



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición**

**Caracterización microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen  
ecuatoriano**

**Miguel Angel Monar Guerrero**

**Irene Dávalos Teran**

**Lucia Ramirez, Ph.D., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de Ingeniería en  
Alimentos

Quito, Mayo del 2013

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Caracterización microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen  
ecuatoriano**

**Miguel Angel Monar G.**

**Irene Dávalos Teran**

Lucia Ramirez, PhD.

Director de Tesis y

miembro del comité de Tesis



---

Sonia Zapata

Co-Director de Tesis y

miembro del comité de Tesis



---

Javier Garrido, M. Sc.

Director de Ingenieria de Alimentos y

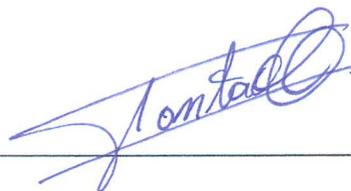
miembro del comité de Tesis



---

Stalin Santacruz, PhD.

miembro del comité de Tesis



---

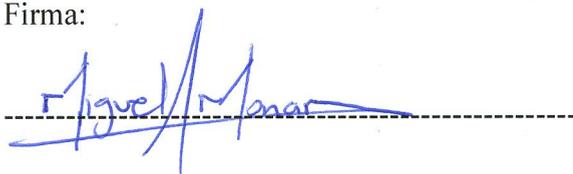
Quito, Mayo del 2013

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:



Nombre: Miguel Angel Monar Guerrero

C. I.: 1718363110

Fecha: 15 de Mayo de 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

IRENE DÁVALOS T

Nombre: Irene Dávalos Terán

C. I.: 1713206983

Fecha: 15 de mayo de 2013

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mis padres, hermanos, sobrina, mi novia, mi abuela que en estos momentos sé que me estas acompañando desde arriba, mis familiares y todas las personas que nos ayudaron a completar la tesis, que nos guiaron y que creyeron en nosotros.

A todos los futuros ingenieros de Alimentos, que sin importar cuan complicado sea su tema o cuanto tarde en realizarse su tesis siempre seguir adelante, aprender de los errores y sin importar cuantas veces, repetirlas hasta lograr el resultado esperado.

Miguel Ángel Monar Guerrero

Esta tesis la dedico a Dios por ser mi fuerza e inspiración.

Irene Dávalos Terán

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer principalmente a Dios por darme la vida y energía para realizar esta tesis. Quisiera agradecer además a mis padres, Miguel y María, por apoyarme y alentarme durante la elaboración de esta tesis. Mis hermanos, Carla y Pablo por aconsejarme y brindarme toda la ayuda que necesité.

Quisiera agradecer también a mi hermosa sobrina, la cual sin importar el cansancio, la falta de sueño o la falta de energía ella con cada palabra me motivaba o me hacía olvidar de los problemas.

Quisiera agradecerle a mi novia, Irene Portilla, que yo sé que si no hubiera sido por los detalles, cariño y comprensión no hubiera podido presentar ni finiquitar la tesis. Gracias por estar ahí en todo momento y ser mi soporte en cada momento.

Quisiera agradecer a mi Directora de tesis y mi tutora de toda mi vida estudiantil Lucía Ramírez. Gracias por ser una guía no solo en el aspecto académico sino en la parte personal también. Gracias por la paciencia todos estos años y por en sus palabras “aguantarme” en cada una de sus clases, año tras año y hasta en la tesis.

Quisiera agradecer también a mi Codirectora, Sonia Zapata, por su ayuda incondicional durante todos los procesos de la tesis, sus jadas de orejas y sus extensas correcciones.

Finalmente le quisiera agradecer a mi compañera de tesis, por toda la paciencia y ganas que le pusimos, porque a pesar de las pocas peleas y de sentarnos frente a nuestros computadores por extensas horas por fin logramos terminar este tan preciado trabajo, sin descuidar nuestra amistad.

Miguel Ángel Monar

Agradezco a Lucia Ramírez, Sonia Zapata y Miguel Monar por su dedicación y esfuerzo. A mis padres por su cariño y paciencia. A Bernardo Proaño, Santiago Aguirre y Andrés Sandoval por su gran ayuda.

Irene Dávalos Terán

## Tabla de Contenido

ABSTRACT .....	10
Microorganismos presentes en la bebida de kéfir de Agua .....	13
Microorganismos de Alimentos Fermentados .....	15
Bacterias Acidolácticas .....	15
Efectos benéficos de Bacterias Ácido Lácticas (LAB) .....	17
Levaduras .....	17
Interacción entre Bacterias ácido Lácticas y Levaduras .....	18
Los microorganismos como Probióticos .....	18
Efectos benéficos del Kefir de Agua.....	19
Identificación de Microorganismos Fermentadores .....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos específicos .....	24
Hipótesis .....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Materiales.....	24
Miel .....	24
Agua .....	25
Tíbcicos.....	25
Métodos .....	25
Análisis Físico-Químicos .....	25
Análisis Microbiológicos .....	25
Análisis molecular.....	27
Elaboración del Kefir de Agua Artesanal de Origen Ecuatoriano.....	29

Formulación inicial .....	29
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	30
FOCUS GROUP .....	31
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	32
Análisis Físico-Químicos .....	32
Grados Brix .....	32
Acidez.....	34
Tabla de Ponderación.....	38
Análisis Microbiológico .....	38
Identificación Bacteriana .....	43
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES .....	47
ANEXOS .....	52
Recuento MRS dilución <b>10<sup>-6</sup></b> .....	52
Recuento M17 dilución <b>10<sup>-5</sup></b> .....	52
Recuento Saboraud dilución <b>10<sup>-4</sup></b> .....	53
Resultados Amplificación 16S.....	53

## ABSTRACT

Sugary Kefir is a house-made fermented drink elaborated mainly in Mexico and Brazil, to which probiotic properties are attributed. In this study changes in acidity and °Brix of Ecuadorian artisanal sugary kefir, elaborated with three different types of sweeteners (sugar cane, honey and granulated sugar), were measured every 24 hours during 72 hours of fermentation. A focus group evaluated the samples and selected three of them due to sensorial characteristics. Acidity and °Brix were measured to provide with chemical specifications. According to the weighting grid two samples were selected and a microbiological count was performed to determine which sample had the highest count of microorganisms. The sample that had more acceptance due to physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics was the treatment that had honey as sweetener after 48 hours of fermentation. A phenotypic and genotypic (rDNA 16S sequencing) characterization was performed to the lactic acid bacteria present in this sample. As a result, the predominant microbiota of the beverage consisted on *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. According to the bibliographic investigation this beverage is a possible probiotic.

## Resumen

El kéfir de agua es una bebida fermentada elaborada de forma casera principalmente en México y Brasil a la cual se le atribuyen propiedades probióticas. En este estudio se determinaron los cambios de acidez y °Brix del Kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano, elaborado con tres tipos de endulzantes (panela, miel de abeja y azúcar blanca granulada), a las 24, 48 y 72 horas de fermentación. Un grupo focal evaluó las muestras y seleccionó tres debido a sus características sensoriales, midiéndose también la acidez y °Brix para obtener las especificaciones químicas. De acuerdo a la tabla de ponderación de las variables de respuesta se escogieron dos tratamientos que fueron analizados microbiológicamente para determinar el que tenía mayor número de microorganismos. El tratamiento con mayor aceptación debido a sus características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales fue el de miel de abeja a las 48 de fermentación. Después de una caracterización fenotípica y genotípica (secuenciación ADNr 16s) de las bacterias ácido lácticas presentes en esta muestra, se determinó la presencia predominante de *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae*. Según la investigación bibliográfica realizada se le puede considerar al kéfir de agua un posible probiótico.

## INTRODUCCIÓN

### **Kefir de Agua o Sugary kefir**

El kéfir de agua o kéfir azucarado es una bebida fermentada consumida de forma casera principalmente en México y Brasil. Es elaborado a base de una solución de sacarosa, generalmente entre 3 y 10%; frutas frescas, principalmente limones; frutas secas como higos y un inóculo de microorganismos denominados “tílicos” o “tibi” (C.P. et al., 2011). Los tílicos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20mm, apariencia transparente y estructura elástica (Waldherr et al., 2010). Producto de la fermentación durante uno o dos días a temperatura ambiente se obtiene una bebida carbonatada ligeramente coloreada, con sabor levemente ácido por la producción de ácido láctico y ácido acético, poca cantidad de azúcar y una ligera cantidad de alcohol (Gulitz et al., 2011), que no llega a superar el 2% (v/v) (Teixeira et al., 2010).

El origen de los gránulos de kéfir de agua es aún incierto. Existen algunas descripciones de gránulos similares llamados “plantas de cerveza de jengibre” que soldados ingleses importaron de la guerra de Crimea en 1855 (Waldherr et al., 2010). Así mismo, se reportaron “granos Tibi” de origen mexicano que son relacionados con el cactus (*Opuntia*) de donde los gránulos eran removidos de las hojas. Son varios los nombres con los que se les conoce a los tílicos, como: “abejas de California”, “abejas Africanas”, “nueces de cerveza”, “balm of gilead” y “semillas japonesas de cerveza”. Finalmente fueron denominados “granos de kéfir azucarado” con el fin de distinguirlos del kéfir de leche (Waldherr et al., 2010).

En general, la microbiota del kéfir de agua está compuesta por una estructura de polisacárido dextrinado insoluble en agua, en donde viven en simbiosis bacterias

acidolácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras. El polisacárido es un polímero de glucosa con enlaces  $\alpha$  1-6. Se ha identificado al *Lactobacillus hilgardii* como la principal bacteria encargada de la producción del polímero, por medio de la enzima glicosiltransferasa (Waldherr et al., 2010).

