



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA ZOOTECNIA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN PREPARADO  
MICROBIANO A PARTIR DE *Lactobacillus sp.* DEL TRACTO  
DIGESTIVO DEL CERDO”**

**Trabajo de Titulación:**

**Tipo:** Trabajo experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA ZOOTECNISTA**

**AUTORA:** MARÍA BELÉN PONCE CHUTO

**DIRECTOR:** Ing. LUIS GERARDO FLORES MANCHENO Ph.D.

Riobamba – Ecuador

2021

**©2021, María Belén Ponce Chuto**

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.

Yo, María Belén Ponce Chuto declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

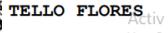
Riobamba, 12 de noviembre de 2021.

**María Belén Ponce Chuto**

**060424210-7**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA ZOOTECNIA**

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo experimental, “**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN PREPARADO MICROBIANO A PARTIR DE *Lactobacillus sp.* DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CERDO**”, realizado por la señorita: **MARÍA BELÉN PONCE CHUTO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Byron Díaz Ph.D. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	BYRON LEONCIO DIAZ MONROY  <small>Firmado digitalmente por BYRON LEONCIO DIAZ MONROY Fecha: 2021.12.01 20:49:15 -05'00'</small>	2021-11-12
Ing. Luis Gerardo Flores Mancheno Ph.D. <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	Luis_Flores  <small>Firmado digitalmente por Luis_Flores DN: cn=Luis_Flores, o=ESPOLCH ou=Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ou=Dirección de Publicaciones e-Información, email=luisgerardofloresmanchengo@yahoos.es Motivo: Soy el autor de este documento Último: 2021.12.06 14:39:05.00</small>	2021-11-12
Ing. Luis Andrés Tello Flores <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	 <small>Firmado digitalmente por: LUIS ANDRES TELLO FLORES</small> 	2021-11-12

## **DEDICATORIA**

A mis padres, motor principal en mi vida, por su esfuerzo y dedicación hacia mí, a mi madre por su ejemplo de lucha y amor incondicional, a mi padre por siempre apoyarme para conseguir mis metas.

A mis hermanos por haberme inyectado siempre animo cuando desmayaba, por motivarme y sentirse orgullosos de la hermana que tienen, a mis amigos que a lo largo de este camino han sumado de alguna manera para conseguir esta meta.

A los buenos profesores que a lo largo de la carrera me han sabido formar académicamente y como persona, gracias por cada uno de los consejos que me han engrandecido como futura profesional y persona.

Y para las personas que quiero, que hoy están en el cielo y desde ahí seguirán guiando mi camino para seguir alcanzando más metas.

***María Belén***

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios porque sin el nada en mi vida sería posible, a mis padres que con su lucha diaria y trabajo duro supieron sacarnos adelante a mí y a mis hermanos, a mi padre por su ejemplo de superación y trabajo duro por el que ha llegado hacer el gran hombre de ahora, a mi madre por su incondicional apoyo y motivación en los momentos difíciles por ayudarme a luchar por conseguir lo que quiero y nunca rendirme.

A mis abuelitos por su amor e inspiración de amor al campo y a los animales, y a todas las personas que con su apoyo me motivaron a llegar a culminar una de mis metas.

*María Belén*

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Anatomía del sistema digestivo del cerdo.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. <i>Intestino delgado</i> .....	4
1.1.2. <i>Duodeno</i> .....	4
1.1.3. <i>Yeyuno</i> .....	4
1.1.4. <i>Íleon</i> .....	4
<b>1.2. Flora intestinal del lechón.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Bacterias ácido-lácticas.....</b>	<b>5</b>
1.3.1. <i>Clasificación de las bacterias ácido-lácticas</i> .....	5
1.3.1.1. <i>Homofermentativas</i> .....	5
1.3.1.2. <i>Heterofermentativas</i> .....	6
1.3.2. <i>Bacterias ácido-lácticas presente en microflora intestinal del lechón</i> .....	7
<b>1.4. Preparado microbiano.....</b>	<b>7</b>
1.4.1. <i>Medios de cultivo</i> .....	7
1.4.2. <i>Preparación de medios de cultivo</i> .....	8
<b>1.5. Probióticos.....</b>	<b>9</b>
1.5.1. <i>Historia de los probióticos</i> .....	9
1.5.2. <i>Características de los probióticos</i> .....	9
1.5.3. <i>Mecanismo de acción de los probióticos</i> .....	10
<b>1.6. Requisitos que deben cumplir los probióticos.....</b>	<b>10</b>
1.6.1. <i>Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento del alimento.</i> .....	10
1.6.2. <i>Estabilidad frente a ácidos gástricos y bilis.</i> .....	11
1.6.3. <i>Adherencia a la mucosa intestinal</i> .....	11
1.6.4. <i>Producción de sustancias antimicrobianas</i> .....	11

1.6.5.	<i>Función de los probióticos</i> .....	12
1.6.6.	<i>Efecto de los probióticos sobre la microbiota y el tracto gastrointestinal en cerdos</i> .....	12

## CAPÍTULO II

2.1.	<b>Localización y duración del experimento</b> .....	13
2.2.	<b>Unidades experimentales</b> .....	13
2.3.	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	13
2.3.1.	<i>Materiales</i> .....	14
2.3.1.1.	<i>De campo</i> .....	14
2.3.1.2.	<i>De Laboratorio</i> .....	14
2.3.2.	<i>Equipos</i> .....	15
2.3.2.1.	<i>De campo</i> .....	15
2.3.2.2.	<i>De laboratorio</i> .....	15
2.3.2.3.	<i>Reactivos</i> .....	16
2.3.3.	<i>Tratamiento y diseño experimental</i> .....	16
2.3.4.	<i>Esquema del experimento</i> .....	17
2.4.	<b>Mediciones experimentales</b> .....	18
2.5.	<b>Análisis estadísticos y pruebas de significancia</b> .....	18
2.5.1.	<i>Procedimiento Experimental</i> .....	18
2.5.2.	<i>Metodología de Evaluación</i> .....	18
2.5.2.1.	<i>pH</i> .....	18
2.5.2.2.	<i>Ácido láctico</i> .....	19
2.5.2.3.	<i>Viabilidad</i> .....	19
2.5.2.4.	<i>UFC/ml</i> .....	19
2.5.2.5.	<i>Color</i> .....	19
2.5.3.	<i>Metodología</i> .....	20
2.5.3.1.	<i>Fase de Laboratorio</i> .....	20
2.5.3.2.	<i>Descongelamiento de las cepas</i> .....	20
2.5.3.3.	<i>Nutrición de las cepas</i> .....	20
2.5.3.4.	<i>Concentración de bacterias</i> .....	20
2.5.3.5.	<i>Formulación del preparado microbiano</i> .....	20
2.6.	<b>pH</b> .....	21
2.7.	<b>Ácido láctico</b> .....	21
2.8.	<b>Viabilidad</b> .....	22
2.9.	<b>UFC</b> .....	22
2.10.	<b>Color</b> .....	22

## **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.</b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	<b>Identificación de los aislamientos bacterianos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.</b>	<b>PH.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.</b>	<b>Ácido láctico, % .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.</b>	<b>Viabilidad .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.</b>	<b>UFC/ ml .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.</b>	<b>Color .....</b>	<b>28</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>32</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Formulación del preparado microbiano.....	8
<b>Tabla 1-2:</b> Condiciones meteorológicas.....	13
<b>Tabla 2-2:</b> Diseño del esquema del experimento .....	17
<b>Tabla 3-2:</b> Esquema de la ADEVA.....	18
<b>Tabla 1-3:</b> Pruebas morfológicas de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bacillus</i> .....	23
<b>Tabla 2-3:</b> Pruebas Bioquímicas de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bacillus</i> .....	24
<b>Tabla 3-3:</b> Cuantificación de color.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Sistema digestivo Porcino.....	3
<b>Figura 2-1:</b> Fermentación Homoláctica .....	6

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Evaluación del pH de cada Preparado Microbiano a partir de Lactobacillus, durante diferentes periodos de tiempo. ....	25
<b>Gráfico 2-3:</b> Ácidos lácticos de los preparados microbianos a diferentes horas.....	26
<b>Gráfico 3-3:</b> % de supervivencia de cada cepa en bilis de buey deshidratada al 0,3% .....	27
<b>Gráfico 4-3:</b> Conteo de ufc/ml de los preparados microbianos a distintas horas. ....	28

