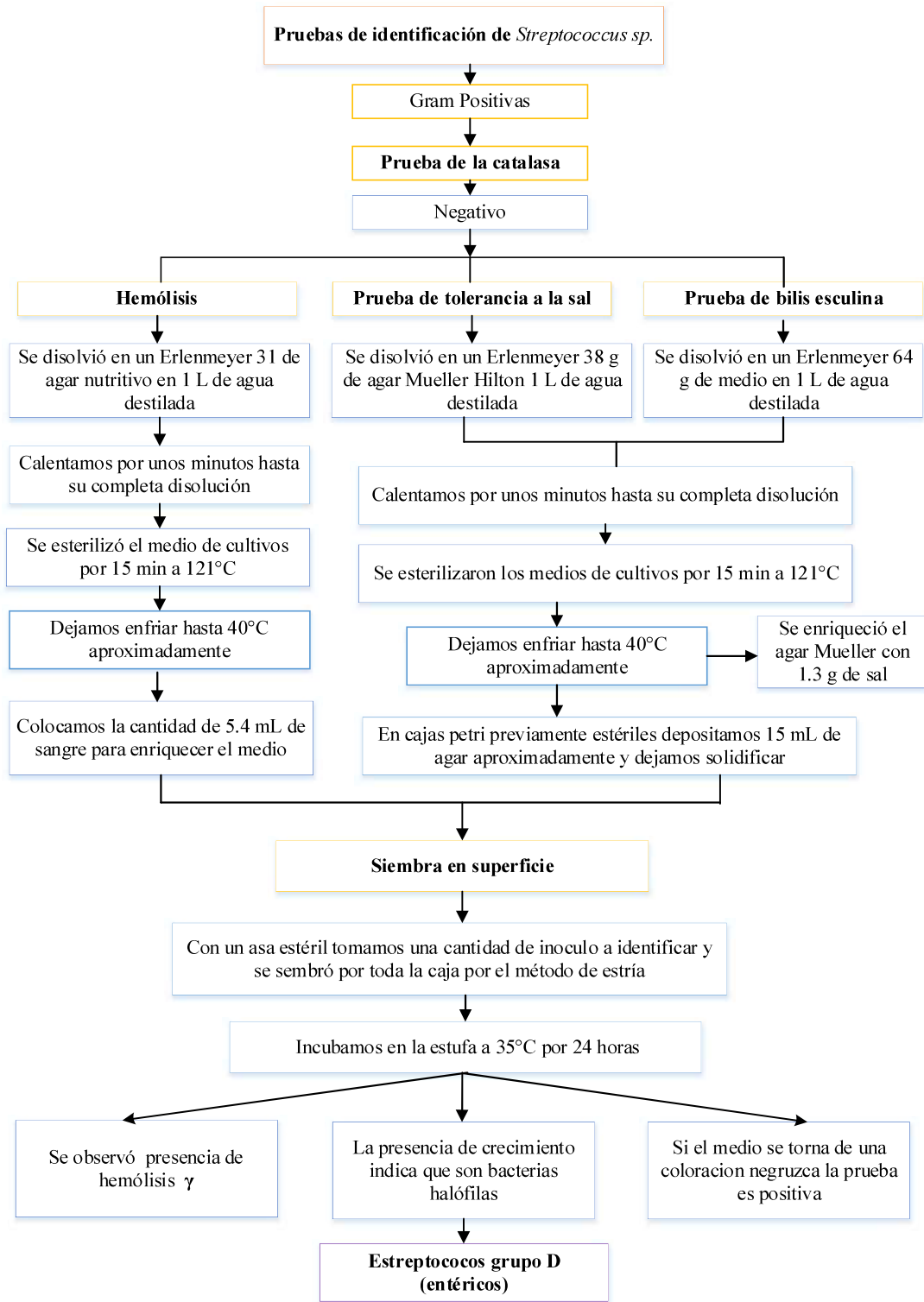


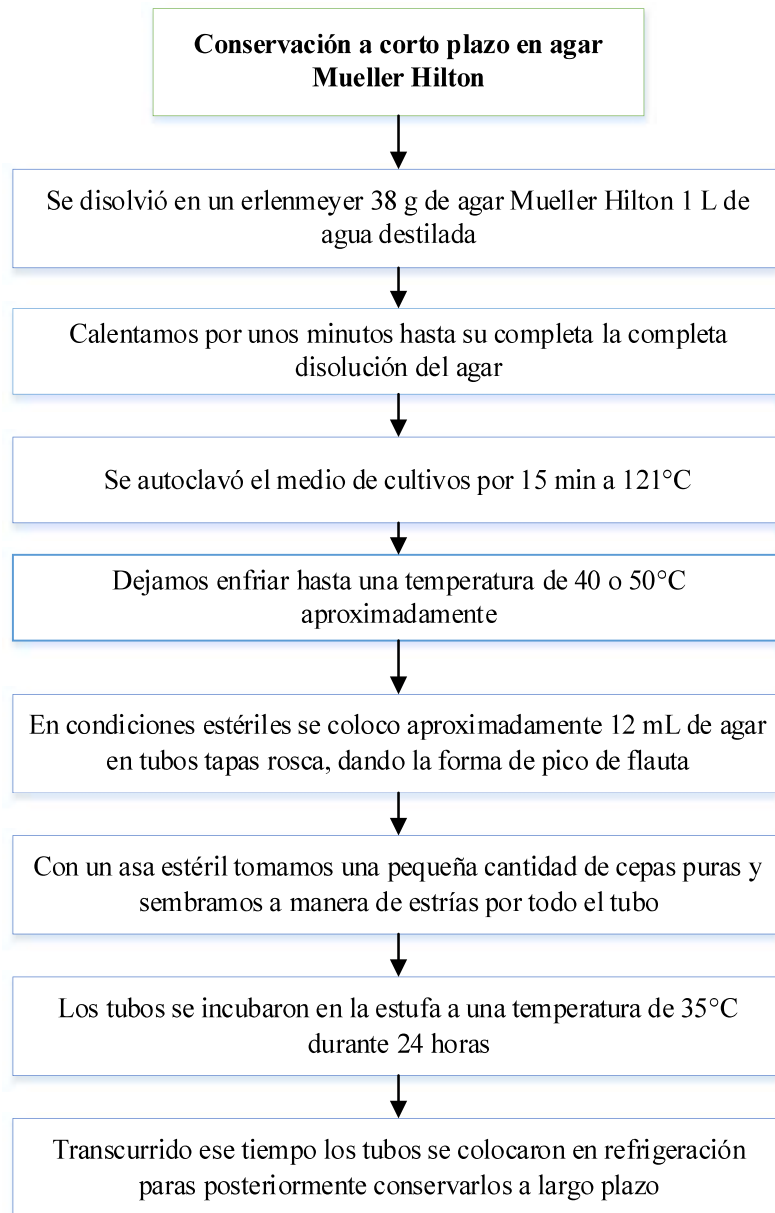
Figura 9-2. Procedimiento de clave diferencial para género *Streptococcus*.

Fuente: Álvarez et al., 1995.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## 2.7. Conservación de cepas bacterianas a corto plazo

Las cepas bacterianas puras obtenidas de la reactivación, el aislamiento y posteriormente identificadas en las muestras de ceviche de chochos fueron conservadas temporalmente en agar Mueller Hinton el cual se preparó mediante el procedimiento mencionado en la figura 10-2:



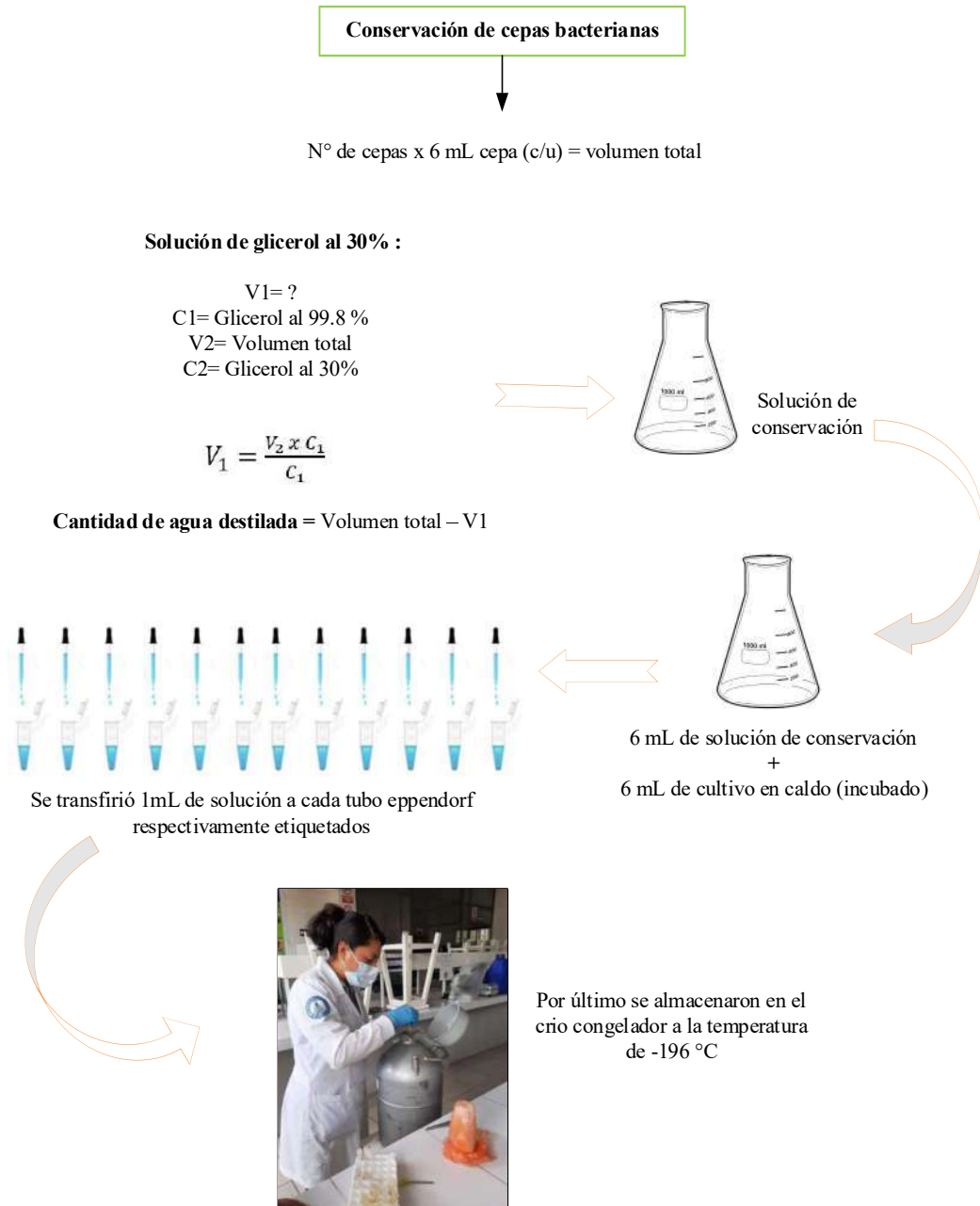
**Figura 10-2.** Procedimiento para la conservación a corto plazo de cepas bacterianas.