Los microorganismos presentes en cada gránulo de kéfir de agua dependen de la región, así como del país de origen. Un estudio realizado en Brasil comparó los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir provenientes de diferentes regiones del país. Se encontraron diferencias en la composición de la microbiota del gránulo según su lugar de origen; sin embargo, el impacto del clima, medios y métodos de cultivo permanecen desconocidos (Miguel et al., 2011). Se encontró la presencia de *Lactobacillus* en todas las muestras de kéfir, sin embargo existían diferencias en las especies ácido acéticas como *Acetobacter lovaniensis* aisladas de los estados de Bahía y Distrito Federal y *Gluconacetobacter liquefaciens* aislada del estado de Bahía y Goiás (Miguel et al., 2011).

### **Microorganismos presentes en la bebida de kéfir de Agua**

Son varios los estudios que se han realizado para determinar cuáles son las bacterias y levaduras presentes en los gránulos de kéfir de agua. Según Teixeira et al. (2010) al aislar un total de 289 bacterias y 129 levaduras, durante el proceso fermentativo, el 57.65% fue bacterias acidolácticas, seguidas de levaduras que representaban el 30.86% y finalmente las bacterias acéticas con el 11.48%. En la Tabla 1 se indican las bacterias y levaduras presentes en los gránulos de kéfir de agua.

**Tabla 1.- Bacterias y levaduras presentes en los gránulos de kéfir de agua**

<b>BACTERIAS</b>	<b>%</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	23.8
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	16.61
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	11.76
<i>Lactobacillus kefir</i>	10.03
<i>Lactococcus lactis</i>	10.03
<i>Lactobacillus casei</i>	8.6
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei</i>	7.96
<i>Leuconostoc citreum</i>	5.54
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans</i>	3.11
<i>Lactobacillus buchneri</i>	2.42

<b>LEVADURAS</b>	<b>%</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54.26
<i>Kluyveromyces lactis</i>	20.15
<i>Lachancea meyersii</i>	10.85
<i>Kazachstania aerobia</i>	14.73

Fuente: Teixeira et al., 2010

Por otro lado, en estudios realizados por Aldherr (2010) se encontraron las siguientes bacterias: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *Lactobacillus casei subsp. pseudopantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, *Enterobacter hormachei*, *Gluconobacter frateuri*; en lo que se refiere a levaduras encontró *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vinae*, *Hanseniaspora yalbensis*, *Kloeckera apiculata*, *Candida lambica*, *Candida valida*. Por otro lado, Gulitz (2011) reportó cepas de *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Lc. citreum*, *Lc. mesenteroides*, *Ac. fabarum*, *Ac. orientalis*.

## **Microorganismos de Alimentos Fermentados**

### ***Bacterias Acidolácticas***

Dentro de las bacterias acidolácticas (LAB) se incluyen tres géneros tradicionales *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Sin embargo, se incluye también a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*. Las bacterias pertenecientes al género *Carnobacterium* son cepas que antiguamente se clasificaban como *Lactobacillus*; mientras que, los otros tres géneros estuvieron previamente clasificados como *Streptococcus* (Jay, 1994).

A pesar de la amplia diversidad de bacterias ácidolácticas comparten una serie de características tales como: son bacilos o cocos Gram-positivos asporógenos, producen ácido láctico a partir de hexosas, en su mayoría son aerotolerantes que carecen de citocromos y porfirinas, por lo que son catalasa y oxidasa negativa (Adams y Moss, 1997) y crecen dentro de un rango de pH de 4.0 y 4.5. Por otro lado, tomando en cuenta los productos finales de su metabolismo se dividen en homofermentativas y heterofermentativas (Jay, 1994).

Las bacterias homofermentativas son aquellas que producen ácido láctico como único producto de la fermentación de la glucosa, poseen las enzimas aldolasa y hexosa-isomerasa, permitiendo que utilicen la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para producir dos moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucosa (Jay, 1994). Sus principales representantes son los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*.

Por otro lado, las bacterias que producen cantidades equimolares de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono a partir de las hexosas se denominan heterofermentativas. Este grupo se caracteriza por impartir aroma y sabor al producto final debido a la producción de

acetaldehído y diacetilo. Los géneros más representativos de este grupo son *Leuconostoc* así como algunos *Lactobacillus*. A diferencia de las homofermentativas, estas bacterias tienen la enzima fosfoacetolasa, que permite la degradación de la glucosa a través de la vía del monofosfato de hexosa o de las pentosas fosfato (Jay, 1994).

**Lactobacillus.**- Son bacilos Gram-positivos, catalasa y oxidasa negativos que forman cadenas largas la mayoría de veces. Los que se encuentran en los alimentos son típicamente microaerófilos; sin embargo, algunas cepas son aerobias estrictas, en especial aquellas que viven en las heces humanas. Se encuentran principalmente en hortalizas, productos lácteos y carnes envasadas (Jay, 1994).

**Leuconostoc.** Son cocos Gram-positivos, catalasa negativos y heterofermentativos. Algunos *Lactobacillus* se agrupan con *Leuconostoc* para formar una “rama de *Leuconostoc*”. Es una especie importante en la producción de vinos (Jay, 1994). Se utiliza también para la producción de queso, mantequilla, kimchi y masa fermentada (De Bruyne, 2007).

**Acetobacter.**- Son bacterias Gram-negativas, catalasa positivas, oxidasa negativa y aerobias estrictas. Son responsables de la oxidación del etanol a ácido acético, y son comúnmente usadas en la producción de vinagre. Además, tienen la capacidad de oxidar el ácido acético a dióxido de carbono y agua (Adams y Moss, 1997).

### ***Efectos benéficos de Bacterias Ácido Lácticas (LAB)***

Las bacterias ácidolácticas poseen numerosas características metabólicas, como su acción acidificante, proteolítica, síntesis de bacterosinas, resistencia al ataque de virus y la producción de exopolisacárido. Todas estas actividades contribuyen con el sabor, textura y frecuentemente con los atributos nutricionales de los productos. La actividad de inhibición de otras bacterias puede ser el resultado de la producción de diferentes ácidos y metabolitos como ácido láctico y ácidos orgánicos similares, peróxido de hidrógeno, bacterosinas así como diacetil y CO<sub>2</sub> (Adams y Moss, 1997).

Algunos estudios muestran que las bacterias acidolácticas estimulan el sistema inmune, aumentando el número de macrófagos, linfocitos, inmunoglobulina A (IgA) y la producción de interferón gamma. Estos efectos ayudan a mejorar la resistencia del hospedador frente a la colonización de microorganismos patógenos (Jay, 1994).

Por otro lado, en modelos animales *Lactobacillus acidophilus* ha demostrado actividad antitumoral (Adams y Moss, 1997). Un posible mecanismo puede ser la reducción de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa, azorreductasa y nitrorreductasa en el material fecal cuando se consumen LAB. Estas enzimas son producidas por la microbiota intestinal y pueden convertir los procarcinógenos en carcinógenos dentro del intestino.

(Adams y Moss, 1997).

### ***Levaduras***

**Saccharomyces.-** Son levaduras ascosporógenas que se multiplican por geminación multilateral y producen esporas redondas dentro de ascas. Son diploides y no fermentan lactosa (Jay, 1994). La calidad organoléptica presente en el kéfir se debe a la presencia de *S. cerevisiae*. Este género permite que la bebida tenga un fuerte y típico aroma a levadura

así como un sabor refrescante y pungente. Además, reduce la concentración de ácido láctico, remueve el peróxido de hidrógeno, produce compuestos que estimulan el crecimiento de otras bacterias, y estimula la producción de exopolisacáridos (Teixeira et al., 2010).

### ***Interacción entre Bacterias ácido Lácticas y Levaduras***

La simbiosis entre levaduras y bacterias en los “típicos” se lleva a cabo debido a que el crecimiento de las levaduras se produce por la acidificación del medio creado por las bacterias; mientras que el crecimiento de las bacterias es estimulado por la producción de factores de crecimiento (vitaminas) y compuestos nitrogenados solubles por parte de las levaduras (Teixeira et al., 2010).

### ***Los microorganismos como Probióticos***

Un probiótico se define como “microorganismos vivos que contribuyen a la salud y bienestar del huésped manteniendo o mejorando su balance intestinal microbiano” (Firat et al., 2010). Para que una determinada cepa mantenga y ejerza su potencial probiótico en una persona, debe poseer la habilidad de resistir un pH extremadamente bajo y el efecto detergente de las sales biliares, además de tener la capacidad para adherirse y colonizar la mucosa intestinal (Firat et al., 2010).

Se han realizado estudios sobre las propiedades que ofrecen los probióticos para reducir el riesgo y prevenir o tratar enfermedades intestinales. De los 622 estudios revisados, 235 describían resultados no específicos por los pacientes; mientras que, en 387 estudios restantes se reportó la ausencia o presencia de eventos adversos específicos. Por lo tanto se

concluyó que, la literatura actual no tiene los fundamentos suficientes para determinar que el uso de probióticos es seguro (Agency for Healthcare Research and Quality, 2011).

En investigaciones realizadas por Firat et al. (2010) para determinar el efecto probiótico de las bacterias *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., y *Pediococcus* spp. encontradas en el kéfir de leche, se determinó que estas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir a bajos niveles de pH, a las sales biliares y que son capaces de autoagregarse (capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino) y coagregarse con *E. coli*. La coagregación presenta una barrera que previene la colonización de microorganismos patógenos. Dados los resultados estos géneros bacterianos pueden ser considerados probióticos potenciales.