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** TOMA DE MUESTRAS

**ANEXO B:** SIEMBRA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

**ANEXO C:** PURIFICACIÓN DE COLONIAS

**ANEXO D:** IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

**ANEXO E:** CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

**ANEXO F:** CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS

**ANEXO G:** FORMULACIÓN DEL PREPARADO MICROBIANO

**ANEXO H:** DETERMINACIÓN DE pH y ÁCIDO LÁCTICO

**ANEXO I:** DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN BACTERIANA

**ANEXO J:** CONCENTRACIÓN UFC/ML

**ANEXO K:** PRUEBA DE VIABILIDAD

**ANEXO L:** ANÁLISIS DE VARIANZA – PH

**ANEXO M:** SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – PH

**ANEXO N:** ANÁLISIS DE VARIANZA – ÁCIDO LÁCTICO

**ANEXO Ñ:** SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – ÁCIDO LÁCTICO

**ANEXO O:** ANÁLISIS DE VARIANZA - VIABILIDAD POR PRUEBA DE BILIS 0,03%

**ANEXO P:** ANÁLISIS DE VARIANZA – UFC en 1ml

**ANEXO Q:** SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – UFC en 1ml

**ANEXO R:** CUANTIFICACIÓN DEL COLOR

**ANEXO S:** REPORTE DE RESULTADOS DEL LABORATORIO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS.

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo elaborar un preparado microbiano a partir de ocho cepas de *Lactobacillus* del tracto digestivo del cerdo, utilizando componentes nacionales para su crecimiento bacteriano, evaluando y caracterizando cada preparado para determinar si puede ser utilizado como posible probiótico. Los preparados microbianos se evaluaron por 48 horas experimentando, la determinación de pH al igual que el ácido láctico se evaluó por 24 horas con intervalos de 4 horas. La evaluación de la viabilidad de las cepas se dio por la prueba bioquímica de bilis de buey deshidratada 0,3%, simulando in vitro el paso de las cepas por el tracto digestivo del cerdo, determinando el % de supervivencia de cada cepa. La concentración de ufc/ml se evaluó a diferentes horas, hora inicial del preparado, 24 horas y 48 horas. El color se evaluó de manera cuantitativa, midiendo la longitud de onda que puede percibir en ojo humanos, con la utilización de un colorímetro. Para el análisis estadístico se trabajó con dos variables con estadística descriptiva y tres variables con estadística experimental utilizando prueba de Tukey para determinar significancia, mostrando resultados de alta significancia entre cada preparado. Una vez evaluadas todas las variables se obtuvo como resultado cinco preparados microbianos que cumplen con la característica de probiótico, *Lactobacillus fermentarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*. Los tres preparados microbianos que no cumplieron las características para ser utilizados como probióticos, se debe a que necesitan mejores condiciones ambientales para desarrollarse que las que se ofrecieron con este preparado microbiano. Se recomienda replicar la presente investigación en otras especies de interés zootécnico, para determinar la existencia de microorganismos con capacidad probiótica que se puedan utilizar en la alimentación de las mismas especies.

**Palabras claves:** < LACTOBACILLUS >, <PREPARADO MICROBIANO>, <Ph>, <ÁCIDO LÁCTICO>, <VIABILIDAD>, <PROBÍOTICOS>.

CRISTHIAN  
FERNANDO  
CASTILLO  
RUIZ

Firmado  
digitalmente por  
CRISTHIAN  
FERNANDO  
CASTILLO RUIZ  
Fecha: 2021.11.24  
20:39:21 -05'00'



2156-DBRA-UTP-2021

## ABSTRACT

The objective of this present study aimed to elaborate a microbial preparation from eight strains of Lactobacillus from the digestive tract of the pig, using national components for its bacterial growth, evaluating and characterizing each preparation to determine their use as a possible probiotic. Microbial preparations were evaluated for 48 hours, experiencing pH determination and lactic acid for 24 hours, with intervals of 4 hours. Applying a biochemical test of dehydrated ox bile 0.3% was evaluated the viability of the strains by simulating in vitro the strain passage through the pig digestive tract and determining the % survival of each group strain. The concentration of cfu/ml was evaluated at different times, initial time of preparation, 24 hours, and 48 hours. A colorimeter evaluated the color; quantitatively, measuring the wavelength that the human eye can perceive. The statistical analysis worked with two variables, with descriptive statistics and three variables with experimental statistics using the Tukey test to determine significance, and obtained results of high level between each preparation. The results obtained were five microbial preparations met the characteristics of probiotics, Lactobacillus fermentarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis and, Lactobacillus plantarun. The three microbial preparations that did not meet the probiotics characteristics; needed better environmental conditions to develop. It recommended replicating this study in other species; to determine the existence of microorganisms with a probiotic capacity to use in the animal feeding.

**Key words:** < LACTOBACILLUS >, <MICROBIAL PREPARATION>, <pH>, <LACTIC ACID>, <VIABILITY>, <PROBIOTICS>.

060275845 Firmado  
0 MARIA digitalmente por  
GUADALUP 0602758450 MARIA  
E ESCOBAR GUADALUPE  
MURILLO ESCOBAR MURILLO  
Fecha: 2021.12.01  
12:03:44 -05'00'

## INTRODUCCIÓN

A pesar de que hoy en día no se conoce detalladamente cuál es el mecanismo por el que los antibióticos facilitan el engorde del animal, sabemos que actúan sobre la microbiota intestinal, reduciéndola, y como consecuencia aumenta la disponibilidad de los nutrientes (Vega, 2017, p. 2).

Al parecer, ya en los años 50 se utilizaban antibióticos con la finalidad de facilitar el crecimiento animal, sin embargo, no fue hasta finales de los años 60 cuando se planteó si realmente el uso de antibióticos provocaba un aumento de la resistencia a los mismos (Vega, 2017, p. 2).

La prohibición o restricción del uso de muchos de estos aditivos ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas, entre las que se encuentran los probióticos. Los probióticos se han consolidado como una de las alternativas naturales al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en animales, pues no generan efectos colaterales y producen mejor digestibilidad, ganancia en peso y mayor índice de conversión alimentaria (Gutiérrez et al., 2013, p. 135).

Los microorganismos usados como probióticos en nutrición animal no deben ser patógenos para los animales y deben ser resistentes a los procesos de elaboración de alimentos y piensos. Se ha reportado que el beneficio de los probióticos en animales productivos se debe principalmente a que estos fomentan el balance microbiano en el tubo digestivo y la modulación del sistema inmune, resultando en un aumento en la digestión y absorción de nutrientes, y disminuyen la incidencia de enfermedades infecciosas (Molina, 2019, p. 601).

Actualmente, tras numerosas redefiniciones, la FAO/OMS (2001) define probiótico como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”. (Díaz et al., 2012, p. 388) manifiesta que esta cantidad varía de un país a otro en función de su legislación; sin embargo, generalmente un producto probiótico debería contener  $>10^6 - 10^8$  CFU/g ó  $>10^8 - 10^{10}$  UFC/dosis de células viables. Además, los probióticos son definidos como seguros según el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”).

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Gutiérrez, 2001, p. 1)

Los aditivos microbianos generalmente presentan pH bajo, están compuestos por lactobacilos, levaduras y ácidos orgánicos de cadena corta. Su uso permite controlar el desarrollo de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, disminuir la incidencia de diarreas incrementar la retención de energía y generar mayor ganancia de peso (Borrás et al., 2017, p. 28).

Así mismo, las propiedades acidificantes de estos aditivos, mejoran la funcionalidad intestinal y promueven mayor control del crecimiento de microorganismos sensibles, favorecen las

condiciones ecológicas intestinales, aumentan el consumo voluntario de alimento y reducen la mortalidad (Borrás et al., 2017, p. 28).

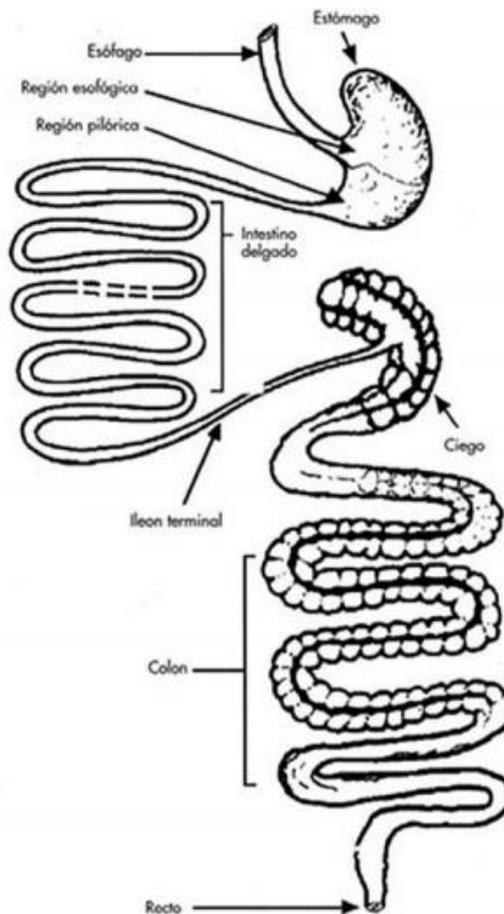
El objetivo general de esta investigación es elaborar y caracterizar preparados microbianos a partir de ocho cepas de *Lactobacillus* aisladas del tracto digestivo del cerdo, utilizando componentes nacionales para el crecimiento de los mismos, evaluando su capacidad de crecimiento, producción y estabilidad, con el fin de determinar las características microbiológicas y químicas de los preparados .

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Anatomía del sistema digestivo del cerdo

El tracto digestivo puede ser considerado como un tubo que comienza en la boca y termina en el recto. En cierto aspecto su contenido puede ser considerado como externo al cuerpo. La parte posterior de la boca se abre dentro de la faringe la cual es el área común para el paso tanto de pienso como de aire. Una válvula o colgajo de tejido llamado paladar blando se mueve de forma automática para proteger la abertura dentro de la tráquea o cuando se traga. Las tonsilas (o amígdalas) del cerdo están situadas en la superficie del paladar blando. El esófago es el tubo que conduce el pienso desde la faringe hacia el estómago (CIAP 2014, p. 1), como se observa en la figura 1-1.



**Figura 1-1:** Sistema digestivo Porcino  
Fuente: El sitio porcino, 2014.

### **1.1.1. Intestino delgado**

(Derouche, 2014, p. 2) menciona que el intestino delgado es el lugar principal de absorción de nutrientes, y está dividido en tres secciones. La primera sección es el duodeno. El duodeno tiene aproximadamente 12 pulgadas de largo y es la porción del intestino delgado con los conductos hacia el páncreas y el hígado (vesícula biliar).

(Aguavil 2012, p. 103) manifiesta que las partes de intestino delgado son;

### **1.1.2. Duodeno**

La reacción del contenido del duodeno es casi siempre ácida, presentando un pH de 6,3 por lo que posiblemente el jugo gástrico ejerce aquí la mayor parte de su acción.

### **1.1.3. Yeyuno**

El yeyuno consta de unas diez asas pequeñas, dispuestas como una guirnalda y suspendidas de una parte del mesenterio. Presenta un pH de 7,04.