**Fuente:** (NTE INEN 1529-1, 2013). (Norma Técnica Ecuatoriana para Control Microbiológico de los Alimentos. Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos)

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## 2.8. Técnica de Conservación con Glicerol

Se conservaron 13 cepas provenientes del ceviche de chochos y se conservaron a partir de un cultivo de 32 horas en el medio CG (Caldo cerebro Corazón+ 30% Glicerol) a las temperaturas de -196 °C.



**Figura 11-2.** Procedimiento para la conservación a largo plazo de cepas bacterianas.

**Fuente:** Belmonte et al., 2008, p.16; Bermeo et al., 2016, p.9.

**Realizado por:** Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

## **2.9. Determinación de la actividad enzimática de las cepas aisladas**

### **2.9.1. Actividad amilolítica**

Las cepas aisladas fueron cultivadas en agar Patata Dextrosa, de composición (anexo H), previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos, se realizó la inoculación mediante el método de picadura en las cajas de Petri y luego fueron incubadas por 24 horas a 35°C. Para determinar la actividad amilolítica se cubrió la placa con Lugol y se procedió a observar la hidrólisis del almidón por la presencia de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias al revelado con el Lugol (Valencia Guerrero et al., 2011, p. 148).

### **2.9.2. Actividad proteolítica**

Para determinar la producción de enzimas con actividad proteolítica en las bacterias aisladas, se preparó el medio de cultivo caseína usando el agar PCA suplementado con leche descremada al 6% (v/v) (anexo I), luego de ser autoclavado el agar a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar hasta una temperatura de 40°C y se añadió la leche descremada para verter en las cajas Petri (Camacho López, 2016, p.30).

La inoculación se realizó a partir de bacterias incubadas en agar, se tomó una colonia con un palillo previamente esterilizado y se realizó varios piquetes en el agar. Estas placas se incubaron por 24 horas a 35°C. Posteriormente se visualizó la formación de un halo transparente alrededor de las colonias si el resultado es positivo para presencia de proteasas (Camacho López, 2016, p.30).

### **2.9.3. Actividad Celulolítica**

A partir de las bacterias aisladas se preparó agar nutritivo suplementado con CMC al 1% (p/v) (anexo J), se llevó al autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121°C, luego se dejó enfriar para verter en las cajas Petri y se realizó la siembra de las colonias por picaduras en el agar celulosa. Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó el colorante rojo Congo al 1% (p/v) hasta cubrir toda la caja, este como revelador del crecimiento bacteriano sobre el medio, después de 15 minutos se retiró el exceso y se añadió NaCl 1 M, se dejó reposar por 15 minutos más y se visualizó la presencia de halos de hidrólisis (Gaitan Bohorquez y Perez Perez, 2007, p.21).

#### **2.9.4. Actividad Lipolítica**

Los microorganismos fueron cultivados en el medio mantequilla que se preparó a partir del agar nutritivo suplementado con mantequilla y se llevó al autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121°C, se dejó enfriar y se añadió el tween 80 en el medio para después colocar sobre las placas de Petri. Las cajas se incubaron por 48 horas a 35°C. Se observó el crecimiento y formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia lo que indica actividad lipolítica (Soria-Noroña y López-Almeida, 2020, p.1097).

#### **2.10. Test de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)**

Esta técnica es cualitativa y el resultado se interpreta directamente como sensible, intermedio o resistente, es utilizada a menudo para bacterias no exigentes de crecimiento rápido como los *Staphylococcus sp.* o las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

A partir de un inóculo bacteriano puro, se llevó a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarland, luego con un hisopo estéril se estrió sobre la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton de forma paralela abarcando toda la superficie de la placa y rotándola 60° en dos ocasiones, en un tiempo no mayor de 5 minutos, con una pinza estéril se depositó los discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Posteriormente se incubó las placas de manera invertida a 35°C por 18 horas y se procedió a la lectura de los halos de inhibición (Taroco, Seija y Vignoli, 2000, p.666).

#### **2.11. Evaluación de la viabilidad de las cepas aisladas**

Para las pruebas de viabilidad se llevó a cabo un repique inicial a los 15 días, posteriormente a los 30 días y 60 días. En cada tiempo de extrajo 1 vial de cada especie (de los 12 inicialmente conservados), para ello los microorganismos crío conservados (glicerol al 30%), fueron sometidos a un proceso revitalización a través de una descongelación rápida mediante Baño María a 37°C por 30 minutos (anexo G), luego se homogenizó los viales y utilizando la espátula Drigalsky se sembró una alícuota de 0.1 ml de ellos, extendiéndolos sobre la superficie de las cajas Petri con agar previamente preparado, incubándose a una temperatura de 35°C por 24 horas (Belmonte et al., 2008, p.16; Bermeo et al., 2016, p.9).

Finalmente se evaluó de forma cualitativa mediante un examen visual la viabilidad de los microorganismos reactivados, a través del crecimiento en las cajas de Petri y la pureza en la morfología microscópica a través de la tinción Gram de sus colonias.



## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

#### 3.1. Aislamiento de cepas bacterianas encontradas en el ceviche de chochos

El aislamiento de las cepas bacterianas se realizó en dos etapas. Primero se obtuvieron colonias bacterianas del cultivo de las muestras tomadas aleatoriamente de los puestos ambulantes de ceviche de chochos en la ciudad de Riobamba y de la reactivación de los microorganismos cultivados en muestras de ceviche como parte de trabajos de titulación dentro del Proyecto “EVALUAR LA CALIDAD FÍSICO - QUÍMICA, BACTERIANA Y PARASITARIA EN LOS CEVICHE DE CHOCHOS (Producto Artesanal de Consumo Masivo, Patrimonio culinario), QUE SE PREPARAN Y SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA CONTRIBUYENDO A LA SEGURIDAD ALIMENTARIA” con anterioridad, mismas que pasaron por varias resiembras consecutivas, de todo este procedimiento se obtuvo 28 cepas, de las cuales se seleccionaron 13 colonias de diferentes características para la investigación. Las cualidades fenotípicas evaluadas que presentaron cada una de las colonias en estudio fueron la forma, tamaño, color, textura, elevación, el aspecto de sus bordes y tinción Gram, resultados que se presentan en la tabla 1-3, de acuerdo con la especie bacteriana encontrada.

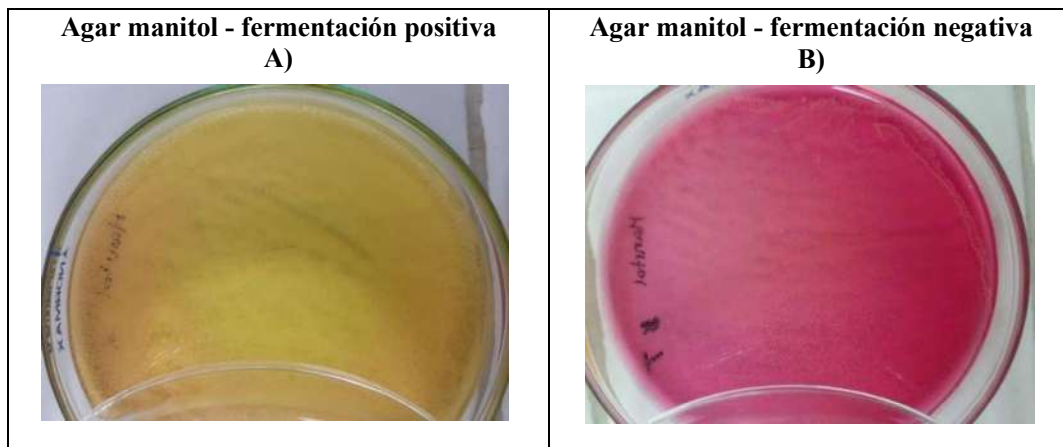
**Tabla 1-3:** Características fenotípicas de las cepas bacterianas estudiadas

N°	Agar	Fermentación	Morfología					Microscopia	
			Tamaño	Forma	Color	Textura	Elevación	Gram	Forma
<i>Cepa 1</i>	Manitol	Si	Pequeñas a medianas	Circulares	Amarilla a dorado, fermentadoras	Cremosa	Elevadas y lisas	Positivo	Cocos, agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas o racimo de uvas
<i>Cepa 2</i>	Manitol	No	Colonias pequeñas	Circulares con bordes redondeados	Coloración blanquecina no fermentadoras	Cremosa	Convexa	Positivo	Cocos, observados en asociación de racimos
<i>Cepa 3</i>	Manitol	No	Colonias pequeñas	Esféricas u ovoides	Beige, brillantes, no fermentadoras	Cremosas	Elevadas	Positivo	Cocos agrupados en pares o en cadenas cortas
<i>Cepa 4</i>	MacConkey	No	Medianas	Circulares	Ámbar o translucidas	Cremosas	Elevadas	Negativo	Bacilos medianos
<i>Cepa 5</i>	EMB (Eosina azul de metileno)	Si	Pequeñas a medianas	Circular de bordes lisos	Verde con brillo metálico, fermentadoras	Suave y brillante	Elevada	Negativos	Bacilos medianos
<i>Cepa 6</i>	MacConkey	Si	Medianas a grandes	Circulares de bordes entero	Rosa pálido, fermentadoras	Viscosas	Convexas	Negativo	Bacilos cortos, individuales, o en cadenas cortas

<i>Cepa 7</i>	MacConkey	No	Pequeñas	Circulares con bordes enteros	Ámbar translucido	Suave cremosa	Elevadas	Negativo	Bacilos individuales o agrupados
<i>Cepa 8</i>	MacConkey	Si	Medianas a grandes	Irregulares	Rosadas, fermentadoras	Pastosa	Elevada	Negativo	Bacilos gruesos medianos
<i>Cepa 9</i>	MacConkey	Si	Pequeñas	Circulares	Rosada	Mucoides suaves brillantes	Convexas	Negativo	Bacilos alargados individuales o agrupado
<i>Cepa 10</i>	EMB	Si	Pequeñas	Circulares con borden lisos	Azulada	Suave	Convexas	Negativo	Cocobacilos
<i>Cepa 11</i>	EMB	No	Pequeñas a medianas	Circulares con borde entero	Incoloras	Suave	Aplanadas	Negativo	Bacilos medianos
<i>Cepa 12</i>	MacConkey	No	Medianas	Circulares	Incoloras	Cremosa	Convexa	Negativo	Bacilos recto o curvo
<i>Cepa 13</i>	MacConkey	No	Pequeñas	Bordes ondulados	Ámbar	Rugosa	Elevada	Negativo	Bacilos delgados

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

Para aquellas bacterias de microscopia Gram-positiva, se utilizó el agar Manitol Salt - Becton Dickinson para la identificación de microorganismos del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, donde la fermentación del manitol mostrada por el indicador rojo fenol permitió identificar *Staphylococcus aureus* de forma preliminar, ya que es el único que produce fermentación, originando sus colonias y el medio circundante de color amarillo figura 1-3 (A), en comparación a otros microorganismo pertenecientes a la misma familia que producen colonias de color blanquecinas y no hay cambio del indicador como se muestra en la figura 1-3(B), este medio posee una alta concentración de cloruro sódico que resulta ser el inhibidor de microorganismos Gram negativos (Álvarez et al., 1995, p.32; Luna Fontalvo, 2012, p.42).