### ***Efectos benéficos del Kefir de Agua***

Son varios los beneficios que se le atribuyen al kéfir de agua que son anticipados por los consumidores tales como: tratar padecimientos del aparato digestivo, úlceras, colitis ulcerosa, intolerancia gástrica, colon irritable, divertículos entre otros (Palmetti, 2012); sin embargo, varios de estos atributos no tienen un soporte científico establecido (Teixeira et al., 2010).

Un estudio mostró que al comparar el poder cicatrizante del carbohidrato obtenido del kéfir de agua con el poder cicatrizante del neomycin-clostebol (Combinación de neomicina, un antibiótico de amplio espectro con clostebol, esteroide de uso tópico que aumenta la velocidad de cicatrización), ambos aplicados de forma tópica en heridas inducidas en ratas de laboratorio. El carbohidrato de kéfir fue capaz de inhibir la acción inflamatoria de manera similar que el neomycin-clostebol en heridas; sin embargo, esta droga es conocida por presentar efectos colaterales como problemas hepáticos, disfunciones reproductivas y riesgos neoplásicos. Por lo tanto, se recomienda el uso de una

solución a base de gránulos de kéfir frente al neomycin-clostebol (Thomson, 2004; Moreira et al., 2007).

Otro de los beneficios que se produce al consumir kéfir se debe a la presencia de *Lactobacillus plantarum*. Según la investigación desarrollada por Yanping et al. (2007) en la cual se agregó *L. plantarum* liofilizado a una dieta alta en colesterol, se observó que ratas no manifestaron ninguna variación en cuanto a su peso corporal, comida ingerida y eficiencia de alimentación. Por otro lado, se presentó una reducción de colesterol sérico, LDL (Lipoproteína de baja densidad) y los niveles de triglicéridos. Adicionalmente se produjo una gran reducción en el colesterol así como de triglicéridos en el hígado, demostrando de esta manera que el colesterol se redujo y no se redistribuyó en la sangre o en el hígado.

Es importante la reducción de LDL como del colesterol total debido a que elevadas cantidades de estos están altamente relacionadas con un incremento en el riesgo de enfermedades coronarias. Su reducción en hombres hipocolesterolémicos puede disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Yanping et al., 2007).

Además, se notó que la concentración de ácido propiónico en las heces de los animales se incrementó significativamente, casi tres veces más con relación al grupo control (que no fue alimentado con *L. plantarum*). Esto indica que una de las vías de síntesis de colesterol se vio afectada, reduciendo de esta forma su concentración (Yanping et al., 2007).

Otros estudios realizados determinaron que *Lactobacillus kéfir* presente en los gránulos de kéfir tiene la capacidad de antagonizar la invasión y/o adhesión de *Salmonella enteritidis*. La *Salmonella* es uno de los patógenos causantes de una variedad de enfermedades como fiebre entérica, bacteriemia, infecciones focales y enterocolitis. Se encuentra

principalmente en pollos y aves de corral; y es una de las mayores fuentes de infección intestinal (Golowczyc et al., 2007).

## ***Identificación de Microorganismos Fermentadores***

### **Métodos fenotípicos**

Los métodos fenotípicos de identificación bacteriana consisten en las características morfológicas, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas de las bacterias (Fernández et al., 2010).

Existen medios selectivos que permiten seleccionar un microorganismo o grupo de microorganismos en particular. Esto es posible ya que contienen al menos un ingrediente que inhibe el crecimiento y reproducción de microorganismos no deseados. A estos ingredientes se les denomina agentes selectivos (Zapata, 2012). También existen medios diferenciales que tienen como función diferenciar entre grupos o especies de microorganismos. Contienen un ingrediente que es utilizado o alterado por un grupo en particular; mientras que, el resto de microorganismos presentes no lo pueden utilizar.

Las pruebas bioquímicas se utilizan para identificación bacteriana basándose en su metabolismo característico.

La galería API es un sistema estandarizado para la identificación de microorganismos mediante pruebas bioquímicas. Existen diferentes; como API Candida que está compuesta por 10 microtubos que contienen compuestos deshidratados para la realización de 12 pruebas de identificación, y API 50 CHL que es un sistema para la identificación de *Lactobacillus* compuesta por 50 microtubos conteniendo compuestos deshidratados para la realización de pruebas de identificación.

## **Métodos moleculares**

La utilización de técnicas moleculares para identificación de microorganismos en la actualidad se ha incrementado debido a que tiene varias ventajas en comparación con los métodos tradicionales. Son más específicas y rápidas debido a que se puede identificar un microorganismo en menos de 24h y puede ser automatizada reduciendo de esta manera tiempo y costo (Rodríguez-Herrera et al., 2009).

Para la detección molecular de microorganismos la técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rodríguez-Herrera et al., 2009) la cual tiene como objetivo amplificar fragmentos específicos de ADN. Se realiza en tres pasos: denaturación de ADN que se logra a una temperatura de 93°C, donde las moléculas de ADN se separan en sus dos cadenas. Luego el anidamiento que ocurre a temperaturas entre 45 y 60°C para que los primers se unan a las cadenas de ADN previamente separadas, y finalmente la polimerización, generalmente a 72°C para que la polimerasa agregue nucleótidos y forme de esta manera nuevas cadenas de ADN. Este proceso se realiza un número determinado de ciclos hasta obtener millones de copias de ADN de la región específica (Karp, 2006).

Para la identificación bacteriana normalmente se amplifica total o parcialmente el ADNr 16s que contiene alrededor de 1.550 nt (nucleótidos). La utilización de esta macromolécula como cronómetro molecular definitivo se debe a que es una molécula muy antigua y está presente en todas las bacterias actuales, contiene suficiente variabilidad para diferenciar organismos próximos y al ser una molécula de gran tamaño se pueden minimizar las fluctuaciones estadísticas. Así mismo, por ser fácil de secuenciar existen bases de datos amplias para la identificación de procariotes (Mendoza y Rodicio, 2003).

Una vez amplificado el gen por medio de la PCR se puede secuenciar. El método de secuenciación de ADN se basa en la síntesis enzimática de cadenas de ADN

complementarias a la cadena a secuenciar. El sitio de inicio de la síntesis está determinado por un oligonucleótido que se marca radioactivamente. Se realizan cuatro reacciones separadas, en donde además de los cuatro nucleótidos esenciales, se agrega un didesoxiribonucleótido llamado “terminador”. Éste nucleótido es incorporado al azar y determina la finalización de la cadena al carecer de 3'OH. Como resultado se producen fragmentos de distintas longitudes, y presentan la terminación de la síntesis de todas las posiciones posibles en donde se encuentra el terminador. Los fragmentos marcados se separan por electroforesis (Curtis y Barnes, 2000) y posteriormente “la secuencia de los nucleótidos en la cadena se genera mediante una computadora que lee de abajo hacia arriba en cada carril del gel” (Karp, 2006).

## **JUSTIFICACIÓN**

A nivel popular se considera al kéfir de agua una bebida refrescante con varias propiedades beneficiosas para la salud, principalmente por la diversidad de microorganismos (LAB y levaduras) que presenta. Hay diversos estudios que demuestran que es una bebida con propiedades funcionales. Sin embargo, se ha visto alrededor del mundo que las cepas encontradas en el inóculo varían de un lugar a otro, por tanto, no se puede extrapolar los resultados de estos estudios al kéfir de agua en general.

Para evitar esta generalización, se ha querido identificar las bacterias existentes en el kéfir de agua producido artesanalmente en el Ecuador y dejar abierta una línea de investigación que conduzca a la categorización definitiva del kéfir de agua ecuatoriano como probiótico. Además de presentar los datos obtenidos a partir de esta investigación, se quiere ofrecer un compendio bibliográfico que sirva de base para futuros estudios.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente los microorganismos presentes en el kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de bacterias acidolácticas y levaduras presentes en la bebida.
- Caracterizar las bacterias acidolácticas y levaduras del kéfir de agua ecuatoriano.
- Obtener características fisicoquímicas adecuadas para la posible industrialización del kéfir de agua artesanal.
- Analizar bibliográficamente el posible efecto probiótico de los microorganismos identificados.

## **HIPÓTESIS**

- Puede el kéfir de agua ser considerado un alimento probiótico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

#### ***Miel***

Recogida por la empresa “Uyama Farms S.A.” ubicada en el cantón Mira provincia del Carchi en el mes de Octubre del año 2011.

## ***Agua***

Dos lotes de agua Tesalia sin gas elaborados en las fechas 07/11/2011 y 01/04/2012 respectivamente.

## ***Típicos***

Inóculo casero proveniente de Quito- Ecuador.

## **Métodos**

### ***Análisis Físico-Químicos***

Acidez y grados Brix fueron determinados según los métodos descritos por Less (1982).

### ***Análisis Microbiológicos***

#### **Preparación de diluciones**

Se realizó una dilución primaria para obtener una distribución uniforme de los microorganismos contenidos en la muestra inicial (Camacho et al., 2009). Se pesó 20 g de la muestra y se diluyó en 180 mL de citrato de sodio al 2%. A continuación se prepararon diluciones decimales adicionales (Camacho et al., 2009), tomándose 1 mL de la primera dilución y transfiriéndose a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución de citrato de sodio al 2%, se obtuvo la dilución de  $10^{-2}$ . Luego se tomó 1 mL de esta dilución y se transfirió a un segundo tubo que contenía 9 mL de diluyente y se obtuvo la dilución  $10^{-3}$ . Se repitió este procedimiento hasta llegar a una dilución de  $10^{-6}$ .