### **1.1.4. Íleon**

El íleon, cuya estructura es estirada y se encuentra en el centro de la cavidad abdominal, el pH es de 7,59.

## **1.2. Flora intestinal del lechón**

Cada especie animal tiene una flora intestinal característica, manteniendo su equilibrio bacteriano en función de distintos factores, pero fundamentalmente de la alimentación. No obstante, existen diferentes tipos de microorganismos que resultan beneficiosos para cualquier especie animal. Uno de ellos son los *Lactobacillus* que se encargan de descomponer los principios nutritivos que no han sido digeridos en otras partes del tubo digestivo. Un segundo grupo estaría formado por las bifidobacterias, responsables de la síntesis de vitaminas sobre todo las del grupo B, las levaduras encargadas del mantenimiento de la estabilidad intestinal y otras bacterias pertenecientes a varios géneros que intervienen en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal. Junto a estos microorganismos destaca una flora subdominante compuesta por *Enterobacterias*, *Enterococos*, *E. coli* y gérmenes oportunistas. Y, finalmente, hay un tercer grupo de microorganismos fluctuantes con poder patógeno potencial formado por *Clostridium spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* (Quiles, 2007, p. 19 - 27).

### **1.3. Bacterias ácido-lácticas**

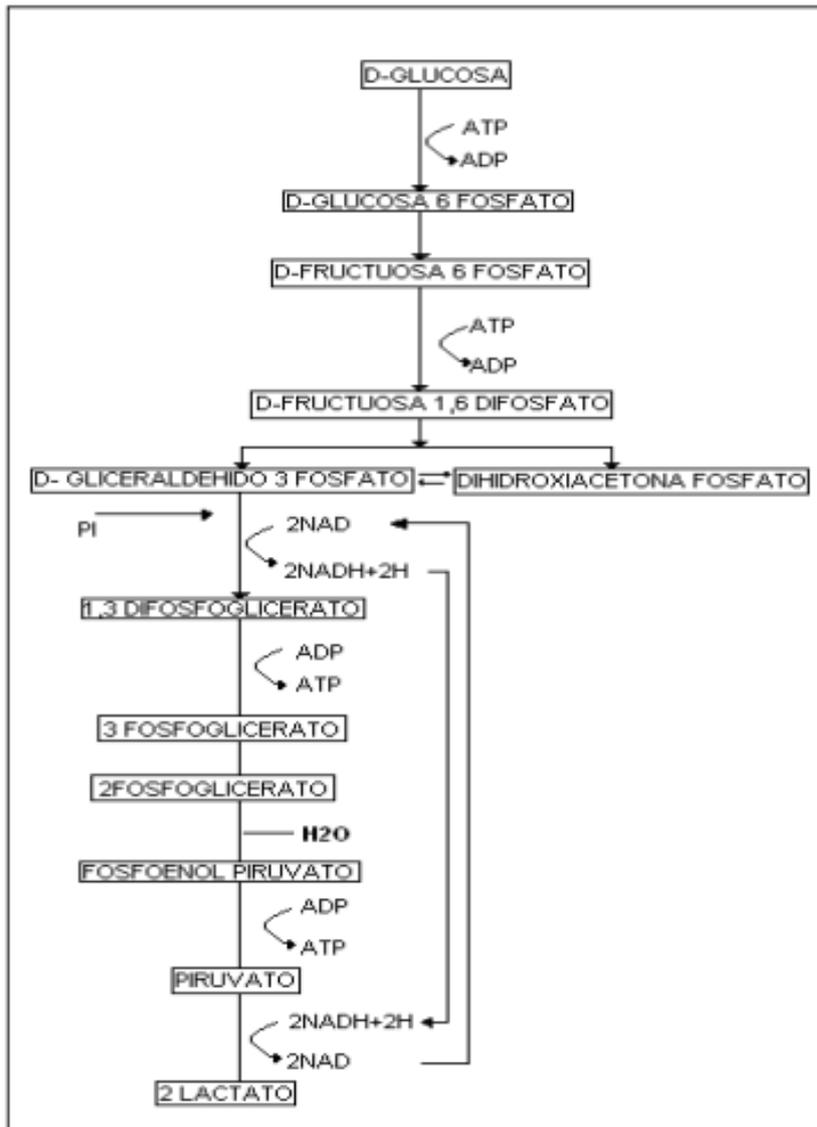
Las BAL son un grupo grande de bacterias con la característica común de producir ácido láctico como el principal producto final del metabolismo; se encuentran en la leche y en otros ambientes naturales. Las bacterias lácticas son Gram positivas, ácidos tolerantes, soportan rangos de pH entre 4.8 y 9.6, lo que les permite sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no sobrevivirían. Las bacterias lácticas tienen formas de cocos o de bastoncitos y son catalasa negativa (Noboa, 2015, p. 11).

#### ***1.3.1. Clasificación de las bacterias ácido-lácticas***

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros. El tipo y características de los organismos indicadores son utilizados en la producción de leches fermentadas, son los más importantes factores que determinan la selección de indicadores incluye acidificación, aroma, sabor, estabilidad y textura. Estos pueden clasificar de varias maneras, dependiendo de su forma, temperatura de crecimiento, funciones etc. Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (producen solo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos (Parra, 2010, p. 96), como se muestra en la figura 2-1.

##### ***1.3.1.1. Homofermentativas***

El grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden–Meyerhott-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contraste, las Bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativa (Parra, 2010, p. 97).



**Figura 2-1:** Fermentación Homoláctica  
Fuente: Parra, H. 2010.

### 1.3.1.2. Heterofermentativas

Producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa. Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo; *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa; así que, en lugar de seguir la vía (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Parra, 2010, p. 97).

### **1.3.2. Bacterias ácido-lácticas presente en microflora intestinal del lechón**

Normalmente, los lechones se encuentran estériles o exentos de microorganismos en el útero de la cerda, aunque algunos patógenos como el virus del PRRS pueden infectar a los lechones en el útero materno. Ahora bien, pasadas algunas horas ya podemos encontrar colonias de bacterias en el lechón procedentes bien de la propia cerda (fundamentalmente a partir de las heces y del canal del parto) o bien de la sala de partos, de tal manera que, a las 12 horas de vida, ya podemos detectar en las heces de los lechones una cifra de 10<sup>8</sup>- 10<sup>9</sup> bacterias/g de heces. Estas bacterias buscan el nicho más adecuado, donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa a la flora intestinal saprofítica. Las primeras bacterias en colonizar el tubo digestivo son cepas no patógenas de *E. coli*, *Clostridium welchii*, *Streptococos (Streptococcus faecium)*, *Lactobacilos (Lactobacillus acidophilus)* y *Bacteroides*, éstos últimos son los más numerosos del intestino grueso a partir del 2º día, junto con *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* y *Clostridium*; por el contrario, los lactobacilos son los más numerosos en el estómago y en el intestino delgado (Quiles, 2007, p. 24).

## **1.4. Preparado microbiano**

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5 °C y otras a 45 °C; toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias; algunas pueden crecer a pH de 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4,5, por lo que pueden ser desplazadas de los hábitats que colonizan. Para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir, primero, una caracterización in vitro, la cual contemplará estabilidad fenotípica y genotípica, seguida de patrones de utilización de carbohidratos y proteínas, tales como resistencia a la acidez gástrica y a la bilis, adhesión al epitelio intestinal, resistencia a lisozima y capacidad de utilizar prebióticos; estos dos últimos pueden ser opcionales. Además, pruebas o ensayos in vivo e in vitro que demuestren el o los efectos probióticos adjudicados, y no presentar resistencia a anti- bióticos ni determinantes de patogenicidad (Borrás et al., 2017, p. 9).

### **1.4.1. Medios de cultivo**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo

un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad (Fontalvo, 2018, p. 23).

#### **1.4.2. Preparación de medios de cultivo**

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar. En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente o a 40-50°C si se trata de medios con agar. Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.). Si es un medio sólido y se ha de distribuir en tubos o en matraces será necesario fundir el agar en baño María u horno microondas, una vez fundido y homogenizado, se distribuye en caliente a los tubos o matraces (no en placas Petri) se tapa y se esteriliza en el autoclave. Una vez finalizada la esterilización los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán, en su caso, inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado o pico de flauta (slant) si tal es su finalidad. Las placas de Petri se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico (por ejemplo, en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen) es conveniente homogenizar el medio en el transcurso de la operación para evitar que el agar sedimente en el fondo del recipiente y no se distribuya por igual en todas las placas. También es posible conservar el medio destinado a preparar placas Petri solidificado y estéril en tubos que se fundirán al baño María en el momento de la preparación de estas. Los caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente, pero para reducir su deshidratación y el consiguiente cambio en las concentraciones de sus componentes es preferible conservarlos a 4°C (Fontalvo, 2018, p. 27).

La formulación del preparado microbiano utilizado en la investigación se describe en la tala 1-1.

**Tabla 1-1:** Formulación del preparado microbiano

Agua	45 %
Cultivo bacteriano	33 %
Melaza	20 %
Ureas	1 %
Sales minerales	20 %

**Realizado por:** Ponce, 2021.

## **1.5. Probióticos**

Un probiótico es un “microorganismo vivo que cuando se administra en la cantidad adecuada, le genera un efecto benéfico al huésped”. Los probióticos pueden ser útiles en las producciones pecuarias porque mejoran el bienestar de los animales, disminuyen los problemas de salud y, por ende, pueden aumentar la productividad; además de estar acorde con las normas legales y las exigencias para alimentos funcionales bio-seguros del consumidor PRP (Giraldo et al., 2015, p. 148). El término “probióticos” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, los prebióticos fueron definidos como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros organismos. En 1989, Roy Fuller destacó el hecho que para considerarse probiótico, el microorganismo en cuestión debía estar presente en estado viable, e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped (Organización Mundial de la Salud 2011, p. 29).