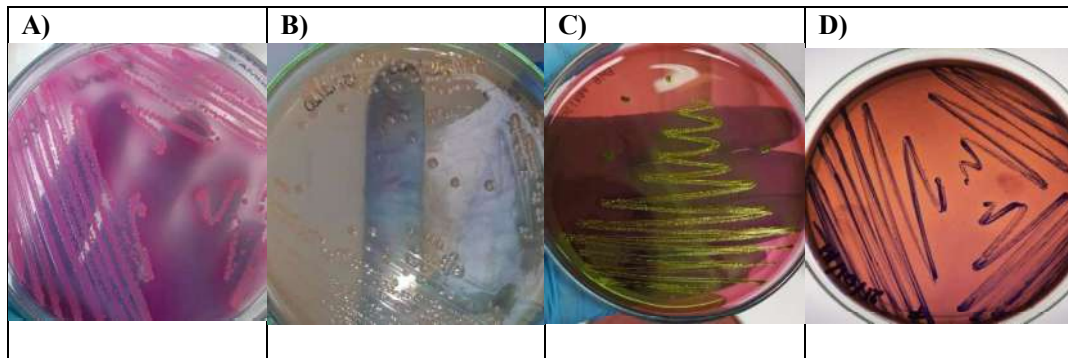


**Figura 1-3.** Características diferenciales para género *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

**Realizado por:** Cueva Dayana, Mayorga Nataly 2020.

El medio de cultivo Agar MacConkey - Becton Dickinson, permitió el crecimiento selectivo diferencial de *Enterobacteriaceae*, de microscopia Gram-negativa, donde se observó que los microorganismos fermentadores de lactosa producen acidez en el medio y origina la formación de colonias rosadas en algunos casos con zonas de precipitación de sales biliares figura 2-3 (A), mientras que los microorganismos no fermentadores de lactosa produjeron colonias incoloras o color beige figura 2-3 (B), cabe recalcar que la inhibición de la flora Gram-positiva es debido la presencia del cristal violeta. Asimismo, en el agar EMB - Becton Dickinson, se presencié el crecimiento de *Enterobacteriaceae* con la diferencia de que este posee la eosina y azul de metileno como indicadores que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram-positivas, en este agar se observó, que las bacterias con la capacidad de fermentar carbohidratos como la lactosa, dan una coloración azulada o rosadas a las colonias figura 2-3 (D), mientras que las que no poseen esta capacidad fermentadora producen colonias transparentes, haciendo referencia también a lo que expone el autor (Álvarez et al., 1995, p.49), en su libro Manual de Técnicas de Microbiología Clínica. Una característica distintiva del agar BD - EMB, es el crecimiento de las colonias de *Escherichia*

*coli* mismas que reflejada a la luz adquieren una coloración verde metálico característica como se observa en la figura 2-3 (C).



**Figura 2-3.** Crecimiento bacteriano de enterobacterias en agar MacConkey.

**Realizado por:** Cueva Dayana, Mayorga Nataly 2020.

El aislamiento a partir de muestras de ceviche de chochos dio como resultados la presencia de los siguientes microorganismos. Los microorganismos aislados se seleccionaron y caracterizaron mostrando, los resultados a continuación en la tabla 2-3.

### 3.2. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

**Tabla 2-3:** Caracterización bioquímica de bacterias de la Familia *Micrococcaceae*

Familia <i>Micrococcaceae</i>									
Pruebas Bioquímicas									
Nº	Catalasa	Coagulasa	Sensibilidad a la NV	Hemólisis en agar (sangre)	Prueba de CAMP	Bilis /esculina	Crec. medio NaCl 6.5%	Telurito	Identificación
Cepa 1	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cepa 2	+	-	Sensible	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Cepa 3	-	N/A	N/A	γ	-	+	+	-	<i>Streptococcus faecium</i>

NV: novobiocina; CAMP: factor de monofosfato de adenina cíclica; N/A: no aplica

Fuente: Álvarez et al., 1995.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

En la identificación definitiva mediante pruebas bioquímicas para la familia *Micrococcaceae*, se obtuvo respecto a la actividad enzimática de la catalasa en las Cepas 1 y 2 una reacción positiva frente a la degradación del peróxido de hidrógeno, producto de esto dio como resultado su liberación de gas mediante burbujeo similar a lo reportado por (Fernández et al., 2010, p.6). La Cepa 3 dio resultado negativo sin presencia de gas. En cuanto a la reacción de coagulasa Cepa 1 fue la única en donde se presenció coagulación siendo positiva para esta prueba, lo cual permitió afirmar la identificación de *S. aureus*. La Cepa 2 se reporta como coagulasa negativa sin presencia de coágulo, en base a esto se realiza la prueba de sensibilidad frente a la NV para diferenciación, siendo esta sensible, lo que sugiere en la identificación de *S. epidermidis*. En el caso de la Cepa 3 negativo para catalasa, supone la realización de ensayos para identificación del género *Streptococcus*, con los resultados expuestos en la tabla 2-3, donde se reporta hemólisis γ, prueba de CAMP negativa, crecimiento en agar Bilis/esculina, crecimiento positivo en medio NaCl y crecimiento negativo en Telurito, se llega a la caracterización de un microorganismo *S. faecium*. lo cual expone (Álvarez et al., 1995, p.49), en su libro Manual de Técnicas de Microbiología Clínica.

**Tabla 3-3:** Caracterización bioquímica de bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae*

Familia <i>Enterobacteriaceae</i>										
Pruebas Bioquímicas										
N°	Manitol	Citrato	Kligler				Sim		Ureasa	Identificación
			Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH <sub>2</sub>	Indol	Movilidad		
<i>Cepa 4</i>	-	V <sup>+</sup>	+	V <sup>+</sup>	-	+	-	+	+	<i>Proteus spp</i>
<i>Cepa 5</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
<i>Cepa 6</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Cepa 7</i>	+	-	+	-	-	-	V	+	V <sup>+</sup>	<i>Yersenia enterocolitica</i>
<i>Cepa 8</i>	+	+	+	+	V	+	-	+	V <sup>+</sup>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Cepa 9</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	V <sup>+</sup>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Cepa 10</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	D (No identificada)
<i>Cepa 11</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	-	F (No identificada)

V<sup>+</sup>: variable positiva

Fuente: Álvarez et al., 1995.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

En la Tabla 3-3, se identifican los microorganismos de interés clínico encontrados, se observa que los patógenos aislados mayoritariamente corresponden a la familia de Enterobacterias, vistas al microscopio como bacilos Gram negativos, se las identificó mediante pruebas bioquímicas de acuerdo con las características expuestas en el Manual de técnicas en Microbiología Clínica (Álvarez et al., 1995, p.51). La mayoría de las bacterias presenta la capacidad fermentadora de carbohidratos como glucosa y lactosa, a menudo producen gas y reducen nitritos. La utilización de citrato como única fuente de carbono y de compuestos amoniacales como fuente de nitrógeno provocaron una alcalinización en el medio dando un viraje de color azul, esta característica es común en géneros como: *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, sin embargo, *Escherichia*, *Yersenia* y *Acinetobacter* son incapaces de crecer con esos nutrientes. La ureasa es una actividad enzimática característica de todas las especies de *Proteus* y se utiliza sobre todo para diferenciar este género de otras Enterobacterias que dan negativo o variable positivo. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Benavides, 2007, p.130-133).

El medio SIM, permitió evaluar tres pruebas entre ellas la producción de sulfitos, indol y la movilidad, en cuanto al resultado de movilidad *E.coli* y demás Enterobacterias presentaron un resultado positivo por la presencia de enturbiamiento del medio debido a la presencia de flagelos de las bacterias a excepción de *Klebsiella pneumoniae* que presentó resultado negativo puesto que carece de los mismo; en cuanto a la producción de sulfitos *Proteus spp* y *Citrobacter freundii* formaron un precipitado negro en el medio lo cual indica un resultado positivo, puesto que son capaces de utilizar el hierro, azufre y la peptona para producir sulfuro ferroso; en la prueba de indol solo *E. coli* presentó un resultado positivo debido a la presencia de la enzima triptofanasa que degrada al aminoácido triptófano a indol que al reaccionar con el reactivo de Kovac's produce la formación de un anillo rojo en la superficie del medio, similar a lo reportado por (Rustrián et al., 2013, p.121-132).

La calidad microbiológica de los alimentos que se expenden en la vía pública desde el punto de vista sanitario ha sido ampliamente estudiada en diferentes ciudades y países, puesto que las deficientes prácticas de higiene en la manipulación y preparación de estos alimentos tiende a presenta riesgos considerables para la salud de los consumidores.

En cuanto a los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los reportados en un estudio realizado por (Tabashsum et al., 2013, pp.281-292), en el cual evaluaron la prevalencia de patógenos transmitidos por los alimentos, donde las cepas bacterianas procedentes de la venta ambulante de varios puestos de comida, fueron aisladas e identificadas mediante pruebas bioquímicas y galería API. Se identificaron microorganismos como *E coli O157*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.* *Pseudomonas spp.*, mismos que han sido identificados en esta investigación de modo que los alimentos expendidos en la vía pública se podría considerar un potencial peligro para la salud humana.



Así mismo en un estudio realizado en la ciudad de Cuenca se analizaron las características del expendio del chocho y su relación con la contaminación microbiológica, los resultados obtenidos indican la presencia de *E. Coli*, *Salmonella spp*, *Proteus*, *P. aureginosa* y *Klebiella pneumoniae* siendo las dos cepas primeras consideradas como los agentes etiológicos de contaminación de los chochos de mayor relevancia (Mendez, Minchala y Sánchez, 2014, p.25).

Los últimos 15 años la OMS juntamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura por sus siglas FAO han ejecutado estudios e investigaciones sobre los alimentos expendidos en las vías públicas para determinar la magnitud del problema, con el fin de ayudar a los gobiernos a implementar programas que mejoren la calidad y garantizar practicas alimentarias seguras.

Un estudio realizado por la OMS en Colombia, mencionó que los alimentos de origen animal que presentan un alto contenido de proteína, humedad, un pH relativamente alto y presentan una cantidad elevada de ingredientes son considerados como alimentos de alto riesgo, debido a que existe una mayor manipulación de los mismo, asimismo en un artículo de revisión donde se analiza los factores de riesgo en las practicas alimentarias callejeras, se aduce que las actividades de los vendedores ambulantes no están reguladas debido a su naturaleza informal y están expuestos a cualquier tipo de contaminación, la gran mayoría de vendedores no cuentan con un sistema de adecuado de agua ni de materias primas de buena calidad, añadiendo que no emplean un sistema de buenas prácticas de manipulación e higiene de los alimentos, pues hay bacterias tal como una *Salmonella typhi* que pueden sobrevivir en las manos por horas, esto crea un amplio espacio para actividades malsanas; los resultados son un riesgos para la salud ( Alimi, 2016, p.146; Arámbulo III et al., 1995, p.98).