### **Técnica de siembra (Extensión en placa)**

Se colocó 0,1mL de cada dilución en el medio contenido en una caja petri. Se esparció uniformemente en la superficie del mismo con la ayuda de un asa de vidrio previamente esterilizada con alcohol y fuego directo (Zapata, 2012).

### **Recuento de Lactobacillus**

Se utilizó el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe ) que es un agar selectivo para *Lactobacillus* debido a que contiene polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, factores especiales para su crecimiento así como fuente rica en nutrientes, con un pH del medio de 5.7. Este medio exhibe un bajo grado de selectividad, por tanto, pueden crecer bacterias del género *Leuconostoc* o *Pediococcus*. Se sembró utilizando el método de extensión en placa. La incubación se realizó en una atmósfera micro-aerofílica (5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C;. El conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizó siguiendo el método del libro “The Compedium of Methods for the Microbial Examination of Foods”. Los resultados se reportaron 2 días después de realizada la siembra (Merck).

### **Recuento de lactococcus**

El medio utilizado fue M17 agar. Contiene b-glicerolfosfato que incrementa la capacidad buffer del medio, con un pH de 7.2, además promueve el crecimiento de *Streptococcus* lácticos e inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Se sembró la muestra mediante la técnica de extensión en placa. La incubación se realizó en una atmósfera micro-aerofílica (5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C, modificada del manual Merck. El conteo de Unidades Formadoras de Colonias se realizó siguiendo el método descrito en libro “The Compedium of Methods for the Microbial Examinatin of Foods”. Se reportaron los resultados al segundo día después de realizar la siembra (Merck).

### **Recuento de levaduras**

Se utilizó el medio Saboraud con 4% de glucosa. Es un medio selectivo para hongos y levaduras debido al bajo pH, además de la presencia de cicloheximida, estreptomicina y penicilina. En este medio las peptonas actúan como fuente de carbono y nitrógeno, la glucosa actúa como fuente de energía y el agar como agente solidificante. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente. Se contaron las Unidades Formadoras de Colonias al segundo día de realizada la siembra según el método del libro “The Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods” (Merck). La técnica utilizada en la siembra fue la de extensión en placa.

### **Identificación de levaduras**

Se realizó mediante la prueba bioquímica API Candida.

### ***Análisis molecular***

#### **Extracción de ADN**

Se aislaron colonias con diferentes morfologías, grandes y pequeñas de color blanco, de los medios selectivos MRS y M17. Cada colonia se sembró tanto en medio MRS como M17 dependiendo de su origen mediante un toque con palillo estéril. 48 h después de la siembra se trasladaron 3 a 10 colonias de cada una de las cepas a tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían 300  $\mu$ L de agua estéril. Se colocaron los tubos en un flotador y fueron sometidos a baño maría durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos, se mezcló con glicerol y se congeló para ser utilizado posteriormente (Guaman, 2012).

## **Amplificación del ADN r 16S**

Para obtener el master mix se mezclaron todos los reactivos que se indica en la tabla 3, se utilizó el ADN de las 6 bacterias seleccionadas.

### - **Máster mix**

En la Tabla 2 se presentan los reactivos y cantidades usadas para el Master Mix

Tabla 2.- Reactivos y cantidades usados para el Master Mix

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad (μL)</b>
H2O		21,16
Buffer		10
MgCl2	25mM	4
dNTP's	2000μM	3
27F	10μM	0,8
1492 R	10μM	0,8
Taq	5U	0,24
ADN	1300ng/μL	10
<b>TOTAL</b>		<b>50</b>

Fuente: Guaman, 2012

### - **Condiciones del PCR** (Guaman, 2012):

Desnaturalización: 94°C por 4 minutos

30 ciclos de:

Desnaturalización: 94°C por 1minuto

Annealing: 50°C por 30 segundos

Elongación: 72°C por 2 minutos

Extención final: 72°C por 8 minutos

### **Electroforesis de ADN**

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1x. Se corrió durante 60 minutos a 70 V. Se cargó 5 µL del amplicón y se utilizó un estándar de tamaño para ver el peso molecular del producto de PCR, se esperaba obtener bandas con un tamaño aproximado 1500 pb (pares de bases).

### **Secuenciación del ADN**

Para la secuenciación de ADN se enviaron 6 amplicones a Functional Biosciences, Inc., ubicado en Madison, Wisconsin.

### **Análisis de Secuencias**

La secuencia de pares de bases obtenida se analizó mediante Mega 5, Pregap 4 versión 1.6 y Gap 4V 11.2. Una vez determinada la secuencia del ADNr 16S, se comparó con las depositadas en las bases de datos del GeneBank y Ribosomal Data Base Project. Se utilizó el método de neighbor joining para identificación de género y especie.

## **ELABORACIÓN DEL KEFIR DE AGUA ARTESANAL DE ORIGEN ECUATORIANO**

### **Formulación inicial**

En base a la formulación desarrollada por Ebookbrowse (2011), se modificó ciertas materias primas así como el tipo de endulzante y el tiempo de fermentación.

En la Tabla 3 se presenta la formulación inicial

**Tabla 3.- Formulación inicial**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Agua	300mL
Endulzante	22,5g
Típicos	18g

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Este experimento se ejecutó bajo un diseño en bloques al azar con un arreglo factorial  $3^2$  correspondiente a la combinación de dos factores con tres niveles cada uno: tipo de endulzante (miel de abeja, azúcar y panela) y tiempo de fermentación (24, 48 y 72 horas). Se obtuvo por lo tanto nueve tratamientos, realizándose tres repeticiones, con un total de 27 unidades experimentales. Los tratamientos fueron:

Tratamiento 1: Panela/24 horas de fermentación

Tratamiento 2: Panela/48 horas de fermentación

Tratamiento 3: Panela/72 horas de fermentación

Tratamiento 4: Miel de abeja/24 horas de fermentación

Tratamiento 5: Miel de abeja /48 horas de fermentación

Tratamiento 6: Miel de abeja /72 horas de fermentación

Tratamiento 7: Azúcar/24 horas de fermentación

Tratamiento 8: Azúcar/48 horas de fermentación

Tratamiento 9: Azúcar/72 horas de fermentación

Las variables de respuesta fueron: acidez y grados Brix.

## FOCUS GROUP

Al no tener especificaciones ni en la literatura ni en normas de alimentos para este producto, se realizó un grupo focal para que los consumidores decidan las características deseadas. El grupo constó de 6 personas; se les explicó la idea del producto y probaron una muestra de cada uno de los nueve tratamientos. Los tratamientos que obtuvieron mayor agrado fueron el de Miel con fermentación de 24 y 48 horas y el de la panela con fermentación de 48 horas.

En la Tabla 4 se presenta el análisis físico-químico de los tratamientos escogidos.

**Tabla 4.- Análisis fisicoquímicos de los tratamientos escogidos en el focus group**

	<b>Acidez (% ácido láctico)</b>	<b>Grados Brix</b>
<b>Miel 24h</b>	6,11	5,6
<b>Miel 48h</b>	9,6	5,4
<b>Panela 48h</b>	5,13	6,4

Dados estos resultados se establecieron como especificaciones:

**Acidez.-** Se espera una acidez intermedia, es decir entre 5% y 9% de ácido láctico, ya que según el grupo focal fueron las muestras con mayor aceptación. Se le asignó 1 como puntaje para la tabla de ponderación.

**Grados Brix.-** La cantidad de sólidos solubles debe ser la menor. Esto se debe a que mientras menor sea la cantidad presente en la bebida, se espera una mayor fermentación. Por tanto se le asignó un puntaje de 2 para la tabla de ponderación.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Análisis Físico-Químicos

#### *Grados Brix*

En la Tabla 5 se presenta el análisis de Varianza (ANOVA) de grados Brix de los tratamientos

**Tabla 5.- Análisis de varianza (ANOVA) de grados Brix de los tratamientos**

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>
Total	26	9,1000			
Bloques	2	0,0067	0,0033	<b>1<sup>n.s.</sup></b>	3,63
Tratamientos	8	9,0400	1,1300	339*	2,59
Tiempo de fermentación (A)	2	0,4422	0,2211	66,3333*	2,59
Tipo de endulzante (B)	2	8,5400	4,2700	1281*	2,59
A x B	4	0,0578	0,0144	4,3333*	2,59
Error	16	0,0533	0,0033		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

n.s. No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

El Coeficiente de Variación de los grados Brix fue de 0.94%. Al ser menor al 5% brinda credibilidad a los resultados; además, refleja la precisión con la que fue manejado el experimento (Sanchez-Otero, 2008).

Según el análisis de varianza (ANOVA) de la Tabla 5 existió una diferencia significativa entre los tratamientos. Tanto el tiempo de fermentación como el tipo de endulzante y su interacción afectaron significativamente los grados Brix de los tratamientos. Por otro lado, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los bloques.