### ***1.5.1. Historia de los probióticos***

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (FAO y OMS 2006, p. 52).

### ***1.5.2. Características de los probiótico***

Los microorganismos probióticos son bacterias ácido-lácticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y tradicionalmente se han clasificado con base en sus propiedades morfológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad fermentadora de glucosa y otros carbohidratos y la configuración del ácido láctico producido. Los *Lactobacillus* son bacilos gram positivos, no esporulados, aerotolerantes, ácido-tolerantes, catalasa negativa, carentes de citocromo; aunque se presentan excepciones cuando algunas especies cultivadas en medios ricos en hematina o compuestos relacionados pueden sintetizar catalasa; también son estrictamente fermentadores produciendo una gran diversidad de ácidos, siendo el principal el láctico. Las especies del género *Bifidobacterium* son cocobacilos grampositivos, no esporulados,

generalmente anaerobios estrictos, pero pueden crecer bajo condiciones microaerófilas cuando están en presencia de CO<sub>2</sub> (Salazar, Montoya, 2003, p. 22).

### ***1.5.3. Mecanismo de acción de los probióticos***

Los aditivos o probióticos son sustancias o compuestos usados en la formulación de alimentos para animales, con el objetivo de:

- Complementar las necesidades nutricionales para mejorar la producción animal, en particular afectando la flora gastrointestinal o mejorando digestibilidad de otros ingredientes.
- Afectan favorablemente las características de los ingredientes de la dieta.
- Previene o reduce el efecto dañino causado por la excreción de los animales mejorando el medio ambiente
- Crea condiciones favorables en el intestino delgado bajo el control o modulación de la población bacteriana de los animales para mejorar la digestión de los alimentos.
- Mejoran el olor, sabor y la preservación de los alimentos para animales.
- También ayudan a mantener bajo control a organismos potencialmente dañinos en los intestinos (bacterias dañinas y levaduras). Actúan colonizando el intestino delgado y desplazando los organismos causantes de enfermedades, por lo cual restauran el equilibrio adecuado de la flora intestinal.
- Estimulan el sistema inmunológico del cuerpo, también pueden ayudar a combatir varias enfermedades gastrointestinales (Suárez, Guevara, 2017, p. 23).

### **1.6. Requisitos que deben cumplir los probióticos**

(Salazar, Montoya, 2003, p. 22), manifiesta; Las cepas de microorganismos probióticos deben presentar y mantener unas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento que lo contiene o al que se adiciona, como también durante su tránsito a través del estómago e intestino delgado, y su capacidad de adherirse a las mucosas del intestino grueso. Entre las principales características se encuentran:

#### ***1.6.1. Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento del alimento.***

La viabilidad es la capacidad que tienen estos microorganismos de permanecer vivos, tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado, con el fin de lograr los beneficios de dichos alimentos. La viabilidad está relacionada con el método de producción y con el microorganismo adicionado al producto fermentado. En Colombia, se exige que las leches

fermentadas con probióticos deben presentar una viabilidad en Unidades Formadoras Colonias (UFC) de concentraciones no menores de  $10^6$  UFC /g durante un período mínimo de 21 días (Tuomola et al., 2001, p. 73).

#### ***1.6.2. Estabilidad frente a ácidos gástricos y bilis.***

Estos microorganismos deben de resistir las concentraciones de ácido y sales biliares del estómago o intestino delgado de los seres humanos y animales. Para comprobar la resistencia a estos medios adversos existe una prueba que se realiza in vitro a pH=2 y con las sales biliares a una concentración de 0.3% p/v; porque no todas las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan esta característica, por lo tanto, es un criterio importante para seleccionar un microorganismo probiótico (Shah, 2001, p. 46-52).

#### ***1.6.3. Adherencia a la mucosa intestinal***

Los microorganismos probióticos tienen la capacidad de sintetizar un biosurfactante de composición glicoproteína, el cual favorece la adhesión a las superficies de las células M y/o a las placas de peyer, y de esta manera compiten con los microorganismos enteropatógenos e impiden que éstos colonicen el intestino, lo que conlleva en última instancia a estimular el sistema inmunológico, presentándose un aumento en los niveles de algunas Inmunoglobulinas en el organismo. Esta propiedad se comprobó en estudios in vitro sobre las líneas celulares Caco-2 y Ht-29 (Bernet et al., 1993, p. 4121).

#### ***1.6.4. Producción de sustancias antimicrobianas***

Cuando estos microorganismos metabolizan carbohidratos, sintetizan compuestos como: ácido láctico, fórmico, acético; peróxido de hidrógeno, aniones super óxido y radicales hidroxilo; dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído e isómeros D de aminoácidos. También pueden sintetizar algunas sustancias llamadas bacteriocinas como la reuterina, de naturaleza no proteica con bajo peso molecular que ejercen una acción antimicrobiana, al actuar sobre estructuras específicas de los diferentes microorganismos que ellos inhiben. Esto cobra mayor importancia cuando tales microorganismos son patógenos, como es el caso de la *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium perfringens* y *Cl. difficile* principalmente (Bezkorovainy, 2001, p. 73).

### ***1.6.5. Función de los probióticos***

Los probióticos son considerados “alimentos funcionales”, en otras palabras, alimentos enriquecidos que no solo aportan a quien los ingiere beneficios netamente nutricionales, sino también otros que los permiten mejorar su salud. Así, tanto probióticos, como prebióticos, además de nutrir a quien los consume, colonizan el intestino modificando positivamente la flora intestinal y mejorando el funcionamiento del sistema inmune y, por tanto, la salud global del organismo (Gualpa, Rubio, 2018, p. 101).

(Quiles, 2007, p. 21) manifiesta, los efectos beneficiosos de los probióticos;

- No producen resistencias bacterianas
- Regulan la flora intestinal
- Estimulan el sistema inmunitario
- Reduce las acciones inflamatorias
- Previenen la colonización de microorganismos patógenos
- Incrementan la producción de ácidos grasos volátiles
- Incrementan la síntesis de vitaminas del grupo B
- Mejoran la absorción de minerales
- Mejora la utilización de los nutrientes de la dieta

### ***1.6.6. Efecto de los probióticos sobre la microbiota y el tracto gastrointestinal en cerdos***

Las bacterias probióticas son transferidas desde la cerda a los lechones por contacto con las heces maternas, antes de que éstos inicien el consumo de alimento sólido. En el periodo del destete se genera una disrupción en la microbiota normal del tracto gastrointestinal con cambios en la flora bacteriana del ciego, aumento en las enterobacterias y disminución de las bacterias ácido-lácticas que abundan en el lechón lactante. Simultáneamente, suceden cambios en la histología del ciego, aumentándose la actividad proliferativa de las criptas y del sistema inmune en la mucosa cecal (Giraldo et al., 2015, p. 149).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Localización y duración del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la ESPOCH, ubicada en la matriz, en la ciudad de Riobamba, Km 1 ½ de la Panamericana Sur, la misma que tuvo una duración de 60 días.

Las condiciones meteorológicas donde se realizó la presente investigación presentan los siguientes parámetros que se detallan en la tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Condiciones meteorológicas

PARÁMETRO	PROMEDIO
Altitud	2754 msnm
Temperatura	13,5 °C
Humedad Relativa	75,8 %
Viento	1,6 m/s
Precipitación	8.8 mm H <sub>2</sub> O

Fuente: Estación Meteorológica

Realizado por: Ponce, 2021.

#### 2.2. Unidades experimentales

Para el presente trabajo investigativo se utilizaron 8 cepas de Bacterias Ácido-Lácticas (1,5 ml), las mismas que se obtuvieron a partir del tracto digestivo de dos cerdos Landrace. Se trabajó con 8 preparados, 3 repeticiones por cada uno y a diferentes horas (4-8-12-16-20-24 horas).

#### 2.3. Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron en la presente investigación son los siguientes:

### **2.3.1. Materiales**

#### *2.3.1.1. De campo*

- Cerdos
- Cuaderno de apuntes
- Esferográficos
- Marcador de vidrio
- Etiquetas adhesivas
- Cilindro de gas
- Tijera
- Bisturí
- Fósforos
- Funda ziploc
- Hielera
- Splay de alcohol
- Splay de amoniaco

#### *2.3.1.2. De Laboratorio*

- Papel aluminio
- Papel bond
- Papel absorbente
- Papel termo resistente
- Papel film
- Asa de siembra
- Mechero
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Vaso termo resistente
- Varillas de agitación magnética
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas de 5 ml
- Puntas de 1 ml
- Cajas petri vidrio
- Cajas petri plástico

- Probeta de 10 ml
- Probeta de 100 ml
- Probeta de 250 ml
- Probeta de 500 ml
- Vaso de precipitación de 250 ml
- Vaso de precipitación de 500 ml
- Vaso de precipitación 1000 ml
- Desecador
- Erlenmeyer de 100 ml
- Erlenmeyer de 2000 ml
- Pinzas
- Piseta
- Pipeta pasteur
- Porta objetos
- Pera de succión
- Vidrio reloj
- Espátula
- Fundas Stomacher
- Guantes
- Cofia
- Uniforme
- Mandil

### **2.3.2. Equipos**

#### *2.3.2.1. De campo*

- Balanza 5 Kg
- Computadora
- Cámara fotográfica

#### *2.3.2.2. De laboratorio*

- Balanza analítica, sensibilidad 0.001 g
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora

- Lámpara UV ultravioleta
- Equipo de disección
- Estufa
- Probetas graduadas
- Agitador magnético
- Mesa de disección
- Equipo Tinción de Gram
- Estomacher
- Agitador Vortex
- Autoclave
- Baño María
- Ph metro
- Contador de colonias
- Colorímetro

#### 2.3.2.3. *Reactivos*

- Reactivos Tinción de Gram
- Agar MRS
- Caldo MRS
- Peptona
- Agua oxigenada
- Agua destilada
- Tiras de Oxidasa
- Ácido Clorhídrico
- Peróxido de Potasio
- Bullís de buey deshidratada

#### 2.3.3. *Tratamiento y diseño experimental*

Se realizó un análisis descriptivo de los ocho preparados microbianos a partir de los *Lactobacillus* (*L. fermentarum*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidiphilus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*). Para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, factor A (cepas), factor B (horas).