**Tabla 4-3:** Caracterización bioquímica de bacterias del género *Pseudomona*

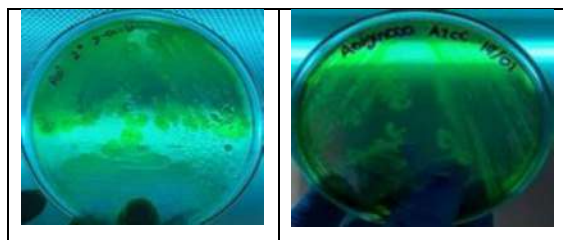
N° cepa	Manitol	Kligler			Sim		Ureasa	Catalasa	Oxidasa	Identificación
		Glucosa	Gas/ Glucosa	Lactosa	Indol	Movilidad				
<i>Cepa 12</i>	V	+	-	-	-	+	V	+	+	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>Cepa 13</i>	-	+	-	V	-	+	V <sup>-</sup>	+	+	<i>Pseudomona ssp</i>

V<sup>-</sup>: variable negativa.

Fuente: Álvarez et al., 1995.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

A partir de las muestras analizadas se identificaron dos bacterias pertenecientes a la genero de *Pseudomona*, en la tabla 4-3, se muestran las características principales de las pruebas bioquímicas para su identificación. Según (Álvarez et al., 1995, p.78), menciona que las pruebas de oxidasa y catalasa presentan una reacción positiva, mismas que coinciden con los resultados obtenidos, una característica destacable de las especies de este grupo es la fluorescencia observada en presencia de luz UV figura 3-3, debido a la formación de los pigmentos llamados “pioverdina y/o piocianina” y un olor propio a masa de tortilla, en cuanto a la reacción en agar TSI es alcalina debido a la producción de ácido por oxidación de la glucosa y no utilización de lactosa, posee indol negativo y movilidad positiva, una ureasa variable y manitol que va de variable a negativo (Vera et al., 2006, p.41; Nuñez, Zaror y Rios, 1975, p.61).



**Figura 3-3.** Fluorescencia en presencia de luz UV en agar MacConkey.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Tabla 5-3:** Resultados de la identificación mediante la prueba molecular (PCR)

Muestra	Código BioSin	Long (pb)	Calidad (%)	Barcode	Organismo	Identidad (%)	N° Acceso GenBank
D	BB124	1380	98.1	16S	<i>Acinetobacter oryzae</i>	99.78	MH071139.1
F	BB125	1358	98.4	16S	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99.85	NR_164627.1

Fuente: IdGen, Identificación Molecular. Informe: B-125

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

En la tabla 5-3, se observa 2 microorganismos con la denominación D y F identificadas mediante pruebas moleculares PCR con un porcentaje de pureza del 99,78% y 99,85% respectivamente, lo cual cercioró que el aislado corresponde a dicha especie; estas bacterias no se lograron identificar por los métodos convencionales ya que compartían características similares con otras cepas bacterianas, por tal motivo fue necesario este análisis donde se muestra el género y especie del microorganismo. Siendo así la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el método más frecuente aplicado al área de microbiología en alimentos, altamente específico y sensible en la identificación y tipificación de bacterias, el cual se fundamenta en el principio de complementariedad, la enzima polimerasa permite la extensión de un fragmento específico, amplificando secuencias de ADN cromosomal y plasmídico de cada microorganismo para obtener millones de copias durante ciclos sucesivos, que comprenden 3 pasos: desnaturalización, hibridación y extensión (Palomino y Gonzáles, 2014, p.537).

Se han realizado varios estudios empleando la técnica del PCR con el fin de caracterizar patógenos en alimentos, en un trabajo de titulación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se analizó la calidad microbiológica de los ceviches de chochos en Riobamba, donde se han cuantificado las especies de interés clínico del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*) (Calvache, 2020, p. 35). Igualmente, se han analizado alimentos de venta en la vía pública de un sector universitario en la provincia de Pichincha-Ecuador, revelando a través de PCR el 100% de los casos positivos en las muestras de alimentos, encontrando *Salmonella spp* y *Escherichia coli*, realizado por los autores (Utreras, Coba y Echeverría, 2014, p.45). Se concluye así que esta técnica aporta gran especificidad y rapidez en la identificación de patógenos de interés sanitario; por la utilidad que brindó en este estudio para la identificación de microorganismos en las muestras de ceviche de chochos se coincide con los autores (Huertas, Urbano y Torres 2019, p.515), que las pruebas moleculares PCR por su buen límite de detección, fácil automatización y capacidad de procesamiento, es de gran elección para la vigilancia y control de calidad.

### 3.3. Test de susceptibilidad antimicrobiana (AST)

**Tabla 6-3:** Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia *Micrococcaceae*

Familia <i>Micrococcaceae</i>					<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Strepto. faecium</i>
Antimicrobianos	Contenido del Disco	Diámetro en mm					
		≤R	I	≥S			
Penicilina	10 unidades	28	-	29	R	S	R
Oxacilina ( <i>S. aureus</i> )	1 µg	10	11-12	13	R	-	-
Oxacilina ( <i>Estafilococos coagulasa negativos</i> )	1 µg	17	-	18	-	S	R
Eritromicina	15 µg	13	14-22	23	R	R	I
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18	S	S	S
Clindamicina	2 µg	14	15-20	21	R	R	R
Tetraciclina	30 µg	14	15-18	19	I	I	R

S: sensible; R: resistente, I: resistencia intermedia.

Fuente: Sacsquispe y Velásquez, 2002.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Tabla 7-3:** Test de susceptibilidad antimicrobiana Familia *Enterobacteriaceae*

Familia <i>Enterobacteriaceae</i>					<i>Proteus spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. johnsonii</i>
Antimicrobianos	Contenido del Disco	Diámetro en mm										
		≤R	I	≥S								
Ampicilina	10 µg	13	14-16	17	R	R	R	R	R	R	R	S
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15	I	I	S	S	S	R	I	S
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18	R	S	R	S	S	R	I	S
Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/23,75µg	10	11-15	16	R	S	S	S	S	R	R	S
Tetraciclina	30 µg	14	15-18	19	R	I	R	S	I	R	R	S
Amoxicilina/ clavulánico	20/10 µg	13	14-17	18	I	R	S	I	R	I	I	S

S: sensible; R: resistente, I: resistencia intermedia.

Fuente: Sacsquispe y Velásquez, 2002.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Tabla 8-3:** Test de susceptibilidad antimicrobiana de la especie *Pseudomona*

Especie de <i>Pseudomona</i>					<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomona spp.</i>
Antimicrobianos	Contenido del Disco	Diámetro en mm				
		≤R	I	≥S		
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15	S	S
Amikacina	30 µg	14	15-16	17	I	S
Ciprofloxacino	5 µg	15	16-20	21	S	S
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18	R	R
Amoxicilina/clavulánico	20/10 µg	13	14-17	18	I	S
Ampicilina	10 µg	13	14-16	17	R	R

S: sensible; R: resistente; I: resistencia intermedia.

Fuente: Sacaquispe y Velásquez, 2002.

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana (AST) se realizó para todas las bacterias gramnegativas y grampositivas utilizando el método de difusión en disco denominado método Kirby Bauer (anexo M), se determinó la resistencia, resistencia intermedia y sensibilidad para cada microorganismo mediante la comparación de los resultados obtenidos en la medición del halo de inhibición con la referencia del diámetro en mm para cada antibiótico. Se consideraron cepas resistentes a los microorganismos que tuvieron resistencia de forma (total e intermedia) a tres o más antimicrobianos.

Tomando en cuenta los resultados del test de susceptibilidad para las bacterias Gram positivas, *S. aureus*, *S. epidermidi* y *S. faecium* se consideran cepas multirresistentes, de acuerdo con la especie, la resistencia se debe a la presencia del gen *mecA*, lo cual produce que exista una modificación en la proteína de unión a penicilina (PBP) en la pared bacteriana evitando que el fármaco tenga su acción terapéutica produciendo así su resistencia, estos resultados coinciden con los estudios de (Gómez, 2019, p.7). Esos microorganismos también pueden ser resistentes a los antibióticos usados con más frecuencia los cuales incluyen macrólidos, lincosamidas, estroptograminas B (Guillermina et al., 2018, p.242).

Durante el aislamiento se reflejó un predominio de especies de la familia de las *Enterobacteriaceae*, entre ellas cabe recalcar que *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.* seguida de *Escherichia coli*, y *Acinetobacter oryzae*, son las especies que presentaron mayor resistencia a los antibióticos utilizados. De acuerdo con (Marrero-Moreno et al., 2017, pp.2-4) y (Martínez y Villalobos, 2008, p.173), refieren que estas bacterias se aíslan con más frecuencia en los seres humanos, en animales de granja, así como en alimentos, y han dado lugar a fenotipos multirresistentes que conlleva a la ineficacia de la mayoría de antimicrobianos, es así que la especie de *E. coli*, un patógeno muy

común estudiado en las ETA, posee un flujo de plásmidos con genes de resistencia que reducen las opciones terapéuticas en especial con los fármacos betalactámicos y aminoglucósidos. Se evidenció en el antibiograma que las enterobacterias presentan resistencias y resistencias intermedias en algunos antibióticos que incluyen ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y amoxicilina/clavulánico resultados que coinciden con los reportados por (Ruiz-Roldán et al., 2018, p.426). La presencia de estos géneros bacterianos y de otros, son indicadores de la contaminación producida por una higiene deficiente en la manipulación de los alimentos (Valdivieso, Villalobos y Martínez, 2006, p.6).

Los aislamientos de *Pseudomona* identificados en el ceviche de chochos presentaron una resistencia para ampicilina, amikacina y ceftazidima. *P. aeruginosa* es naturalmente resistente debido a la impermeabilidad de la membrana externa y a sus plásmidos de resistencia antimicrobiana, entre otros factores, los resultados de resistencia observados no se alejan de los reportados por (Zambrano y Herrera, 2004, p.173), donde menciona el uso de fármacos anti pseudomonas, entre las cefalosporinas, ceftazidima mostró resistencia más alta, al igual que la ampicilina, seguida del aminoglucósido amikacina que también muestra una significativa resistencia. Estos microorganismos son usados como indicadores de la calidad del agua, y se encuentran comúnmente en productos vegetales frescos, leche cruda, carne y agua (ACSA, 2021, pp.1-2).