En la Tabla 6 se presentan los grados Brix de los tratamientos

**Tabla 6.- Grados Brix de los tratamientos**

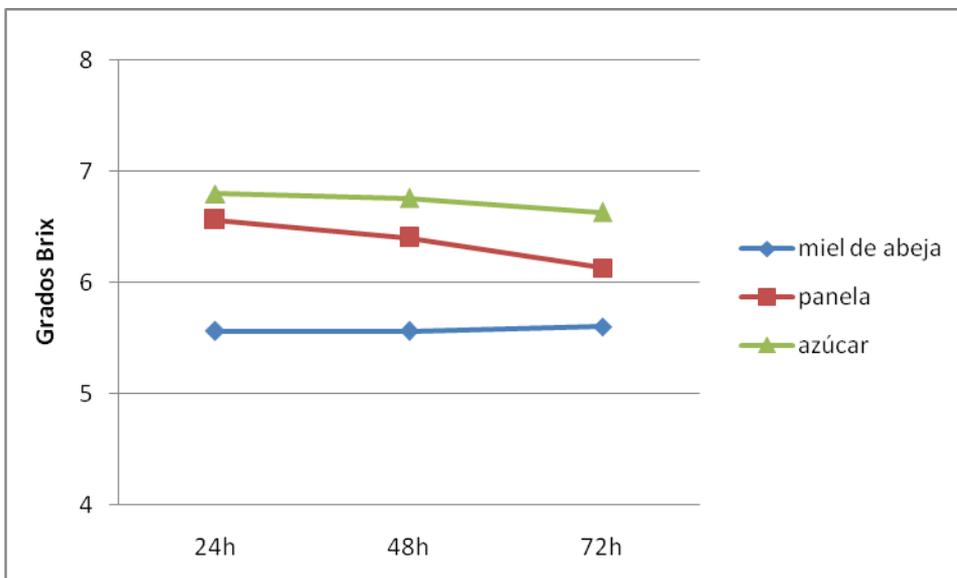
<b>Tratamiento</b>	<b>Grados Brix *</b>
7	6,80 A
8	6,77 A
9	6,63 AB
1	6,63 CB
2	6,40 C
3	6,13 D
6	5,57 E
5	5,40 E
4	5,23 E

\*Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey

Como se observa en la Tabla 6, los tratamientos 7, 8 y 9 fueron estadísticamente iguales entre sí; sin embargo el 7 y 8 no fueron iguales al resto de tratamientos. Los tratamientos 1 y 9 fueron iguales entre sí. Por otro lado, los tratamientos 1 y 2 fueron iguales entre sí pero diferentes en relación a los demás. Los tratamientos 4, 5 y 6 fueron iguales entre sí pero diferentes a los demás y el tratamiento 3 difirió con los demás. Los tratamientos 4, 5 y 6 (miel a las 24, 48 y 72 horas) fueron estadísticamente iguales y presentan la menor cantidad de grados Brix, siendo los mejores tratamientos.

En el Gráfico 1 se presentan los cambios en los grados Brix de los tres tipos de endulzantes durante 72 horas de fermentación.

**Gráfico 1.- Cambios de grados Brix de los tres tipos de endulzante en 72 horas de fermentación**



Como se observa en el gráfico 1, los grados Brix de los tratamientos disminuyen conforme aumenta el tiempo de fermentación. Esto era esperado debido a que las bacterias presentes utilizan glucosa y fructosa como fuente de energía. En un estudio sobre el kéfir de agua desarrollado por Teixeira et al. (2010) se muestra que el contenido de sólidos solubles (grados Brix) se redujo al final de la fermentación.

### ***Acidez***

En la Tabla 7 se presenta el Análisis de Varianza (ANOVA) de la acidez expresada en porcentaje de ácido láctico de los tratamientos.

**Tabla 7.- Análisis de varianza (ANOVA) de acidez expresada en porcentaje de ácido láctico de los tratamientos.**

<b>F.V</b>	<b>G. L.</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>
Total	26	514.2628			
Bloques	2	0.9070	0.4535	<b>3,3279<sup>n.s.</sup></b>	3.63
Tratamientos	8	511.1753	63.8969	468.8829*	2.59
Tiempo de fermentación (A)	2	130.6938	65.3469	479.5230*	2.59
Tipo de endulzante (B)	2	331.4908	165.7454	1216.2587*	2.59
Interacción A x B	4	48.9907	12.2477	89.8749*	2.59
Error	16	2.1804	0.1363		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

n.s. No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

El coeficiente de variación de los grados Brix fue de 6,53%, este valor refleja la existencia de un ligero error en la medición. Sin embargo, al estar cercano al 5%, concuerda con los parámetros aceptados para ensayos realizados en laboratorios o invernaderos y se puede decir que los datos obtenidos son confiables. (Sanchez-Otero, 2008).

La acidez del kéfir de agua fue influenciada por el tipo de endulzante utilizado y el tiempo de fermentación, y de la misma manera por la combinación de los dos factores. Además existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. Por otro lado, entre los bloques no existió diferencia estadísticamente significativa.

En la Tabla 8 se presenta la acidez de los tratamientos.

**Tabla 8.- Acidez de los tratamientos**

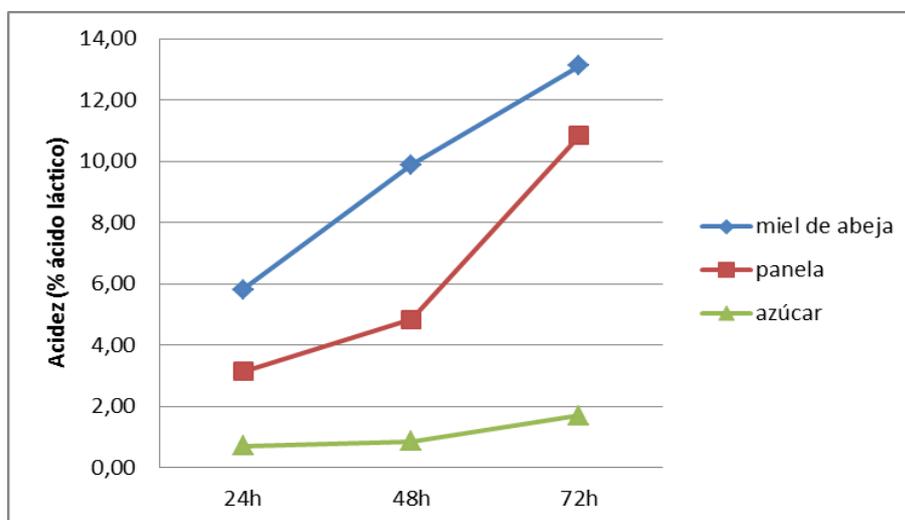
<b>Tratamiento</b>	<b>Acidez (% de ácido láctico) *</b>
6	13,11 A
3	10,83 A
5	9,89 AB
4	5,82 CB
2	4,85 CD
1	3,14 CD
9	1,71CD
8	0,86 D
7	0,71 D

\*Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

En la Tabla 8, se puede observar que los tratamientos 6, 3 y 5 fueron iguales entre sí, y el 6 y 3 diferentes al resto. Los tratamientos 4, 2, 1 y 9 fueron iguales estadísticamente y por último los tratamientos 2, 1, 9, 8, 7 fueron iguales entre sí. Los tratamientos 4 y 5, miel a las 24h y 48h respectivamente, fueron estadísticamente iguales; tuvieron una acidez intermedia en comparación al resto de tratamientos, por tanto fueron escogidos como los mejores tratamientos.

En el Gráfico 2 se presentan los cambios en la acidez de los tres tipos de endulzantes durante 72 horas de fermentación

**Gráfico 2.- Cambios de acidez de los tres tipos de endulzante en 72 horas de fermentación**



Como se puede observar en el Gráfico 2, la acidez expresada en % de ácido láctico incrementa al transcurrir el tiempo de fermentación para los tres tipos de endulzantes. De Bruyne (2007) determinó que bacterias del género *Leuconostoc* tienen la capacidad de producir ácido láctico como metabolito principal a partir de glucosa y fructosa. Este género se encontró en cantidades considerables en estudios de caracterización del kefir de agua realizados por Teixeira et al. (2010) y Aldherr (2010).

Así mismo, se observó que los tratamientos hechos a base de miel de abeja son los que contienen mayor porcentaje de ácido láctico, lo que puede ser debido a que la miel de abeja contiene 29 % de glucosa y 38% de fructosa en su composición y solo un 4% de sacarosa (Zandamela, 2008), de esta manera las bacterias tienen mayor disponibilidad de sustrato para la formación de ácido láctico. En el caso de la panela, el porcentaje de azúcares reductores es de 9.15% y de sacarosa 80.91% (Bressani); mientras que, el porcentaje de azúcares reductores del azúcar blanca granulada es de 0.04% (Kirk et al., 2004). La panela como el azúcar tienen menor disponibilidad de sustrato, por lo tanto la producción de ácido láctico podría ser menor en comparación a la miel.

## Tabla de Ponderación

En la Tabla 9 se presenta la ponderación de los tratamientos

**Tabla 9.- Ponderación de los tratamientos**

No. De Tratamiento	Tratamiento	°Brix	Acidez	Total
4	Miel 24 h	2	1	3
1	Panela 24 h	0	0	0
7	Azúcar 24 h	0	0	0
5	Miel 48 h	2	1	3
2	Panela 48 h	0	0	0
8	Azúcar 48 h	0	0	0
6	Miel 72 h	2	0	2
3	Panela 72 h	0	0	0
9	Azúcar 72 h	0	0	0

Los mejores tratamientos fueron miel a las 24 y 48 horas de fermentación al obtener el mayor puntaje en la tabla de ponderación. En estos dos tratamientos se realizaron recuentos de bacterias ácidolácticas en los medios MRS y M17 y recuento de Levaduras en Saboraud. El tratamiento con mayor cantidad de UFC/mL fue seleccionado para ser caracterizado microbiológicamente, dado que, para que la bebida ejerza su actividad probiótica se necesita un mínimo de  $10^6$  UFC/g (Sanz et al., 2003; Shobharani y Agrawal, 2011; Olagnero, 2007).