### 2.3.4. Esquema del experimento

En la tabla 2-2, se describe el diseño del esquema del experimento

**Tabla 2-2:** diseño del esquema del experimento

TRATAMIENTO (factor A)	HORAS (factor B)	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE	Total Observaciones
<i>L. fermentarum</i>	4	T1-4	3	6	18
	8	T1-8			
	12	T1-12			
	16	T1-16			
	20	T1-20			
<i>L. delbrueckii</i>	4	T2-4	3	6	18
	8	T2-8			
	12	T2-12			
	16	T2-16			
	20	T2-20			
<i>L. reuteri</i>	4	T3-4	3	6	18
	8	T3-8			
	12	T3-12			
	16	T3-16			
	20	T3-20			
<i>L. casei</i>	4	T4-4	3	6	18
	8	T4-8			
	12	T4-12			
	16	T4-16			
	20	T4-20			
<i>L. acidophilus</i>	4	T5-4	3	6	18
	8	T5-8			
	12	T5-12			
	16	T5-16			
	20	T5-20			
<i>L. brevis</i>	4	T6-4	3	6	18
	8	T6-8			
	12	T6-12			
	16	T6-16			
	20	T6-20			
<i>L. johnsonii</i>	4	T7-4	3	6	18
	8	T7-8			
	12	T7-12			
	16	T7-16			
	20	T7-20			
<i>L. plantarum</i>	4	T8-4	3	6	18
	8	T8-8			
	12	T8-12			
	16	T8-16			
	20	T8-20			
<b>TOTAL</b>					<b>144</b>

Realizado por: Ponce, B. 2021

## 2.4. Mediciones experimentales

- Ph
- Ácido láctico (%)
- Viabilidad (%)
- Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)
- Color

## 2.5. Análisis estadísticos y pruebas de significancia

Los datos obtenidos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

Análisis de Varianza (ADEVA), con una significancia al 5% ( $p > 0,05$ )

Separación de medias según Tukey, con una significancia al 5% ( $p > 0,05$ )

En la tabla 3-2 se indica el esquema del ADEVA

**Tabla 3-2:** Esquema de la ADEVA

Fuentes de Varianza	Grados de Libertad
CEPAS	7
HORAS	5
CEPAS*HORAS	35
Error	96
Total	143

Realizado por: Ponce, B. 2021

### 2.5.1. Procedimiento Experimental

Previo al ensayo se realizó la limpieza del laboratorio, materiales y equipos, posterior a esto se efectuó el descongelamiento de las cepas de lactobacillus para llevar a cabo la elaboración del preparado microbiano. De cada cepa se prepararon 1000ml de preparado microbiano en proporción 33% solución madre, 45% agua, 20 melaza, 1% urea y 1% sales minerales. Después de la elaboración de los preparados microbianos se caracterizó cada uno de ellos.

### 2.5.2. Metodología de Evaluación

#### 2.5.2.1. pH

La determinación de pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valores con variaciones máximas de  $\pm 0,05$  unidades de pH. La resolución del instrumento deberá

ser de por lo menos 0,01 unidades de pH. Las mediciones se realizan a  $25 \pm 2$  °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente (Villareal, 2012, p. 2).

#### 2.5.2.2. *Ácido láctico*

La acidez se mide por titulación y corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio utilizado para neutralizar los grupos ácidos. Este valor puede expresarse de diversas maneras: en “grados Dornic” (°D) que corresponde al volumen de solución de hidróxido de sodio N/9 utilizada para titular 10 ml de muestra en presencia de fenolftaleína. Este resultado expresa el contenido en ácido láctico. Un grado Dornic equivale a 0,1 g/l de ácido láctico ó 0,01% o en gramos de ácido láctico por litro o por kilogramo. Si se utiliza hidróxido de sodio N/9 con 10 ml de muestra , el volumen de reactivo en ml da directamente el resultado (Negri, 2005, p. 155).

#### 2.5.2.3. *Viabilidad*

Culturas en estacionaria fase (108 a 109 UFC / ml) se obtuvieron después de 20 a 24 h de incubación (OD 600nm 1.1 a 1.2). Se determinó la resistencia a la bilis por medio de dos métodos diferentes: Se determinaron los recuentos viables extraído en agar TPY en presencia (TPY – bilis) y ausencia (TPY) de bilis de buey colocando diluciones apropiadas hechas en 0.1% triptona. Las placas se incubaron durante 72 ha 37 ° C en condiciones anaeróbicas. Los experimentos se realizaron por duplicado y solo se consideraron placas con 30 a 300 colonias. La proporción de bilis bacterias resistentes se calculó de la siguiente manera:  $R\%[(UFC / ml) TPY - bilis100] / (UFC / ml) TPY$  (Kociubinski, et al., 1999, p. 907).

#### 2.5.2.4. *UFC/ml*

El recuento con cuentacolonia puede ser contada toda la placa o por cuadrantes, finalizado el tiempo de incubación se realiza el recuento, se toman en cuenta únicamente aquellas cajas Petri que tengan entre 30 y 300 colonias. Este número de colonias es estadísticamente representativo. Aquellas placas que tengan más de 300 colonias se reportan como incontables (Izurieta 2011, p. 11).

#### 2.5.2.5. *Color*

Las técnicas colorimétricas se basan en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En principio todos los sistemas que cuantifican el color a partir de tres variables poseen aspectos colorimétricos: Luminancia, Longitud y Pureza. Esta técnica suministra información cualitativa y cuantitativa sobre sustancias en disolución, el colorímetro en un

instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática a través de una muestra líquida y medir la intensidad del haz luminoso emergente (Aparicio, 2017, p. 19).

### **2.5.3. Metodología**

#### *2.5.3.1. Fase de Laboratorio*

Se trabajó con ocho cepas de *Lactobacillus* procedentes del tracto digestivo del cerdo; *Lactobacillus fermentarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*.

#### *2.5.3.2. Descongelamiento de las cepas*

Las cepas de *Lactobacillus* se encontraron conservadas en glicerol al 30% en un crió congelador de nitrógeno líquido a temperatura inferior de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Su descongelación duro aproximadamente 40 minutos a temperatura ambiente.

#### *2.5.3.3. Nutrición de las cepas*

Una vez descongeladas las cepas se las nutre en caldo MRS por 18 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ , de esta manera la viabilidad de las cepas se garantiza en el preparado microbiano.

#### *2.5.3.4. Concentración de bacterias*

Para medir la concentración de las bacterias se utilizó el método de conteo de colonias en caja petri, con la utilización del equipo cuentacolonia.

Para el conteo se siembran volúmenes conocidos de cada dilución, luego se incubó a  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 o 48 horas, finalizado el tiempo de incubación se realiza el recuento. Se toma en cuenta únicamente aquellas cajas Petri que tengan entre 30 y 300 colonias.

#### *2.5.3.5. Formulación del preparado microbiano*

- Se seleccionó un tubo ependor de cada una de las bacterias conservada.
- Se realizó una siembra de cada cepa en Agar MRS, con Ph 5.3, a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

- Se tomó un raspado de cada caja petri y se inoculó en el medio de cultivo Caldo MRS, para obtener una solución madre del preparado microbiano y se lo colocó en condiciones anaerobias a 28°C por 48 horas.
- Para la activación de preparado microbiano se tomó una muestra de 10 ml de la solución madre con una pipeta para inocularlo en una solución de agua más melaza (proporción 50/50).
- Se preparó el sustrato para el preparado microbiano; agua 45%, melaza 20%, sales minerales 1%, urea 1% y solución madre 33%.

## 2.6. pH

La determinación de pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valores con variaciones máximas de  $\pm 0,05$  unidades de pH. La resolución del instrumento deberá ser de por lo menos 0,01 unidades de pH. Las mediciones se realizan a  $25 \pm 2$  °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. (Villareal, 2012, p. 2)

La determinación del pH se realizó con el pH-metro, en cada uno del medio de cultivo de melaza, el cual se sumergía el electrodo en el biopreparado por un periodo de tiempo de 1 minuto y la herramienta de medición producía resultados cuantificables de forma digital. Las mediciones de pH se las realizo cada 4 horas en un periodo de 24 horas (Ponce, 2021).

## 2.7. Ácido láctico

La acidez se mide por titulación y corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio utilizado para neutralizar los grupos ácidos. Este valor puede expresarse de diversas maneras: en “grados Dornic” (°D) que corresponde al volumen de solución de hidróxido de sodio N/9 utilizada para titular 10 ml de muestra en presencia de fenolftaleína. Este resultado expresa el contenido en ácido láctico. Un grado Dornic equivale a 0,1 g/l de ácido láctico ó 0,01% o en gramos de ácido láctico por litro o por kilogramo. Si se utiliza hidróxido de sodio N/9 con 10 ml de leche, el volumen de reactivo en ml da directamente el resultado (Negri, 2005, p. 155).

Para la determinación de acidez titulable del medio de cultivo se procede a llenar una bureta con solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0,1N. Por otro lado, se toman 10mL de muestra del medio de cultivo a evaluar en un matraz Erlenmeyer y se adicionan 4 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador. Para la titulación se adiciona gota a gota la solución de NaOH, esto a la vez de estar agitando lentamente el Erlenmeyer. La titulación se da por terminada cuando en la muestra persista un color rosa-tenue.