### **3.4. Actividad enzimática**


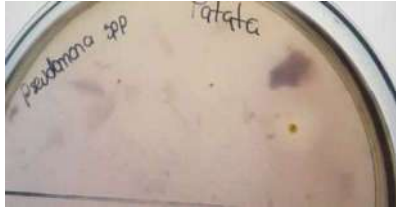

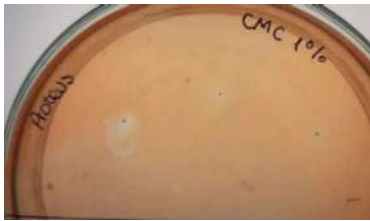

De los 13 crecimientos bacterianos evaluados, 5 bacterias presentaron actividades enzimáticas como se observa en la tabla 17-3. Dentro de los microorganismos que presentaron crecimiento en el medio con almidón y positividad frente al Lugol tenemos al *Acinetobacter johnsonni* y *Pseudomona spp.* formando un halo de aclaramiento alrededor de la colonia. Según (Rodríguez et al., 2006), en el transcurso del metabolismo celular, los microorganismos liberan al medio parte de su batería enzimática para utilizar los sustratos disponibles del medio, entre las exoenzimas que se liberan se encuentran las amilasas, mismas que cumplen un papel fundamental en la utilización del almidón como fuente de energía. Los microorganismos se consideraron amilolíticos cuando se observó una zona de degradación alrededor de la colonia, con una medición de entre 5 y 10 mm producto de la hidrólisis del almidón.


La evaluación de la actividad proteolítica presentó un resultado positivo para la cepa de *S. aureus* frente al agar suplementado con leche descremada al 6%, así mismo la actividad lipolítica en agar enriquecido con mantequilla al 10% con un resultado positivo, puesto que este microorganismo produce varias enzimas entre ellas proteasas que van a producir la hidrólisis de la caseína a polipéptidos, péptidos y aminoácidos libres y lipasas cuya función es catalizar la hidrólisis de

triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos evidenciado la formación de halos transparentes alrededor de las colonias resultados similares a los que menciona (Rodríguez y Chávez, 2018, pp.51-55).

La capacidad de celulolítica estuvo presente en las cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus spp.* mediante la formación halos claros de hidrólisis después del revelado con el Rojo Congo y la solución NaCl. La acción enzimática está dada por la capacidad que tiene la bacteria de sintetizar exoenzimas (celulasas), estas enzimas degradan a la celulosa, hidrolizándola en productos que puedan ser usados como fuente de energía y carbono, este proceso de degradación se puede llevar a cabo por dos sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos, dándose así la reacción enzimática a través de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias según lo descrito por (Loaiza, 2017, pp.40-48).

**Tabla 9-3:** Pruebas de actividad enzimática

	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Pseudomona spp</i>
<b>Actividad amilolítica</b>		
<b>Actividad proteolítica</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		
	<i>Proteus spp</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<b>Actividad celulolítica</b>		

	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Actividad Lipolítica</b>	




Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

### 3.5. Evaluación de viabilidad y pureza por el método crio preservación

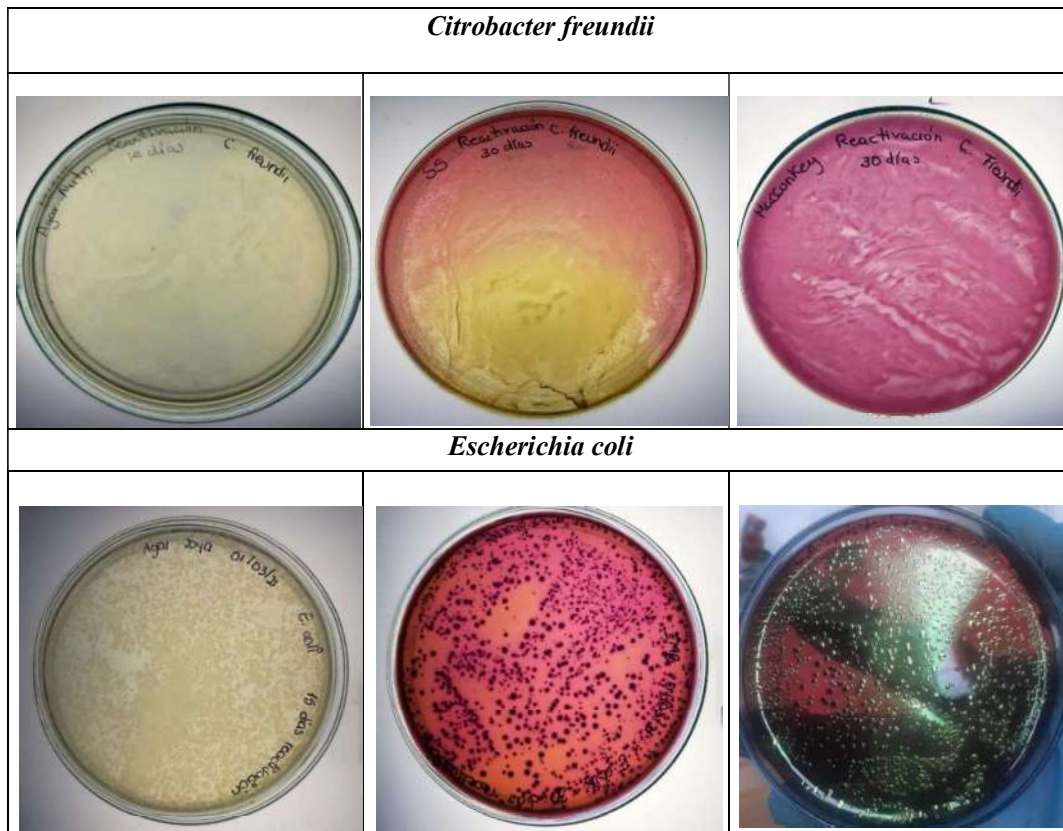
La congelación es un proceso físico químico, que se ha convertido en una alternativa de vital importancia para la conservación de microorganismo bacterianos, sin embargo su actividad bioquímica puede verse alterada debido al estrés bacteriano que sufren los microorganismos al estar sujetos a un cambio brusco de temperatura, pero este es un estado transitorio que debe ser mitigado durante el procedimiento de descongelación y el medio que se provea a los microorganismo para su crecimiento, el cuál debe ser líquido para facilitar el intercambio iónico y su restitución de la membrana rápidamente (Sánchez y Corrales, 2005, pp.21-29).

En la tabla 10-3, se evidenció el crecimiento realizado en los tres repiques, se considera una recuperación del 90 al 100 % ya que los microorganismos se mantuvieron así en todo el proceso.

**Tabla 10-3:** Viabilidad bacteriana por el método de crio preservación

15 DÍAS	30 DÍAS	60 DÍAS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
		





Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

Se logró obtener un crecimiento satisfactorio sobre los medios de cultivo utilizados para cada tipo de organismo, mostrando una alta viabilidad, que concuerda con la caracterización macroscópica y microscópica inicial, además no se presentaron problemas de contaminación, lo que indica que el método de conservación en glicerol al 30 % es apropiado para el mantenimiento de este tipo de organismos, similar a lo que reporta (Sánchez y Corrales, 2005, p.21-20), en su estudio donde se logró evidenciar una viabilidad del 70-100% de *S. aureus*, *E. coli*, *M. morganii*, *C. freundii* entre otros microorganismo usados para su estudio.

Así mismo menciona (Acosta 2019, p.25), en su estudio “Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander” en el cual sus resultados evidencian un alto porcentaje de viabilidad y pureza con un 99,5% en Glicerol al 30% similares a los obtenidos en esta investigación.

El uso de un crioprotector para la protección de estas células es necesario ya que protegen de algún daño que pueda sufrir la célula al momento de la congelación produciendo vitrificación alrededor de la bacteria impidiendo así lesiones en la membrana citoplásmica debido a la formación de cristales de hielo, en este estudio se utilizó el glicerol al 30% protegiendo tanto interna como externamente a la membrana puesto que se difunde a través de ella, similar a lo que reporta (Belmonte et al., 2008, p. 15-18).

En cuanto al método de conservación de acuerdo a lo propuesto por algunos autores la tasa de viabilidad con el glicerol es satisfactoria y tiene una disminución de la viabilidad a los 3 años, es incluso recomendada por “The American Type Culture Collection” (Burguet, Sierra y Acosta, 2014, p.52). El uso de este método de crioconservación es rápido, de bajo costo y apropiado para largos periodos de conservación, lo cual coincide con lo reportado por (Ortiz et al., 2016, p.38).

## CONCLUSIONES

- Se aislaron 28 cepas de bacterias presentes en muestras de ceviches de chochos de venta ambulatoria en la ciudad de Riobamba, de las cuales se identificaron 11 microorganismos que fueron acondicionados a los medios de cultivo y mediante varias resiembras hasta obtener las colonias puras; por otro lado 2 bacterias fueron reveladas mediante la prueba molecular PCR.
- Cada una de las cepas bacterianas aisladas presentaron características fenotípicas específicas de cada especie, lo cual permitió establecer parámetros de base para la identificación de microorganismos tomando en consideración los aspectos como forma, textura, color, tamaño de la colonia, aspecto de los bordes y con la caracterización microscópica ayudaron a la identificación de Gram (+) y Gram (-) de las familias bacterianas.
- Las pruebas de identificación bioquímicas clásicas y moleculares permitieron reconocer especies bacterianas de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Citrobacter*. Siendo muchas de estas patógenas con potenciales peligrosos a la salud del consumidor.
- La técnica del glicerol al 30% aplicada para la conservación bacteriana fue un método viable ya que mantienen una elevada viabilidad bacteriana e integridad morfológica, mediante el uso de un criocongelador a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  se logró la preservación a largo plazo, garantizando la supervivencia de las cepas aisladas.
- De las 15 bacterias identificadas 5 cepas bacterianas presentaron actividades enzimáticas entre ellos están *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomona* spp. con actividad amilolítica, *S. aureus* con presencia de actividad proteolítica, y *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus* spp. con actividad celulolítica, cada uno de ellos fueron sembrados en agares enriquecidos y formulados que permitió evidenciar la presencia de mencionadas actividades.

## **RECOMENDACIONES**

- Impulsar la continuidad de la investigación y llevar a cabo la caracterización de aquellas cepas que no pudieron ser identificadas en este estudio.
- Hacer uso de tecnologías automatizadas en la detección de patógenos de interés clínico en alimentos mediante pruebas diagnósticas moleculares para la identificación fiable, precisa y simultánea de diferentes patógenos causantes de ETAs en reemplazo a las pruebas bioquímicas clásicas.
- Sería de gran ayuda realizar evaluaciones periódicamente mediante métodos de detección de patógenos y a la vez aunar esfuerzos para el control de los hábitos de manipulación e higiene de alimentos expendidos de manera ambulatoria a través de la capacitación de prácticas correctas de higiene.
- Continuar con la investigación de las potencialidades biotecnológicas de las cepas bacterianas aisladas e identificadas para usos futuros.

## BIBLIOGRAFÍA

**ACSA - AGÈNCIA CATALANA DE SEGURETAT ALIMENTÀRIA**, 2021. Mapa de peligros alimentarios Peligro biológico - *Vibrio* spp. *Mapa de peligros alimentarios* [en línea]. [Consulta: 27 febrero 2021]. Disponible en: [https://mapaperills.uab.cat/pdf/perills/1119\\_biobac-P\\_aeruginosa-ES.pdf](https://mapaperills.uab.cat/pdf/perills/1119_biobac-P_aeruginosa-ES.pdf).