## Análisis Microbiológico

En la Tabla 10 se presentan los recuentos de bacterias ácidolácticas de los tratamientos Miel a las 24 y 48 horas de fermentación, en condiciones aeróbicas a 37 °C. Los resultados se reportaron en los días 1 y 2.

**Tabla 10.- Recuento de bacterias ácidolácticas en medio MRS bajo condiciones aeróbicas, donde la Condición 1 es el tratamiento Miel a las 24 horas de fermentación y la Condición 2 es el tratamiento Miel a las 48 horas de fermentación.**

Día	UFC/mL	
	Condición 1	Condición 2
1	$9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
2	$1,53 \times 10^4$	$2,14 \times 10^4$

En la Tabla 11 se presentan los recuentos de bacterias ácidolácticas de los tratamientos Miel a las 24 y 48 horas de fermentación, en condiciones micro-aerofílicas a 37°C. Los resultados se reportaron en los días 1 y 2.

**Tabla 11.- Recuento de bacterias ácidolácticas en medio MRS bajo condiciones micro-aerofílicas, en donde la Condición 1 es el tratamiento Miel a las 24 horas de fermentación y la Condición 2 es el tratamiento Miel a las 48 horas de fermentación.**

Día	UFC/mL	
	Condición 1	Condición 2
1	$1,83 \times 10^4$	$> 2,5 \times 10^5$
2	$2,1 \times 10^4$	$> 2,5 \times 10^5$

Como se observa en las Tablas 10 y 11 se obtuvo un mayor recuento de ufc/mL bajo condiciones micro-aerofílicas tanto en la condición 1 como en la condición 2. Por otro lado, la condición 2 (miel a las 48 h de fermentación), obtuvo mayor cantidad de ufc/mL en comparación a la condición 1.

En la Tabla 12 se presentan los recuentos de bacterias ácidolácticas de los tratamientos Miel a las 24 y 48 horas de fermentación, en condiciones aeróbicas a 37°C. Los resultados se reportaron en los días 1 y 2.

**Tabla 12.- Recuento de bacterias ácidolácticas en medio M17 bajo condiciones aeróbicas, donde la Condición 1 es el tratamiento Miel a las 24 horas de fermentación y la Condición 2 es Miel a las 48 horas de fermentación.**

Día	UFC/mL	
	Condición 1	Condición 2
1	$7 \times 10^3$	$1.32 \times 10^4$
2	$1.03 \times 10^4$	$1.97 \times 10^4$

En la Tabla 13 se presentan los recuentos de bacterias ácidolácticas de los tratamientos Miel a las 24 y 48 horas de fermentación, en condiciones micro-aerofílicas a 37°C. Los resultados se reportaron en los días 1 y 2.

**Tabla 13.- Recuento de bacterias ácidolácticas en medio M17 bajo condiciones micro-aerofílicas, donde la Condición 1 es el tratamiento Miel a las 24 horas de fermentación y la Condición 2 es Miel a las 48 horas de fermentación.**

Día	UFC/mL	
	Condición 1	Condición 2
1	$7 \times 10^3$	$1.32 \times 10^4$
2	$1.03 \times 10^4$	$1.97 \times 10^4$

Como se observa en las Tablas 12 y 13, las condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos en el medio M17 son micro-aerofílicas ya que se obtiene un mayor recuento de bacterias ácido lácticas comparado con las condiciones aeróbicas. El tratamiento con mayor recuento de ufc/mL fue el de miel a las 48 horas (Condición 2).

La Condición 2 obtuvo un mayor recuento de ufc/mL tanto en el medio MRS como en el medio M17, por tanto fue seleccionada como **mejor tratamiento**. Así mismo, se observó que las condiciones óptimas para el crecimiento de bacterias ácido lácticas en los medios

MRS y M17 fueron micro-aerofílicas al obtener un recuento mayor de bacterias ácidolácticas.

En la Tabla 14 se presenta el recuento de bacterias ácidolácticas en medio MRS y M17 a la dilución  $10^{-6}$  del tratamiento miel 48 horas bajo condiciones micro-aerofílicas a 37°C con tres repeticiones.

**Tabla 14.- Recuento de bacterias ácidolácticas del tratamiento Miel a las 48 h de fermentación.**

Muestra	UFC/mL	
	MRS	M17
1	$3,25 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
2	$3,15 \times 10^9$	$4,05 \times 10^9$
3	$3,2 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$

En la Tabla 15 se presentan la cantidad de UFC/mL en Saboraud a la dilución  $10^{-3}$  del tratamiento miel 48 horas bajo condiciones aeróbicas a 37 °C con tres repeticiones.

**Tabla 15.- Recuento de levaduras**

Muestra	UFC/mL
1	$2,75 \times 10^7$
1	$2,80 \times 10^7$
2	$2,70 \times 10^7$
2	$2,80 \times 10^7$
3	$2,74 \times 10^7$
3	$2,78 \times 10^7$

Como se puede observar en la Tabla 14, la cantidad promedio de colonias es de  $3,2 \times 10^9$  en MRS y  $4,1 \times 10^9$  en M17. Esta cantidad excede la cantidad mínima de UFC/mL

recomendada para que un alimento posea propiedades probióticas, ( $10^6$  UFC/mL) (Sanz et al., 2003; Shobharani y Agrawal, 2011; Olagnero, 2007). Por otro lado, en la Tabla 15 la cantidad promedio de colonias es de  $2,76 \times 10^7$ , lo cual es menor al número recomendado de levaduras para que un alimento sea probiótico ( $1 \times 10^{10}$  UFC/g) (Ortiz y Reuto, 2007).

Se tomó aleatoriamente una Colonia del medio MRS, M17 y Saboraud de acuerdo a su tamaño. Se realizó tinción Gram, Catalasa y Oxidasa con el fin de determinar diferencias morfológicas. En Saboraud solo se distinguió un tipo de colonia según su morfología.

En la Tabla 16 se presentan las colonias del medio MRS seleccionadas para ser secuenciadas

**Tabla 16.- Colonias aisladas del medio MRS para ser secuenciadas**

Código	Gram	Morfología	Catalasa	Oxidasa
1K	+	Bacilos cortos	-	-
2K	+	Coco	-	-
3K	+	Coco	-	-

En la Tabla 17 se presentan las colonias del medio M17 seleccionadas para ser secuenciadas

**Tabla 17.- Colonias aisladas del medio M17 para ser secuenciadas**

Código	Gram	Morfología	Catalasa	Oxidasa
4K	+	Bacilo	-	-
5K	+	Coco	-	-
6K	+	Coco	-	-

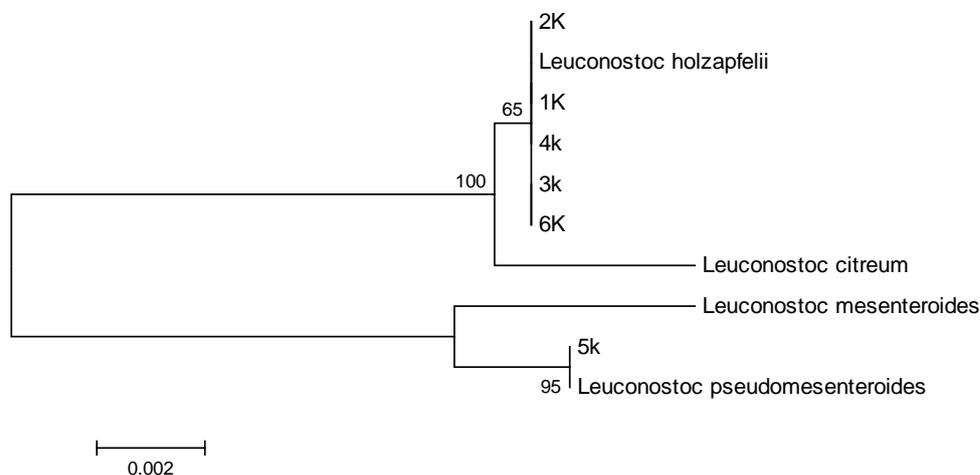
Para el secuenciamiento se escogieron 3 colonias del medio MRS y 3 colonias del medio M17 según su morfología. En Saboraud solo se distinguió un tipo de levadura a la cual se caracterizó mediante API cándida.

## Identificación Bacteriana

Se realizó por el método de identificación genética ADNr 16s, método utilizado por Gulitz et al. (2011), Miguel et al. (2011) y Teixeira et al. (2010) para determinar la microbiota presente en el kefir de agua así como en sus gránulos. Las secuencias obtenidas del gen se compararon con las secuencias del gene Bank. Al tener una amplia similitud con bacterias como *Leuconostoc citreum* JQ712017.1, *Leuconostoc holzapfelii* NR\_042620.1, *Leuconostoc pseudomesenteroides* AB598984.1 y *Leuconostoc mesenteroides* JQ712026.1 se realizó un análisis filogenético por medio del método de Neighbor- joining, obteniéndose como resultado que las bacterias presentes en el kefir fueron *Leuconostoc holzapfelii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

En el Gráfico 3 se presenta el árbol filogenético

**Gráfico 3.- Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del ADNr 16S por el método de Neiborng Joining**



En la Tabla 18 se presentan las bacterias identificadas

**Tabla 18.- Bacterias Identificadas por secuenciamiento de ADNr 16S**

<b>Código</b>	<b>Bacteria</b>
1K	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
2K	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
3K	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
4K	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
5K	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
6K	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>

Como se puede observar en la Tabla 18, de las seis bacterias identificadas 5 pertenecen al género y especie *Leuconostoc holzapfelii* y una a *Leuconostoc pseudomesenteroides*. De Bruyne et al. (2007) asoció a *Leuconostoc holzapfelii* con la microbiota de fermentación del café etíope. En otro estudio realizado por Moroni et al. (2011) se determinó su presencia en masas fermentadas a partir de harina de trigo sarraceno (planta originaria de Asia central) y Teff (herbácea cultivada principalmente en Etiopía). Es una bacteria Gram-positiva, no móvil, catalasa negativa, anaerobia facultativa, crece en medio MRS a 30°C y es de morfología ovoide o bacilos cortos. Su tamaño oscila de 0.8-1.0 por 2.0-3.0 µm y se encuentra comúnmente en pares o cadenas cortas. Tiene la característica de producir ácido láctico y CO<sub>2</sub> a partir de glucosa y fructosa (De Bruyne et al., 2007).