## 2.8. Viabilidad

Se inoculó el 5 % del concentrado celular ajustado en caldo MRS con y sin 0,3 % de sales biliares (Bacto-Oxgall, Difco ®, EUA). Todas las variantes se incubaron a 37 °C y se midió el crecimiento celular (D.O.λ560nm) mediante un espectrofotómetro, a intervalos de dos horas, hasta las 24 horas de incubación. Una bacteria se considera resistente a las sales biliares cuando presenta D.O.λ560 nm  $\geq 0,3$  después de 3h de incubación en presencia de 0,3 % de sales biliares. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia según lo descrito por Kociubinski et al. Dónde:  $R = (\text{Log UFC/ml CSB } 0,3\%) / (\text{Log UFC/ml MRS}) \times 100$ , a las tres horas de tratamiento. Las cepas se clasificaron como resistentes por encima del 68 % (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9 % (T) y sensibles por debajo de 33,9 % (Vera-Mejia et al. 2018).

## 2.9. UFC

Cuando la carga bacteriana es alta se toma en cuenta un cuadrante con carga alta, un cuadrante con carga media y un cuadrante con carga baja, se realiza la sumatoria de los tres cuadrantes y se saca el promedio, finalmente el promedio se multiplica por 65 (Izurieta, 2011, p. 15).

$$\text{No. Colonias} = (\text{CA} + \text{CM} + \text{CB} / 3) * 65$$

## 2.10. Color

Las técnicas colorimétricas se basan en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En principio todos los sistemas que cuantifican el color a partir de tres variables poseen aspectos colorimétricos: Luminancia, Longitud y Pureza. Esta técnica suministra información cualitativa y cuantitativa sobre sustancias en disolución, el colorímetro en un instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática a través de una muestra líquida y medir la intensidad del haz luminoso emergente (Aparicio, 2017, p. 19).

Para determinar la diferencia total de color entre las coordenadas, se debe usar la siguiente fórmula:

$$\Delta E^* = (\Delta L^*2 + \Delta a^*2 + \Delta b^*2)^{1/2}$$

Es importante destacar que delta E, sólo indica la magnitud de la diferencia total de color pero no indica cuán correcta es. (MINOLTA 2020, p. 4)

## CAPÍTULO III

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

#### 3.1. Identificación de los aislamientos bacterianos

Una vez seleccionadas las colonias se confirmó mediante la tinción de Gram la morfología y características de las bacterias lácticas, obteniendo los siguientes resultados que observamos en la tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Pruebas morfológicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*

Género	Forma	Tamaño	Color	Superficie	Tinción	Agrupación
<i>L. fermentarum</i>	Bacilo	0,5 mm	Crema	Liza	Positivo	Cadena
<i>L. delbrueckii</i>	Bacilo	1 mm	Blanca	Cóncava	Positivo	Cadena
<i>L. reuteri</i>	Bacilo	2 – 3 mm	Crema	Liza	Positivo	Cadena
<i>L. casei</i>	Bacilo	2 – 3 mm	Crema	Cóncava	Positivo	Cadena
<i>L. acidiphilus</i>	Bacilo	4 – 5 mm	Blanca	Cóncava	Positivo	Cadena
<i>L. brevis</i>	Bacilo	2 mm	Blanca	Cóncava	Positivo	Cadena
<i>L. johnsonii</i>	Bacilo	5 mm	Blanca	Cóncava	Positivo	Cadena
<i>L. plantarum</i>	Bacilo	0,1 mm	Crema	Cóncava	Positivo	Cadena

Realizado por: Ponce, 2021.

(Aparicio, 2016, p. 44) menciona que esta tinción nos permite examinar y diferenciar con exactitud, mediante los diversos colorantes y el microscopio, las bacterias Gram negativas de las Gram positivas. La clave de esta tinción está en la capa de peptidoglicano que poseen las bacterias en su pared, ya que en las bacterias Gram positivas es más gruesa, lo que permite al añadir el cristal violeta, que se quede dentro y le dé la tonalidad azul/morado, al contrario que las bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglicano es más delgada, y al añadir alcohol arrastra consigo el colorante que no ha conseguido adherirse a la pared. Por lo que para distinguir las bacterias Gram positivas (las cuales están ya teñidas) de las Gram negativas (están sin teñir) se les añade Safranina para teñir las bacterias Gram negativas de color rojo y sea más fácil localizarlas en el microscopio, y contrastarlas con las positivas. De esta forma también se puede diferenciar la morfología que presentan las bacterias (bacilos, cocobacilos y cocos), la misma que se describe en la tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Pruebas Bioquímicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*

Género	Catalasa	Oxidasa	Peróxido K	Bilis de Buey
<i>L. fermentarum</i>	Negativo	Negativo	Negativo	83.30%
<i>L. delbrueckii</i>	Negativo	Negativo	Negativo	74.55%
<i>L. reuteri</i>	Negativo	Negativo	Negativo	65.77%
<i>L. casei</i>	Negativo	Negativo	Negativo	86.70%
<i>L. acidiphilus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	57.04%
<i>L. brevis</i>	Negativo	Negativo	Negativo	77.00%
<i>L. johnsonii</i>	Negativo	Negativo	Negativo	71.83%
<i>L. plantarum</i>	Negativo	Negativo	Negativo	64.43%

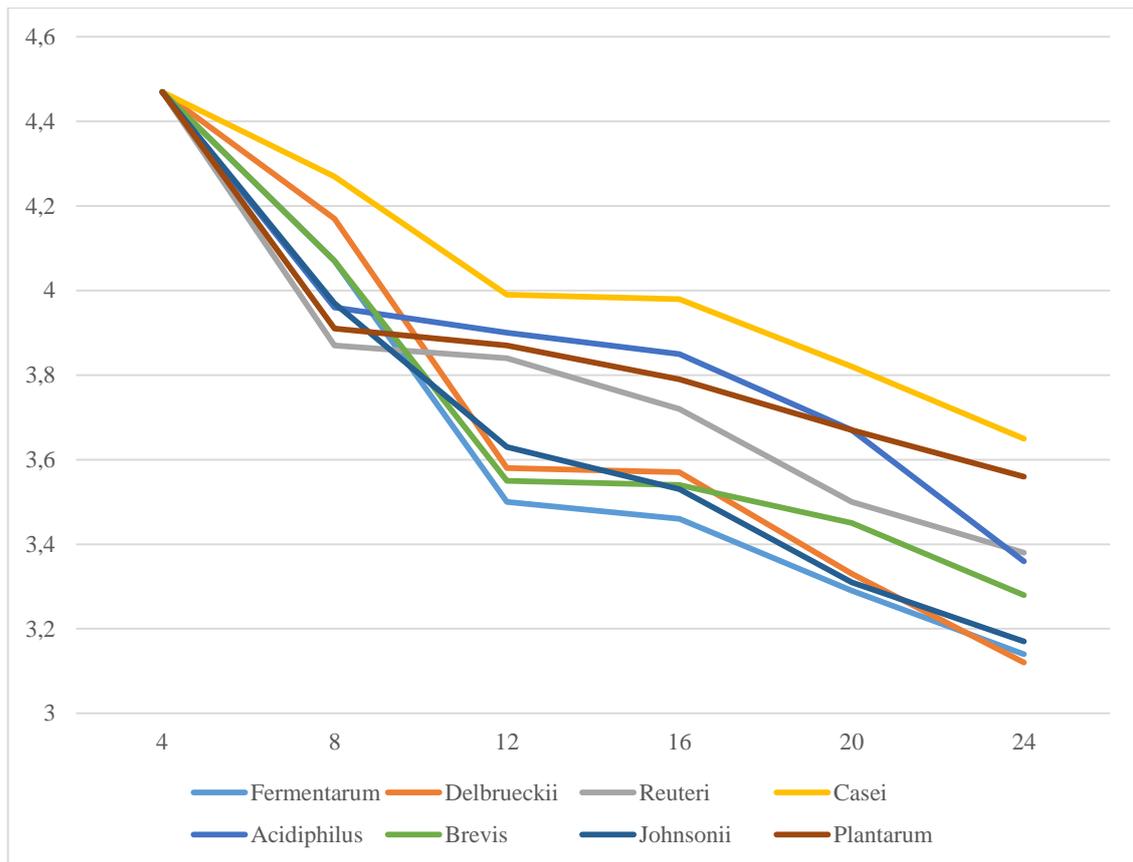
Realizado por: Ponce, B. 2021

### 3.2. PH

El pH durante las 24 horas de evaluación tuvo diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ), es así que al inicio tubo una media de 4,7, la reducción de pH es notable a partir de las 8 horas, el mayor descenso de pH se registró a las 24 horas con un valor de 3,1 en las cepas *L. delbrueckii*, *L. fermentarum* y *L. johnsonii*, como se detalla en el gráfico 1-3.

(Noboa, 2015, p. 44), en su investigación, el pH durante las 96 horas de evaluación tuvo notables cambios, es así que al inicio tuvo una media de 6,30, para las primeras 24 horas tuvo un descenso a 5,54, a las 48 horas se registró el mayor descenso de pH a 4,08, para las 72 hora siguiente disminuyo a 3,92, y para las 96 horas se registró el pH más bajo que fue de 3,90.

Según un estudio realizado por (Sánchez, et al., 2015, p. 96), en cepas de *Lactobacillus* spp., con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos se demostró que todos los aislados crecieron satisfactoriamente en todas las condiciones evaluadas; donde se reportaron rendimientos de células viables de pH comprendidos en un rango entre 6,4 a 2,5, y se observa que a un pH ácido el crecimiento bacteriano es apreciable. El descenso del pH guarda una estrecha relación con la producción de ácido láctico por parte de las BAL, demostrado en su incremento notable de ácido láctico al inicio y su cantidad total a las 96 horas.