**ALIMI, B.A.**, 2016. Risk factors in street food practices in developing countries: A review. *Food Science and Human Wellness* [en línea], vol. 5, no. 3, pp. 141-148. [Consulta: 9 abril 2021]. ISSN 22134530. DOI 10.1016/j.fshw.2016.05.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2016.05.001>.

**ALVAREZ, M., BOUQUET, E. y DE FEZ, M.**, 1995. *Manual de Tecnicas en Microbiologia Clinica*. Garsi S.A. España: s.n.

**ANDINO, F. y CASTILLO, Y.**, 2010. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. *Curso Microbiología de los alimentos* [en línea]. [Consulta: 8 febrero 2021]. Disponible en: <https://1library.co/document/7q047rlz-un-enfoque-practico-para-la-inocuidad-alimentaria.html>.

**BAGATOLLI, C.**, 2017. *Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias* [en línea]. S.I.: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO. [Consulta: 13 noviembre 2020]. Disponible en: [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/8571/tesis-brom.-bagatolli-garfoli-2017.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8571/tesis-brom.-bagatolli-garfoli-2017.pdf).

**BARRERO CUEVAS, L.**, 2009. *M clínica icrobiología* [en línea]. España: EDITORIAL SÍNTESIS, S. A. [Consulta: 20 noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>.

**BELMONTE, A., NOGUERAS, M., CONTIGIANI, M., GANDINI, V. y SUTICH, E.**, 2008. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica* [en línea], vol. 72, no. 2, pp. 15-18. [Consulta: 5 enero 2021]. ISSN 1515-6761. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65112134003>.

**BENAVIDES, H.**, 2007. *PROPUESTA DE GUÍA DE APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA (BACTERIAS Y HONGOS) PARA SER UTILIZADO EN*

*MICROBIOLOGÍA GENERAL*. [en línea]. S.l.: (TRABAJO DE GRADUACIÓN). UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA. [Consulta: 5 febrero 2021]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4768/1/16100029.pdf>.

**BERMEO, L.P., FLOREZ RÍOS, D.M., OCAMPO GÓMEZ, M. y FRANCO, M., 2016.**

Colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada en el centro para la formación cafetera SENA regional Caldas. *Revista Nova (Colombia)* [en línea], vol. 2, no. 2, pp. 1-8. [Consulta: 7 enero 2021]. Disponible en: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/rnova/article/view/615/679>.

**BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., ANTONIO, J. y VALDEZATE, S.,**

2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [en línea], vol. 29, no. 8, pp. 601-608. [Consulta: 7 enero 2021]. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571>.

**BURGUET, N., SIERRA, N. y ACOSTA, M., 2014.** Evaluación de una formulación para la

conservación de cepas de *Pseudomona aeruginosa*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [en línea], vol. 45, no. 1, pp. 51-56. [Consulta: 27 marzo 2021]. ISSN 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181230079009.pdf>.

**CALVACHE, L., 2020.** “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA BACTERIANA EN

EL CEVICHE DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis sweet*) Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DE RIOBAMBA – 2019” [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 10 marzo 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14247/1/56T00930.pdf>.

**CAMACHO LÓPEZ, C.O., 2016.** *Caracterización y evaluación de bacterias para producción*

*de bioplástico de origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria lactea, 2015* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 7 febrero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4962>.

**FERNÁNDEZ, A., GARCÍA DE LA FUENTE, C., SAÉZ, J. y VALDEZATE, S., 2010.**

Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 1-52. [Consulta: 8 enero 2021]. ISBN 9788461479320. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

**FERNÁNDEZ ANDREU, C., DÍAZ SUÁREZ, L., ILLNAIT ZARAGOZÍ, M., LÓPEZ ARAGONÉS, C., MARTÍNEZ MACHÍN, G. y PERURENA LANCHA, M., 2012.** Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus. *REV CUBANA MED TROP* [en línea], vol. 64, no. 1, pp. 49-54. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedtro/cmt-2012/cmt121g.pdf>.

**GAITÁN BOHÓRQUEZ, M.D. y PEREZ PEREZ, L., 2007.** *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 5 febrero 2021]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8296/tesis274.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**GAMAZO, C., LÓPEZ-GOÑI, I. y DÍAS, R., 2005.** *Manual práctico de microbiología* [en línea]. 3a.Edición. Barcelona-España: MASSON,S.A. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=MfW3TuHL4gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=MfW3TuHL4gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

**GARCÍA, D. y URUBURU, F., 2012.** La conservación de cepas microbianas. [en línea]. S.l.: [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: [https://www.uv.es/cect2/87\\_Conservacion\\_cepas\\_microbianas](https://www.uv.es/cect2/87_Conservacion_cepas_microbianas).

**GARCÍA, E., 2013.** *Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas* [en línea]. S.l.: Universidad Nacional Autónoma de México. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_garcia\\_lopez.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_garcia_lopez.pdf).

**GÓMEZ, Á., 2019.** Lectura interpretada del Antibiograma en bacterias Gram positivas y negativas. *Zaguan.Unizar.Es*, pp. 0-43.

**GONZÁLEZ, D. y JIMÉNEZ, J., 2013.** Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiol* [en línea], vol. 4, no. 1, pp. 23-33. [Consulta: 6 febrero 2021]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/20093/16974>.

**GONZÁLEZ, D. y JIMÉNEZ, J.,** 2014. Colecciones microbianas: Importancia , establecimiento y regulación Microbial collections: importance , establishment and regulation. *Hechos Microbiol*, vol. 4, no. 1, pp. 23-33.

**GONZÁLEZ, T. y ROJAS, R.,** 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* [en línea], vol. 47, no. 5, pp. 338-339. [Consulta: 6 marzo 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/salpubmex/sal-2005/sal055j.pdf>.

**GUILLERMINA, M., BARBAGELATA, G., CASARETTO, L.P., INÉS, M., CIGANDA, M., CORREA, C.G., RUSIÑOL, G.A. y PENSADO, G.V.,** 2018. Staphylococcus aureus portador del gen mecA sensible a oxacilina (OS-MRSA): otro desafío para los laboratorios de microbiología. *Revista Medica Del Uruguay* [en línea], vol. 34, no. 4, pp. 242-245. [Consulta: 5 enero 2021]. ISSN 1688-0390. DOI 10.29193/rmu.34.4.8. Disponible en: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902018000400142](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902018000400142).

**GUTIÉRREZ, J., LUNA, L., MENDOZA, M., DIAZ, G., BURGUETE, J. y FELICIANO, J.,** 2015. Redalyc.Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas(UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea], vol. 35, no. 1, pp. 95-102. [Consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199444210007.pdf>.

**HERNÁNDEZ, A. y LOAIZA, A.,** 2014. *SELECCIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA* [en línea]. Pereira: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. [Consulta: 15 diciembre 2020]. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4316/57192H557.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**HOWARD, D.,** 1955. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *Journal of bacteriology* [en línea], vol. 71, no. 5, pp. 625-626. [Consulta: 9 febrero 2021]. ISSN 00219193. DOI 10.1128/jb.71.5.625-625.1956. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC357863/pdf/jbacter00534-0147.pdf>.

**HUERTAS, C., URBANO, E. y TORRES, M.,** 2019. Diagnóstico molecular una alternativa



para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [en línea], vol. 18, no. 3, pp. 513-528. [Consulta: 2 marzo 2021]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2019000300513#:~:text=La PCR y la qPCR,en la obtención de resultados.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000300513#:~:text=La PCR y la qPCR,en la obtención de resultados.)

**HÚNGARO, H.M., PEÑA, W.E.L., SILVA, N.B.M., CARVALHO, R. V., ALVARENGA, V.O. y SANT'ANA, A.S.,** 2014. Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* [en línea], vol. 3, pp. 213-231. [Consulta: 10 enero 2021]. ISSN 2214-7993. DOI 10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/288208448\\_Food\\_Microbiology](https://www.researchgate.net/publication/288208448_Food_Microbiology).

**LARREA-MURRELL, J.A., ROJAS-BADÍA, M.M., ROMEU-ÁLVAREZ, B., HEYDRICH-PÉREZ, M. y ROJAS-HERNÁNDEZ, M.,** 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas* [en línea], vol. 44, no. 3, pp. 24-34. [Consulta: 6 enero 2021]. ISSN 2221-2450. Disponible en: <file:///C:/Users/Naty2020/Downloads/181229302004.pdf>.

**LOAIZA, D.,** 2017. “*BACTERIAS CELULOLÍTICAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL INTESTINO DE TERMITAS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES DEGRADADORAS DE TOTORA (Schoenoplectus tatora)*” [en línea]. Perú: Universidad Nacional del Antiplano. [Consulta: 28 marzo 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/8494>.

**LÓPEZ, L. y TORRES, C.,** 2006. Medios de Cultivos Microbiología. *Universidad Nacional de Nordeste. Facultad de Agroindustrias.Microbiología.* [en línea]. S.l.: [Consulta: 5 enero 2021]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>.

**LUCIANA DE VERO, M., BONIOTTI, M.B., BUDRONI, M., BUZZINI, P., CASSANELLI, S., COMUNIAN, R., GULLO, M., LOGRIECO, A.F., MANNAZZU, I., MUSUMECI, R., PERUGINI, I. y PERRONE, G.,** 2019. Preservation , Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity : The Perspective of the Italian Network of Culture Collections. *Microorganisms 2019*, [en línea], vol. 7, no. 1, pp. 1-18. [Consulta: 24 enero 2021]. DOI doi:10.3390/microorganisms7120685. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6956255/>.

**LUNA FONTALVO, J.,** 2012. *Manual de prácticas de laboratorio: microbiología general y*

*aplicada* [en línea]. Editorial. Santa Marta, Colombia: s.n. [Consulta: 10 noviembre 2020]. Disponible en: <https://elibro.net/en/ereader/esepoch/70083?page=41>.

**MAHMMOUD, E.N.**, 2020. Comparison of preservation methods of staphylococcus aureus and escherichia coli bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [en línea], vol. 14, no. 3, pp. 2173-2180. [Consulta: 6 febrero 2021]. ISSN 2581690X. DOI 10.22207/JPAM.14.3.58. Disponible en: <https://microbiologyjournal.org/comparison-of-preservation-methods-of-staphylococcus-aureus-and-escherichia-coli-bacteria/>.

**MARRERO-MORENO, C., MORA LLANES, M., HERNÁNDEZ FILLOR, R.E., BÁEZ ARIAS, M., GARCÍA MOREY, T. y ESPINOSA CASTAÑO, I.**, 2017. Identification of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in pig farms in Matanzas province. *Rev. Salud Anim* [en línea], vol. 39, no. 3, pp. 2224-4697. [Consulta: 12 enero 2021]. ISSN 0253-570X. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0253-570X2017000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2017000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=en).