Adicionalmente, en un estudio realizado por Rodríguez et al. (2012) se identificó *Leuconostoc pseudomesenteroides* en pozol (bebida fermentada, ácida, no alcohólica a base de maíz de origen Maya) a la cual se le atribuyen beneficios como el control de diarreas, disminución de fiebre, entre otros. Por otro lado, se determinó la presencia de *L. pseudomesenteroides* en alimentos fermentados como cassava fermentada elaborada en Benin, queso elaborado en India, leche fermentada elaborada en Kenia (Schillinger et al., 2008), Nukadoko (tipo de arroz utilizado para la elaboración de Nukazuke, encurtido

elaborado en Japón) (Sawa et al., 2009), jugo de caña (Dong-Wook et al., 2011) y quesos artesanales elaborados a partir de leche no pasteurizada (Van Hoorde et al., 2010).

El género *Leuconostoc* es uno de los microorganismos utilizado como probiótico en conjunto con otras bacterias ácido lácticas de los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y levaduras del género *Saccharomyces* (Amores et al., 2004; Ramírez et al., 2011). En un estudio realizado por Matus et al. (2012) sobre el Pulque (bebida fermentada mexicana, no alcohólica, no destilada y elaborada a partir de la fermentación de varias especies de Agave) se determinó la presencia de *Leuconostoc spp*, con importante actividad antimicrobiana *in vitro* vs *Escherichia coli* EPEC 2348/69, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Typhimurium. Mientras que *in vivo*, disminuyó la capacidad de infección de *S. enterica* serovar Typhimurium L1334 lo que sugiere propiedades antimicrobianas.

La levadura presente en mayor cantidad fue *Saccharomyces cerevisiae*, con un ID del 98,8%. Esto concuerda con Teixeira et al. (2010), que también encontró en el kefir de agua levaduras de este género.

En un estudio realizado por Jespersen (2003) se aisló la cepa *Saccharomyces cerevisiae* de varios alimentos, bebidas alcohólicas y leches fermentadas de África tales como; “kenkey” (Ghana), “Mawe” (Benin), “Masa” (Nigeria), “Munkoyo” (Zambia), “Busaa” (Kenya), “Chikokivana” (Zimbabwe), “Amasi” (Zimbabwe) “Mbanik” (Senegal), “Nono” (Nigeria), entre otros. Entre las funciones que tiene esta cepa en la fermentación de alimentos es producción de alcohol y otros componentes aromáticos como ésteres y ácidos orgánicos a partir de carbohidratos. Además, Penacchia et al. (2008) determinó que cinco cepas de *S. Cerevisiae* eran capaces de sobrevivir el bajo pH del estómago y al pH del tracto intestinal lo que les convierte en posibles probióticos.

Es reconocida también por aportar flavor a los productos fermentados, además de ser capaz de coexistir con otros tipos de microorganismos como bacterias ácido lácticas. Es posible que esta levadura además aporte al valor nutricional de alimentos fermentados, al estar asociada con el incremento de vitamina B12 y algunos aminoácidos (Jespersen, 2003). Así mismo, se ha encontrado que levaduras del género *Saccharomyces* protegen probablemente de la acción de la toxina del cólera por la adhesión de la toxina a los receptores presentes en la superficie de la levadura, sin embargo no se han realizado estudios de las cepas provenientes del kéfir de agua producido en Quito-Ecuador. En otro estudio realizado sobre Pulque, se aislaron grupos microbianos de los géneros: *Zymomonas*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* los cuales han sido reportados como microorganismos con efecto probiótico (Cervantes y Pedroza, 2007). Además, se ha reportado el uso de cepas de *S. cerevisiae* y *S. bulgardi* en la prevención de varios tipos de diarrea y colitis en humanos (Penacchia et al., 2008). El género *S. cerevisiae* se utiliza como agente probiótico principalmente con el fin de equilibrar la microflora intestinal, demostrándose su eficacia en el tratamiento de diarrea crónica, especialmente en casos asociados con *Clostridium difficile*.

## CONCLUSIONES

- La cantidad de bacterias acidolácticas presentes en el kefir de agua ecuatoriano fue de  $4 \times 10^9$  UFC/mL, la cantidad de levaduras fue de  $3 \times 10^7$  UFC/mL. Por lo tanto, desde un punto de vista cuantitativo, la bebida podría ser considerada probiótico debido a que excede la cantidad mínima de bacterias ácido lácticas requeridas ( $10^6$  UFC/mL) (Sanz et al. 2003; Shobharani y Agrawal, 2011; Pérez y Ramírez, 2007). Sin embargo, la cantidad de levaduras es menor a la cantidad requerida para ejercer el efecto probiótico.

- La caracterización fenotípica y molecular de la microbiota del Kefir mostró la presencia de *Leuconostoc Holzapfelii* , *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Saccharomyces cereviciae*.
- Se logró obtener características fisicoquímicas adecuadas para la industrialización y comercialización del kéfir de agua. Al utilizar miel de abeja como sustrato para la fermentación se obtuvieron valores de acidez apropiados según la preferencia de los consumidores, además se redujo el contenido de grados °Brix inicial, lo que es un indicador de fermentación.
- El género *Leuconostoc* aporta con propiedades benéficas para la salud, al igual que el género *Sacharomyces* de acuerdo a múltiples estudios realizados por; Amores et al.(2004), Ramírez et al. (2011), Matus et al. (2012), Cervantes y Pedroza (2007) y Penacchia et al. (2008). Por lo tanto es posible que esta bebida pueda ejercer un efecto probiótico.

## RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos *in vivo*, así como estudios clínicos y epidemiológicos con el fin de determinar la capacidad de colonización, adherencia al intestino, resistencia a pH bajo y sales biliares, entre otros de las bacterias *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc hozapfeli*. De esta manera confirmar que estas cepas pueden ejercer un efecto probiótico en el cuerpo humano.
- Realizar la caracterización de las bacterias presentes en los gránulos de kefir.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.R. y Moss, M. O. *Microbiología de los alimentos*. Acribia, S.A.Zaragoza, 1997.
- Agency for Healthcare Research and Quality.*Safety of Probiotics Used to Reduce Risk and Prevent or Treat Disease*. Abril de 2011<<http://www.ahrq.gov/clinic/tp/probiotictp.htm>>3 de Mayo de 2012.
- Aldherr, Florian et al. Elsevier.*Identification and characterization of a glucan-reducing enzyme from Lactobacillus hilgardii TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir*.23 de Marzo de 2010. 7 de Mayo de 2012.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J.R., Martínez-Hernández, D. (2004). *Probióticos*. *Revista Española de Quimioterapia*, 17 (2), 131-139.
- Bressani, Ricardo. Instituto de Nutricion de Centro América y Panamá INCAPI. s.f. 3 de Junio de 2012.
- Camacho, A. et al. 2009. Facultad de Química, UNAM. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis. Microbiológico. 2009<[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones\\_6526.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf)> 21 de Octubre de 2012.
- Carbonell, Mateo. *Aguardientes, Licores y Aperitivos*. Editorial Sintesis. Barcelona, 1965.
- C. P., Miguel et al. World J Microbiol Biotechnol.*Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir)grains from different Brazilian States*. 9 de Enero de 2011. 20 de Febrero de 2012.
- Cervantes-Contreras, Mario., Pedroza-Rodríguez, Aura Marina. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 5(008), 135-146.
- Codex Alimentarius. 2011. 3 de Junio de 2012.
- Curtis, Helena y Barnes, Sue. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2000.
- De Bruyne, Katrien et al. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. *Leuconostoc holzapfelii sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of Leuconostoc specie*.2007. 3 de Junio de 2012.