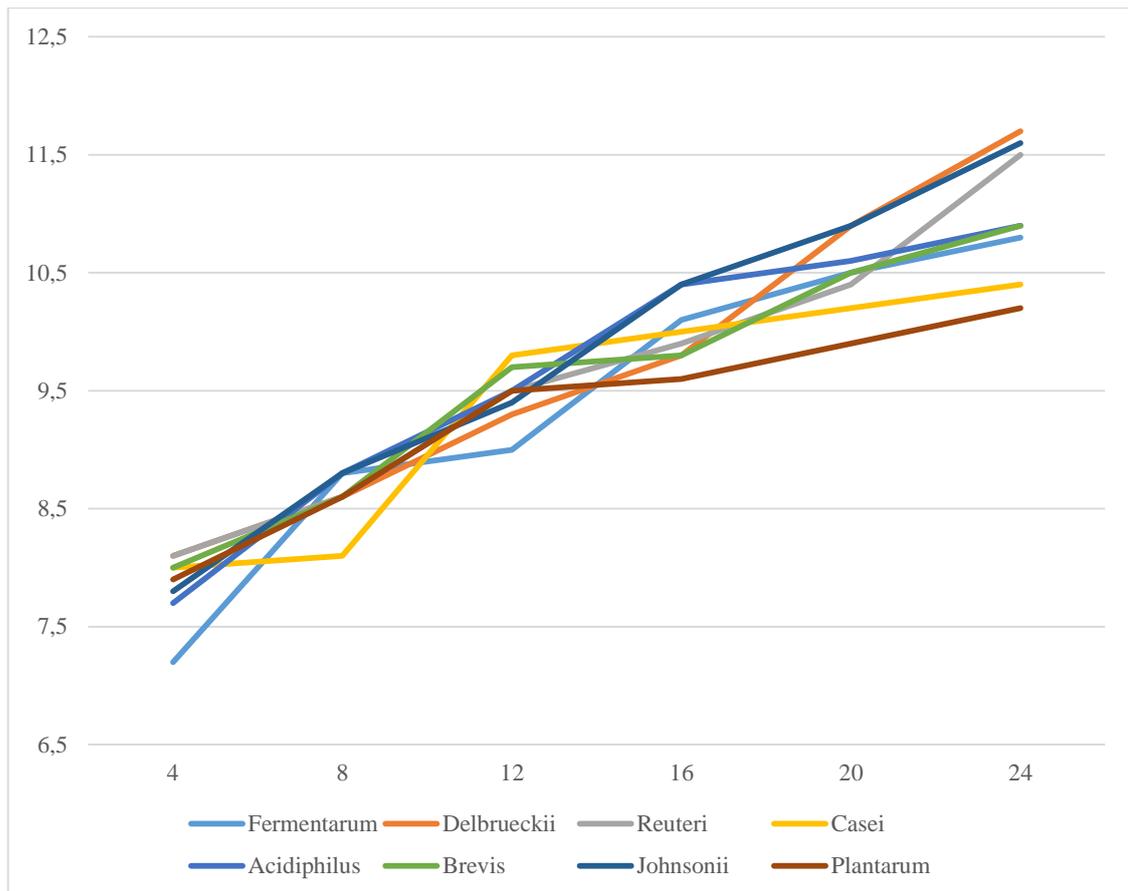


**Gráfico 1-3:** Evaluación del pH de cada Preparado Microbiano a partir de Lactobacillus, durante diferentes periodos de tiempo.  
 Realizado por: Ponce, 2021.

### 3.3. Ácido láctico, %

En el ácido láctico de los preparados microbianos, se registraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ), mostrando un aumento de ácido láctico a las 24 horas con un valor de 11,5 en las cepas *L. reuteri* y *L. johnsonii* y un valor de 11,7 en la cepa *L. delbrueckii*, como se demuestra en el gráfico 2-3.

(Rondón, et al., 2009, p. 167), en su investigación reporta que a medida que la concentración de ácido aumenta, se observa la disminución del pH del medio, con valores muy bajos entre 4,0 y 3,7 a las 24 h. Los medios de cultivo mostraron una alta producción de ácido en el MCLs, similar a los resultados que se obtienen en el medio MRS. A las 24 h en medio MRS con un pH 4 y  $16 \text{ gL}^{-1}$  (%) ácido láctico y en medio MCLs con pH 3,7 y  $15 \text{ gL}^{-1}$  (%).

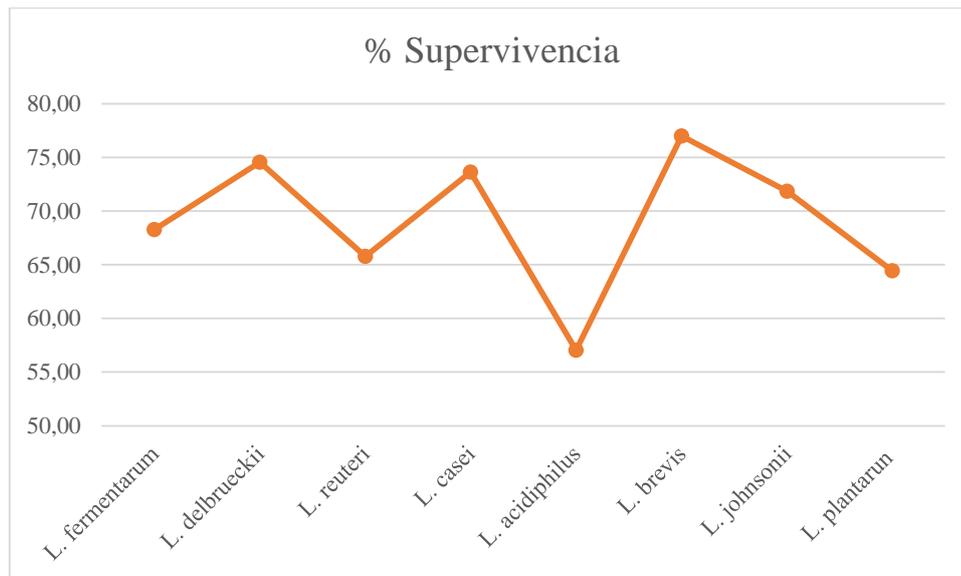


**Gráfico 2-3:** Ácidos lácticos de los preparados microbianos a diferentes horas.  
Realizado por: Ponce, B. 2021

### 3.4. Viabilidad

En viabilidad los preparados microbianos cumplen con el % de supervivencia para cumplir las condiciones que necesita cualquier bacteria ácido láctica al realizar el paso por el tracto digestivo del cerdo, mostrando un % mayor de supervivencia en la cepa *L. brevis* con un valor de 77,00% y el menor valor en la cepa *L. acidiphilus* con un valor de 57,04%, como se observa en el gráfico 3-3.

(Sánchez, et al., 2015, p. 102), al realizar el tratamiento con jugo gástrico artificial a las cepas seleccionadas hasta los 90 minutos de tratamiento, 6 cepas de 10 fueron capaces de resistir en la medida que transcurrió el tiempo. Se observó reducción del crecimiento 2,2 – 2,9 log en las cepas sin tratamiento y posteriormente crecidas en el medio MRS. Se encontraron porcentos de sobrevivencias para las cepas M1 41,41%; M2 62,71%; M5 74,69; 67,06, M8 40,56% Y M10 73,01%.



**Gráfico 3-3:** % de supervivencia de cada cepa en bilis de buey deshidratada al 0,3%

Realizado por: Ponce, B. 2021

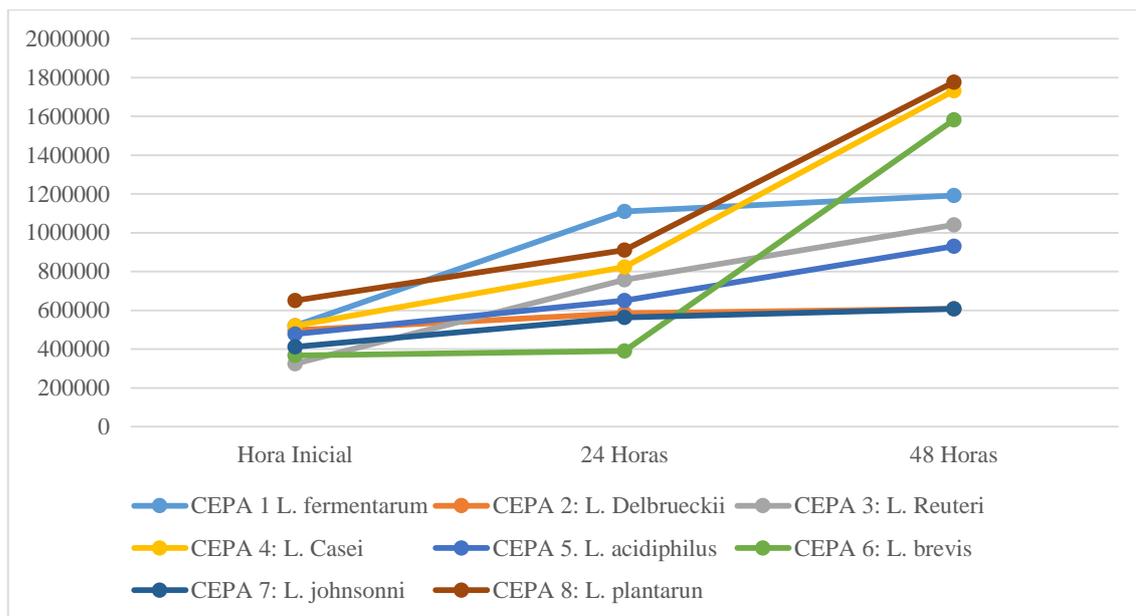
### 3.5. UFC/ ml

En las unidades formadoras de colonias de los preparados microbianos, se registraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ), mostrando el mayor número de ufc en la cepa *L. plantarum* con un valor de 1777 ufc/ml ( $1,777 \times 10^6$ ), como observamos en el gráfico 4-3.