**MARTÍNES, R. y VILLALOBOS, L.**, 2008. ALIMENTOS Y AGUAS RESIDUALES EN CUMANÁ , VENEZUELA ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF Escherichia coli STRAINS ISOLATED FROM FOOD AND. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente* [en línea], vol. 20, no. 2, pp. 172-176. [Consulta: 30 enero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739434007.pdf>.

**MARTOS, M.**, 2015. Facultad de Ciencias Exactas Químicas Y Naturales – UNAM. Prof. Adjunta: Dra. María Alicia Martos JTP. Bqca Mgter Emilce Roxana Zubreski Auxiliar docente de Primera Dra. Ana Paula Butiuk. *Facultad de Ciencias Exactas Químicas Y Naturales – UNAM* [en línea], pp. 1-3. Disponible en: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L1BSwUNUSUNPUy9CSU9TRUdVUklEQUQvTk9STUFTX0RFX0JTT1NFR1VSSURBRF9FTI9CSU9URUNOT0xPR81BLi5wZGY%3D&cidReset=true&cidReq=BIOALIM>.

**MENDEZ, M., MINCHALA, L. y SÁNCHEZ, M.**, 2014. Características Del Expendio Del Chocho Y Su Relación Con La Contaminación Microbiológica En La Ciudad De Cuenca 2014. , pp. 1-75.

**MONTES DE OCA, N.M. De, GONZÁLES, R.A., RIVERÓN, Y., NUÑEZ, A. y VILLOCH, A.**, 2008. ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA COLECCIÓN DE CULTIVOS

DEL CENSA CULTURE COLLECTION DEVELOPMENT AND ESTABLISHMENT AT CENSA ABSTRACT : The use of the microorganisms has been a key when facing and solving serious problems. *Rev. Salud Anim.* [en línea], vol. 30, no. 1, pp. 17-24. [Consulta: 11 diciembre 2020]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2008000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2008000100003).

**MOREJÓN, L. y PARDO, E.,** 2008. Microbiología I. *Texto de Microbiología I*, pp. 34-36.

**NAVARRETE, V.,** 2017. "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA NATIVA DE MUESTRAS DE EFLUENTES DE CURTIEMBRES" [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 8 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8547/1/236T0323.pdf>.

**NTE INEN 1529-1,** 2013. *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS Primera edición* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. [Consulta: 8 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-1-1R.pdf>.

**NTE INEN 1529-2,** 2013. *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. [Consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1529-10-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf).

**NTE INEN 1529-8 PRIMERA REVISIÓN,** 2016. *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETECCIÓN Y RECuento DE ESCHERICHIA COLI PRESUNTIVA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE* [en línea]. 2016. S.l.: s.n. [Consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1529-8-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-8-1.pdf).

**NUÑEZ, C., ZAROR, L. y RIOS, R.,** 1975. Fiebre entérica por *Pseudomonas stutzeri*. *Revista Chilena de Pediatría* [en línea], vol. 46, no. 1, pp. 60-62. [Consulta: 12 febrero 2021]. ISSN 03704106. DOI 10.4067/s0370-41061975000100012. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v46n1/art12.pdf>.

**ORTIZ, T., V. OCAMPO, PRADA, L. y FRANCO, M.,** 2016. Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 18, no. 2, pp. 32. ISSN 0123-3475. DOI

10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47683.

**PACHECO, J. y SERPAS, R.,** 2013. *Evaluación de dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos* [en línea]. S.l.: Universidad de el Salvador. [Consulta: 9 diciembre 2020]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5268/1/16103407.pdf>.

**PALOMINO, C. y GONZÁLES, Y.,** 2014. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS: VENTAJAS. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [en línea], vol. 31, no. 3. [Consulta: 8 enero 2021]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000300020](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020).

**PELCZAR, M.P.R.,** 2019. Microbiología. *Microbiología. Encyclopædia Britannica*, pp. 1-17.

**PRAKASH, O., NIMONKAR, Y. y SHOUCHE, Y.S.,** 2013. FEMS Microbiol Lett. *Microbial Culture Collection, National Centre for Cell Science* [en línea], pp. 1-9. [Consulta: 22 enero 2021]. DOI 10.1111/1574-6968.12034. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/339/1/1/496578>.

**PRESCOTT, L.M.,** 2004. *Microbiología* [en línea]. S.l.: McGraw-Hill Interamericana. [Consulta: 5 febrero 2021]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/epoch/101900?page=1078>.

**PRIMO ARÁMBULO, I., ALMEIDA, C., CUÉLLAR, J. y BELOTTO, A.,** 1995. La venta de alimentos en la vía pública en América Latina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)* [en línea], vol. 118, no. 2, pp. 97-107. [Consulta: 10 febrero 2021]. ISSN 0030-0632. Disponible en: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/15621/v118n2p97.pdf?sequence=1&isAlloved=y>.

**PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS,** 2005. Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación. *PREPARADORES DE OPOSICIONES PARA LA ENSEÑANZA* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 1-20. [Consulta: 6 enero 2021]. Disponible en: <https://www.preparadores.eu/temamuestra/PTecnicos/Diagnostico.pdf>.

- QUISPE M, J.J. y SÁNCHEZ, V.P.**, 2001. Ambulatoria De Alimentos Del Distrito De Comas , Lima - Perú. *Rev Med Exp* [en línea], vol. 18, pp. 1-2. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/363/36318207.pdf>.
- RIVERA, L.**, 2015. *Microbiología: Interiorización del conocimiento de formas significativa y comprensiva* [en línea]. Machala: Universidad Técnica de Machala. [Consulta: 7 febrero 2021]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6852>.
- RODRIGUEZ HERNÁNDEZ, G. y CHÁVEZ MATÍNEZ, A.**, 2018. Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia* [en línea], vol. 43, no. 1, pp. 50-54. [Consulta: 10 marzo 2021]. Disponible en: [https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/01/50-CHAVEZ-43\\_1.pdf](https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/01/50-CHAVEZ-43_1.pdf).
- RODRÍGUEZ, P. y ARENAS, R.**, 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 1-2. [Consulta: 8 enero 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.
- RODRÍGUEZ, Z., BOUCOURT, R., RODRÍGUEZ, J., ALBELO, N., NUÑEZ, O. y HERRERA, F.**, 2006. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* [en línea], vol. 40, no. 3, pp. 349-354. [Consulta: 14 marzo 2021]. ISSN 0034-7485. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017723014.pdf>.
- ROMO MEJÍA, J.M.**, 2012. *Análisis de muestras en el laboratorio de microbiología 2a. ed.* [en línea]. Editorial. Malaga-España: s.n. [Consulta: 10 noviembre 2020]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/epoch/111381?page=114>.
- RUIZ-ROLDÁN, L., MARTÍNEZ-PUCHOL, S., GOMES, C., PALMA, N., RIVEROS, M., OCAMPO, K., DURAND, D., OCHOA, T.J., RUIZ, J. y PONS, M.J.**, 2018. Presence of multidrug resistant enterobacteriaceae and escherichia coli in meat purchased in traditional markets of lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* [en línea], vol. 35, no. 3, pp. 425-432. [Consulta: 30 enero 2021]. ISSN 17264642. DOI 10.17843/rpmesp.2018.353.3737. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30517502/>.
- RUSTRIÁN, E., RAMÍREZ, D., SOLANO, G. y DE ANDA-HERNÁNDEZ MARTHA**, 2013. Estudio preliminar de identificación bioquímica de Entero- bacterias en heces de

Coyote ( *Canis latrans* ) en vida salvaje y cautiverio Preliminary study of Enterobacterias biochemical identification - Bing. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*.

**SACSAQUISPE CONTRERAS, R.E. y VELÁSQUEZ POMAR, J.**, 2002. *Manual de procedimientos anual para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 10 febrero 2021]. ISBN 1501012002. Disponible en: [http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual\\_sensibilidad\\_2.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf).

**SÁNCHEZ, L. y CORRALES, L.**, 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Redalyc* [en línea], vol. 3, pp. 21-29. [Consulta: 28 marzo 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/411/41130403.pdf>.

**SANCHEZ, L. y RAMÍREZ, L.**, 2005. Congelación bacteriana : Factores que intervienen en el proceso. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA* [en línea], vol. 3, pp. 109-113. [Consulta: 15 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/411/41130312.pdf>.

**SORIA-NOROÑA, L.C. y LÓPEZ-ALMEIDA, J.V.**, 2020. Determinación del Índice de Potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas. *Dominio de las ciencias* [en línea], vol. 6, no. 2, pp. 1091-1106. [Consulta: 2 febrero 2021]. ISSN 2477-8818. Disponible en: <https://www.dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/1269/html>.

**SUZZI, G. y CORSETTI, A.**, 2020. Food Microbiology : The Past and the New Challenges for the Next 10 Years. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 11, no. 237, pp. 10-12. [Consulta: 6 mayo 2021]. DOI 10.3389/fmicb.2020.00237. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00237/full>.

**TABASHSUM, Z., KHALIL, I., NAZIMUDDIN, M.D., MOLLAH, A.K.M., INATSU, Y. y BARI, M.L.**, 2013. Prevalence of Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms and Their Drug Resistant Status in Different Street Foods of Dhaka city. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, vol. 3, no. 4, pp. 281-292.

**TAROCCO, R., SEIJA, V. y VIGNOLI, R.**, 2000. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos*. [en línea]. S.l.: s.n., pp. 663-672. [Consulta: 5 enero 2021]. Disponible en: <http://higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>.

**TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, P.**, 2020. *Tecnología y procesamiento de alimentos Introducción a la microbiología de los alimentos* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 9 enero 2021]. Disponible en: <https://aggie-horticulture.tamu.edu/food-technology/food-processing-entrepreneurs/microbiology-of-food/>.

**TERRAGNO, R., MARTOS, G., SÚAREZ, R. y DAVEL, G.**, 2010. RECOMENDACIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO Y FUNCIONAMIENTO DE COLECCIONES DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS. , vol. WFCC-3ra.

**UTRERAS, V., COBA, J. y ECHEVERRÍA, A.**, 2014. DETERMINACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE *Escherichia coli* EN MUESTRA... *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* [en línea], vol. 19, no. 1, pp. 44-50. [Consulta: 5 marzo 2021]. Disponible en: [https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8851/1/Determinacion por PCR en tiempo real de Escherichia coli en muestras de comida rapida.pdf](https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8851/1/Determinacion%20por%20PCR%20en%20tiempo%20real%20de%20Escherichia%20coli%20en%20muestras%20de%20comida%20rapida.pdf).

**UZUNOVA, T. y DONEV, T.**, 2005. Anabiosis and Conservation of Microorganisms. *Journal of culture collections* [en línea], vol. 4, no. 1, pp. 17-28. [Consulta: 6 febrero 2021]. ISSN 1310-8360. Disponible en: <http://nbimcc.org/JCC/2005/JCC0542/JCC0542.pdf>.

**VALDIVIESO, N., VILLALOBOS, L. y MARTÍNEZ, R.**, 2006. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana – Venezuela Nailec. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea], vol. 26, no. 2, pp. 2-9. [Consulta: 30 enero 2021]. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562006000200006&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562006000200006&script=sci_arttext&tlng=en).