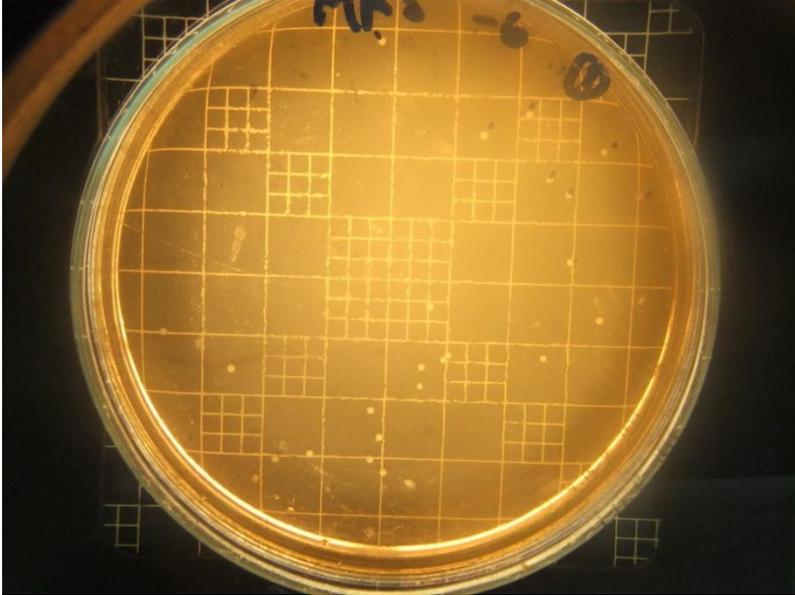
- <<http://ijs.sgmjournals.org/content/57/12/2952.full?sid=ef0ad391-2a09-4ba2-a314-d223cebae079>>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. *Estimación e interpretación del coeficiente de variación de la encuesta cocensal*. Junio de 2008. 20 de Enero de 2013.  
< [http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est\\_interp\\_coefvariacion.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est_interp_coefvariacion.pdf)>
  - *Ebookbrowse*. s.f. <<http://ebookbrowse.com/kefir-de-agua-pdf-d53056391>>31 de Octubre de 2011.
  - Firat, Sabir et al. *Journal of Food Science*. *Assessment of Potential Probiotic Properties of Lactobacillus spp., Lactococcus spp., and Pediococcus spp. Strains Isolated from Kefir*. Septiembre de 2010. 20 de Febrero de 2012.
  - Golowczyc, M.A. et al. Elsevier. *Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis*. 23 de Julio de 2007. 20 de Febrero de 2012.
  - Guaman, Linda. *Characterization and technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods from Ecuador*. Quito, 2012.
  - Gulitz, Anna et al. Elsevier. *The microbial diversity of water kefir*. 24 de Septiembre de 2011. 17 de Febrero de 2012.
  - Jay, James M. *Microbiología moderna de los alimentos*. Acribia, S.A. Zaragoza, 1994.
  - Jespersen, L. et al. *Occurrence and taxonomic characteristics of strains of Saccharomyces cerevisiae predominant in African indigenous fermented foods and beverages*. 2003 <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S1567-1356\(02\)00185-X/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S1567-1356(02)00185-X/full)>5 de Junio de 2012.
  - Kim, Dong-Wook et al. *Journal of Bacteriology*. *Genome Sequence of Leuconostoc pseudomesenteroides KCTC 3652.6* de Junio de 2012  
<<http://jb.asm.org/content/193/16/4299.full?sid=fb1567bb-afd2-4235-ab4c-f6a3733f1e6a>> Agosto de 2011.
  - Kirk, Ronald et al. *Composición y análisis de los alimentos de Pearson*. Editorial Continental. Mexico D.F., 2004.
  - Lees, R. *Análisis de los alimentos*. Acribia. Zaragoza, 1982.
  - Mendoza, María del Carmen y Rodicio, María del Rosario. Elsevier. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y*

- aplicaciones en microbiología clínica*. 26 de Septiembre de 2003. <<http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/28/28v22n04a13059055pdf001.pdf>> 7 de Mayo de 2012.
- Merck. *Microbiology Manual*. s.f.
  - Moreira, M.E.C. et al. Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition. *Anti-Inflammatory and Cicatrizing Activities of a Carbohydrate Fraction Isolated from Sugary Kefir*. Agosto de 2007. 20 de Febrero de 2012.
  - Moroni, Alice et al. Food Microbiology. *Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs*. Mayo de 2011. 6 de Junio de 2012
  - Olagnero, Gabriela et al. *Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos*. DIAETA (B.Aires). 7 de octubre de 2007. 28 de Junio de 2012 [http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales\\_fibra.pdf](http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf)
  - Palmetti, Nestor. *Nutrición Depurativa*. Córdoba, Argentina. 2012.
  - Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O., Villani, F. (2008). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (2008), 1919–1928.
  - Perez, M. d. (2007). *Nacameh*. Retrieved Junio 10, 2012
  - Ramirez, José Ulloa et al. Bacterias lácticas: *Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Revista Fuente Año 2, N° 7, abril – junio 2011, ISSN 2007 – 0713. <<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf> >
  - Rodríguez, Adriana et al. «XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.» s.f. 2012 de Junio de 03.
  - Rodríguez-Herrera, R et al. Universidad Autónoma de Coahuila. *Detección de Microorganismos Mediante Métodos Moleculares.*, 2009. <<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/AQMmicroorganismos.html>> 22 de octubre de 2012.
  - Sanchez-Otero, Julio. *Introducción al Diseño Experimental*. INGELSI. Quito, 2008.
  - Sanz, Y., Collado, M.C., Dalmau, J. (2003). Probióticos: Criterios de Calidad y Orientaciones para el Consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9).

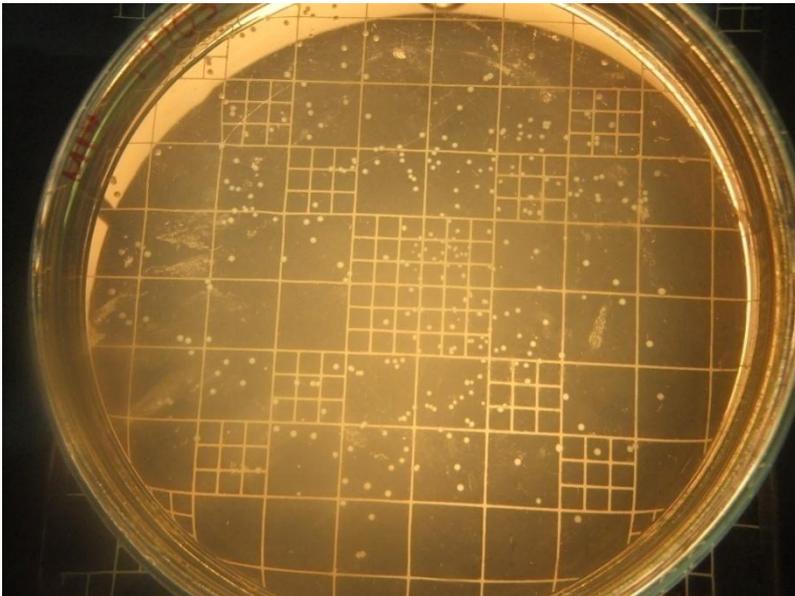
- Sawa, N. et al. Applied Microbiology. *Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by Leuconostoc pseudomesenteroides QU 15 .7* de Diciembre de 2009. 6 de Junio de 2012.
- Schillinger, Ulrich et al. Federation of European Microbiological Societies. *Diversity of bacillus species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria.*» 24 de Julio de 2008 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501038>> 4 de Junio de 2012.
- *Técnicas en Biología Celular y Molecular*. s.f.
- Teixeira, Karina et al. World J Microbiol Biotechnol. *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir*. 20 de Enero de 2010. 17 de Febrero de 2012.
- Thomson PLM. 2004. 6 de Junio de 2012.
- Van Hoorde, Koenraad et al. Elsevier. *Selection, application and monitoring of Lactobacillus paracasei strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses.* Diciembre de 2010 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510002837>> 6 de Junio de 2012.
- Waldherr, Florian et al. Elsevier. *Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from Lactobacillus hilgardii TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir.*» 30 de Marzo de 2010 <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/identification-and-characterization-of-a-glucan-producing-enzyme-from-abHa0GTB0X>> 20 de Febrero de 2012.
- Yanping, Wan et al. Microbiol Biotechnol. *Effects of Lactobacillus plantarum MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on highcholesterol diet.* 15 de Mayo de 2009. 20 de Febrero de 2012.
- Zandamela, Eduarda. Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. 2008. 25 de Enero de 2013. Zapata, Sonia. *Manual de Microbiología*. Quito, 2012.

## ANEXOS

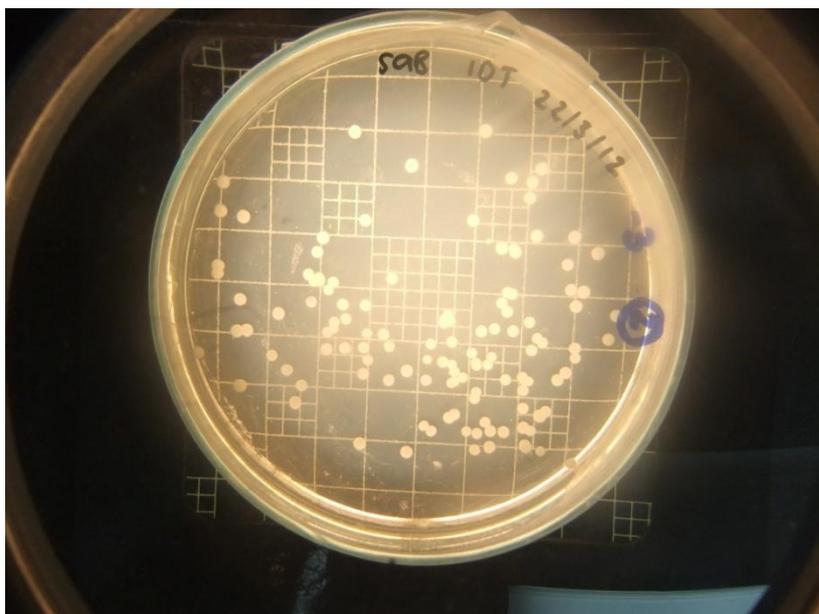
### Recuento MRS dilución $10^{-6}$



### Recuento M17 dilución $10^{-5}$



### Recuento Saboraud dilución $10^{-4}$



### Resultados Amplificación 16S