**VALENCIA-GUERRERO, M.F., QUEVEDO-HIDALGO, B., FRANCO-CORRREA, M., DIEZ-ORTEGA, H. y RODRIGUEZ-BOCANEGRA, M.**, 2011. Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium spp.*, aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum* [en línea], vol. 16, no. 2, pp. 147-159. [Consulta: 7 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/499/49921209004.pdf>.

**VÁSQUEZ, G.**, 2003. La Contaminación de los Alimentos, un Problema por Resolver. *Revista Salud Uis* [en línea], vol. 35, no. 1, pp. 48-57. [Consulta: 5 enero 2021]. ISSN 2145-8464. Disponible en: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/728/1014>.

**VERA, J., RIBAS-APARICIO, R.M., OSORIO-CARRANZA, L. y APARICIO, G.**, 2006. De Origen Hospitalario Multirresistentes a 21 Antibióticos. *Bioquímica* [en línea], no. 2, pp.

41-48. [Consulta: 10 febrero 2021]. Disponible en:  
<https://www.redalyc.org/pdf/576/57631202.pdf>.

**ZAMBRANO F., A. y HERRERA A., N.**, 2004. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Revista chilena de infectología* [en línea], vol. 21, no. 2, pp. 117-124. [Consulta: 30 enero 2021]. ISSN 0716-1018. DOI 10.4067/s0716-10182004000200003. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v21n2/art03.pdf>.



## ANEXOS

### Anexo A: Recolección de muestras.



**Fotografía 1.** Puestos ambulantes de ceviche de chochos en la ciudad de Riobamba.

### Anexo B: Homogenización de la muestra.



**Fotografía 2.** Homogenización de muestras en el STOMACHER.

**Anexo C:** Técnica de siembra por diluciones.

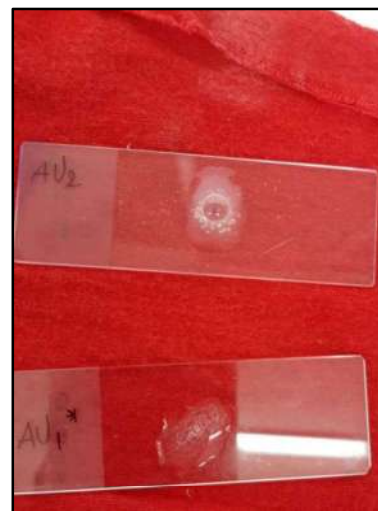


**Fotografía 3.** Preparación de diluciones.

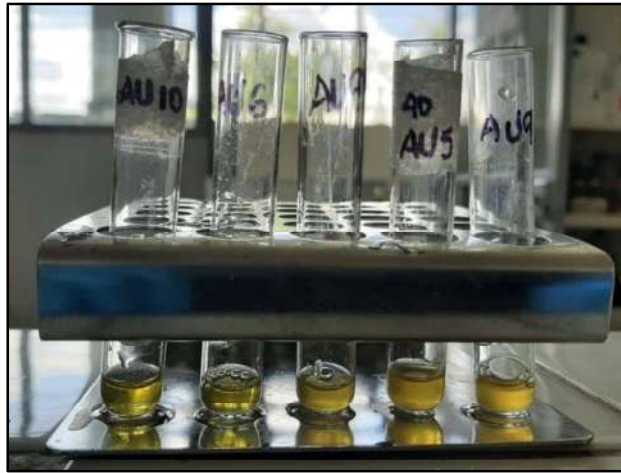
**Anexo D:** Pruebas enzimáticas.



**Fotografía 4 A.** Prueba de Oxidasa.

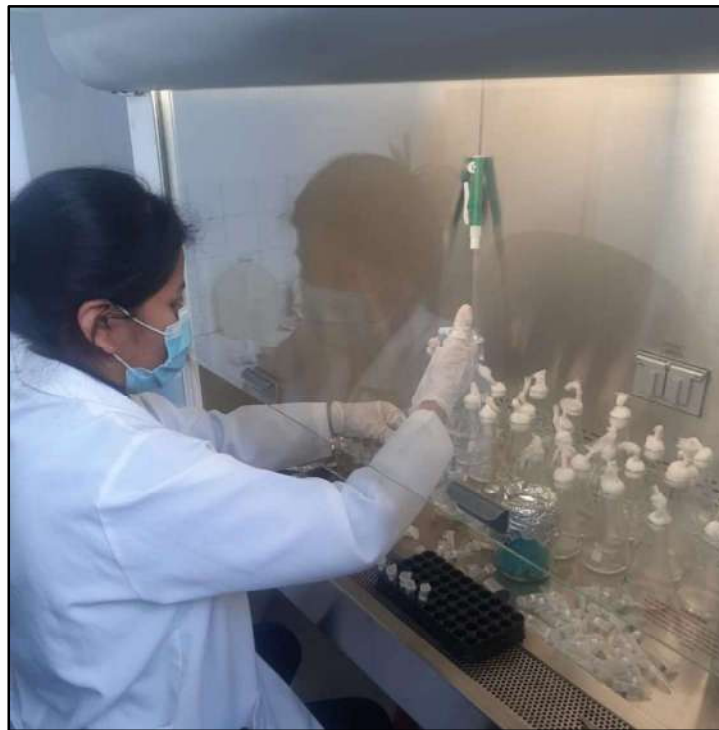


**Fotografía 4 B.** Prueba de Catalasa.



**Fotografía 4C.** Prueba de coagulasa.

**Anexo E:** Técnica de conservación con glicerol.



**Fotografía 5.** Preparación de solución de glicerol al 30%.

**Anexo F:** Conservación por crio congelación.



**Fotografía 6A.** Colocación de viales en el crio congelador.



**Fotografía 6 B.** Viales crio congelados en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo G:** Evaluación de la viabilidad de las cepas aisladas.



**Fotografía 7.** Revitalización de los viales en Baño María.

**Anexo H:** Composición del agar patata dextrosa.

Composición	g/L
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Infusión de papa de 200 g	4.0 g
pH	5.6 ± 0.2 at 25°C

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Anexo I:** Composición del medio mantequilla modificado.

Composición		g/L
Agar nutritivo	Extracto de res	3.0 g
	Peptona	5.0 g
	Agar	15.0 g
Mantequilla		10.0 g
Tween 80		10.0 ml

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Anexo J:** Composición del medio caseína.

Composición		g/L
Agar	Digerido pancreático de caseína	5.0 g
	Extracto de levadura	2.5 g
PCA	Dextrosa	1.0 g
	Agar	15.0 g
Leche descremada		6 % (v/v)

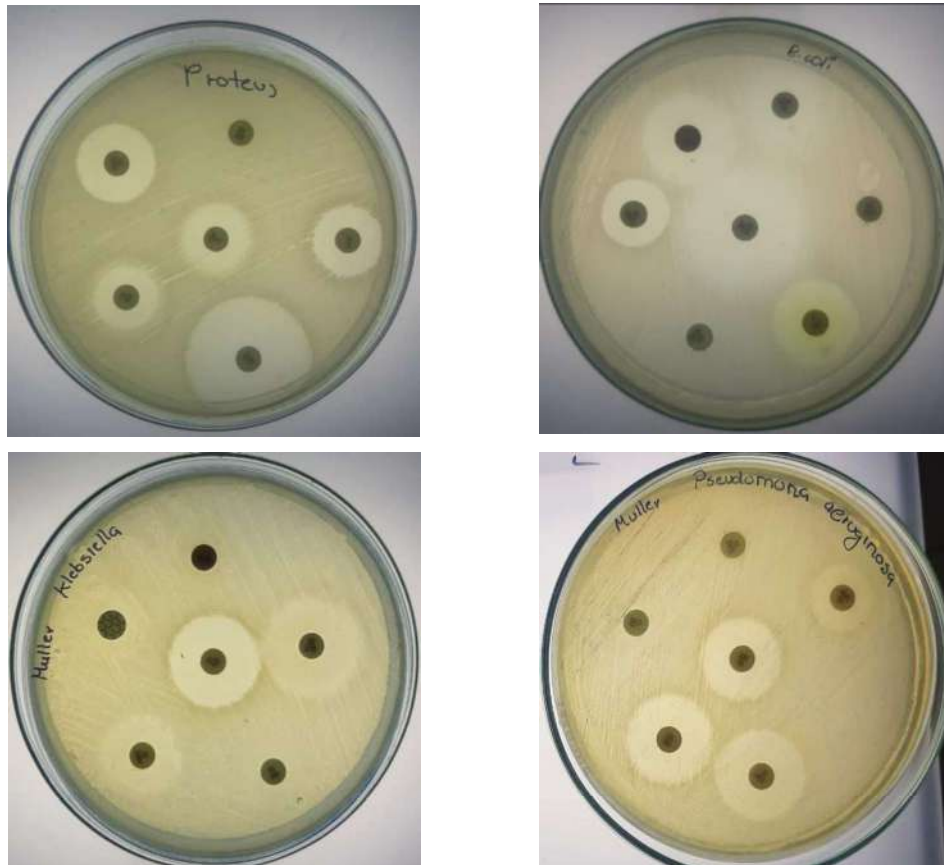
Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Anexo K:** Composición del medio celulosa.

Composición		g/L
Agar nutritivo	Extracto de res	3.0 g
	Peptona	5.0 g
	Agar	15.0 g
CMC		1% (p/v)

Realizado por: Cueva Dayana; Mayorga Nataly, 2020.

**Anexo L:** Antibiograma Disco-Placa.



**Fotografía 8.** Medición de halos de inhibición.

**Anexo M:** Medición de halos de inhibición del antibiograma.

Microorganismos	Familia <i>Micrococcaceae</i>					
	Antibióticos y Susceptibilidad					
	P	OX	E	EMV	DA	TE
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	R	R	21	10	17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	18	08	18	10	17
<i>Streptococcus faecium</i>	21	R	18	28	08	R
	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>					
	Antibióticos y tamaño de halo de inhibición (mm)					
	AM	CN	EMV	SXT	TE	AMC
<i>Proteus spp</i>	10	13	11	R	R	17
<i>Escherichia coli</i>	R	13	21	21	17	10
<i>Klebsiella Pheumoniae</i>	R	20	11	21	R	18
<i>Yersenia enterocolítica</i>	R	15	32	27	21	17
<i>Citrobacter freundii</i>	R	18	22	26	15	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	09	10	R	R	R	15
<i>Acinetobacter oryzae</i>	10	14	14	R	R	17
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	26	21	19	23	21	30
	Especie de <i>Pseudomona</i>					
	GN	AK	CIP	CAZ	AMC	AM
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	19	15	20	R	15	R
<i>Pseudomona ssp</i>	23	25	40	R	18	R

AM: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; P: penicilina; OX: oxacilina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; EMV: cloranfenicol; SXT: trimetoprim sulfametoxazol; TE: tetraciclina; E: eritromicina; DA: clindamicina; AK: amikacina; CAZ: ceftazidima. S: sensible; R: resistente, I: resistencia intermedia.