(Borrás, et al., 2017, p. 13), en su investigación el preparado microbiano presenta una población final de  $99 \times 10^6$  UFC/ ml de BAL a las 48h, lo cual expresa un potencial inoculante probiótico.

(Noboa, 2015, p. 47) en su investigación presento una gran variación desde el inicio hasta el final de la evaluación, es así que a la hora 0 se determinaron  $1,63 \times 10^5$  UFC/ml, para las siguientes 24 horas hubo un incremento a  $7,68 \times 10^5$  UFC/ml, a las 48 horas se observó  $13,84 \times 10^5$  UFC/ml, el mayor incremento se dio a las 72 horas  $916 \times 10^5$  UFC/ml y las 96 horas se obtuvo una disminución de la población total a  $270 \times 10^5$  UFC/ml como se muestra.

La FAO/OMS (2001) define probiótico como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”. Esta cantidad varía de un país a otro en función de su legislación; sin embargo, generalmente un producto probiótico debería contener  $>10^6 - 10^8$  CFU/g ó  $> 10^8 - 10^{10}$  UFC/dosis de células viables (Díaz Ferrer et al. 2012).



**Gráfico 4-3:** Conteo de ufc/ml de los preparados microbianos a distintas horas.  
**Realizado por:** Ponce, B. 2021

### 3.6. Color

En la cuantificación del color, se midió la longitud de onda que puede percibir el ojo humano, con la utilización del colorímetro se determinó;

L: colores fríos

a: colores en oposición al círculo cromático

b: define un tinte que no puede ser aclarado con otro tinte.

Cuantificación del color se describe en la Tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Cuantificación de color

		HORA 0	24 HORAS	48 HORAS
1	L	20.43	22.78	16,73
	A	4.42	0.01	1,44
	B	6.20	1,27	2,41
2	L	19,65	22,69	19,65
	A	2,82	0,01	2,68
	B	4,3	0,28	4,32
3	L	16,68	23,84	15,61
	A	0,84	0,01	0,42
	B	1,22	0,13	0,83
4	L	29,62	22,76	23,25
	A	4,33	0,04	3,73
	B	9,86	0,56	8,76

5	L	19,95	19,89	17,42
	A	3,2	0,26	1,09
	B	5,14	0,45	2,42
6	L	22,11	24,05	19,22
	A	3,52	0	1,57
	B	6,1	0,03	3,67
7	L	20,62	24,77	17,38
	A	3,77	0,11	1,76
	B	6,27	0,09	3,34
8	L	17,04	18,41	16,99
	A	0,46	0,13	0,15
	B	1,11	0,09	0,59

Realizado por: Ponce, B. 2021

Para determinar la diferencia total de color entre las tres coordenadas, se aplicó la ecuación para calcular Delta E a los valores  $L^*a^*b^*$ . Con la ecuación de diferencia de color se pudo determinar la diferencia total de color entre cada preparado microbiano a diferentes horas. Los valores numéricos positivos + = más luminoso y los valores negativos - = más oscuro.

Se determino la diferencia de color del preparado a base de *L. fermentarum* registrando una diferencia numérica de -11,19 en relación de las 24 horas a la hora 0, de igual forma una diferencia numérica de -16,62 en relación de las 48 horas con las 24 horas, percibiendo un aumento de color oscuro.

El segundo preparado a base de *L. delbrueckii* registro una diferencia numérica de -7,14 a las 24 horas con relación a la hora 0, la diferencia de color a la hora 48 en relación con las 24 horas, registro una diferencia numérica de 7,10, percibiendo que esté preparado microbiano sufrió un cambio de color oscuro a luminoso por la reacción de las bacterias.

El preparado microbiano a base de *L. reuteri* registro una diferencia de color con un valor numérico de 24,69 en relación de las 24 horas con la hora 0, así mismo se obtuvo una diferencia numérica de -33,53, percibiendo un cambio de color luminoso a color oscuro.

El cuarto preparado a base de *L. casei* registro una diferencia de color con un valor numérico de -75,97 en relación de las 24 horas a la hora 0, de igual forma se determinó la diferencia de color en relación de las 48 horas con la hora 24, registrando un valor numérico de 40,54, percibiendo un notable cambio de color oscuro a color luminoso por reacción de las bacterias.

El preparado microbiano a base de *L. acidophilus* registró valores numérico de -15,32 en la diferencia de color en relación de las 24 horas con la hora 0, así mismo se determinó la diferencia de color de las 48 horas en relación de las 24 horas con un valor numérico de -0,76, percibiendo descenso en la intensidad de color oscuro.

El sexto preparado a base de *L. brevis* registro una diferencia de color en relación de las 24 horas con la hora 0 de -22,73, de igual manera se determinó la diferencia de color a las 48 horas con relación a las 24 horas, con un valor numérico de -3,8, percibiendo un descenso de la intensidad del color oscuro por reacción de las bacterias.

El preparado microbiano a base de *L. johnsonii* registro una diferencia de color de -17,18, a las 24 horas con relación a la hora 0, de igual forma se determinó la diferencia de color a las 48 horas en relación de las 24 horas, registrando un valor numérico de -20,66, percibiendo un mínimo aumento de intensidad del color oscuro.

Finalmente, el preparado microbiano a base de *L. plantarum* registro un valor numérico de 0,36 en la diferencia de color a las 24 horas con relación a la hora 0, así mismo la diferencia de color de las 48 horas con relación a las 24 horas registro un valor numérico de - 0,88, percibiendo un cambio de color luminoso a color oscuro por reacción de las bacterias en el medio.

## CONCLUSIONES

1. Para la elaboración de los preparados microbianos se utilizaron componentes nacionales (45% agua, 33% cultivo bacteriano, 1% ureas, 1% sales minerales y 20% melaza), que aporten el crecimiento de los *Lactobacillus* presentes en cada preparado.
2. De los ocho preparados microbianos, cinco cumplieron con las características para ser utilizados como posibles probióticos en la alimentación de los cerdos al simular in vitro el paso de las cepas por el tracto digestivo del cerdo cumpliendo con el porcentaje de supervivencia, además cumpliendo con la concentración de unidades formadoras de colonias establecidas como potencial probiótico, estos preparados microbianos que cumplieron las características para ser utilizados como posibles probióticos fueron a base de *L. fermentarum*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. brevis* y *L. plantarum*.
3. Los tres preparados microbianos que no cumplieron las características para ser utilizados como posibles probióticos, se debe a que necesitan mejores condiciones ambientales para desarrollarse que las que se ofrecieron con el preparado microbiano.
4. En colorimetría aún si dos colores parecen los mismos a una persona, podemos encontrar diferencias minúsculas cuando las evaluamos con un instrumento de medición de color, puesto que puede detectar diferencias no visibles para el ojo humano, mostrando esas diferencias de forma numérica.

## **RECOMENDACIONES**

- 1.** El presente estudio se desarrolló en laboratorio, por lo cual utilizar cada preparado microbiano in vivo en la alimentación de lechones en etapa post destete, para evaluar un incremento en la flora intestinal de los mismos.
- 2.** Replicar la presente investigación en otras especies de interés zootécnico, para determinar la existencia de microorganismos con capacidad probiótica que se puedan utilizar en la alimentación de dichas especies.

## BIBLIOGRAFÍA

**AGUAVIL, J.,** *Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a L. acidophilus y B. subtilis sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler Ross-308 en santo domingo de los Tsáchilas.* , pp. 103.

**APARICIO, E.,** *Visión criminológica-criminalística. Técnicas colorimétricas.* [en línea], vol. 5, no. 18, pp. 18-23. Disponible en:[http://revista.cleu.edu.mx/new/descargas/1703/articulos/Articulo08\\_Tecnicas\\_colorimetricas.pdf](http://revista.cleu.edu.mx/new/descargas/1703/articulos/Articulo08_Tecnicas_colorimetricas.pdf).

**APARICIO, G.M.,** *Aislamiento bacterias lácticas de alimentos lácteos: producción de bacteriocinas.* Facultad de Ciencias Experimentales [en línea], pp. 44. Disponible en: [https://www.google.es/search?source=hp&ei=n3CVWtPaKYH6zgKalbDIAw&q=produccion+de+bacteriocinas&oq=produccion+de+bacteriocinas&gs\\_l=psy-ab.3..0j0i22i](https://www.google.es/search?source=hp&ei=n3CVWtPaKYH6zgKalbDIAw&q=produccion+de+bacteriocinas&oq=produccion+de+bacteriocinas&gs_l=psy-ab.3..0j0i22i).

**BERNET, M.F., BRASSART, D., NEESER, J.R. & SERVIN, A.L.,** *Applied and Environmental Microbiology*, Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. vol. 59, no. 12, pp. 4121-4128. ISSN 00992240. DOI 10.1128/aem.59.12.4121-4128.1993.

**BEZKOROVAINY, A.,** Probióticos: determinantes de la supervivencia y el crecimiento en el intestino. 2001, pp. 73.

**BORRÁS-SANDOVAL, L.M., VALIÑO-CABRERA, E.C. & RODRÍGUEZ-MOLANO, C.E.,** *Ciencia y Agricultura*, Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal. vol. 14, no. 1, pp. 7-13. ISSN 0122-8420. DOI 10.19053/01228420.v14.n1.2017.6083.

**CIAP, Sitio Porcino,** Sistema digestivo porcino. [en línea], pp. 1-2. Disponible en: [http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/Sistema digestivo porcino.pdf](http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/Sistema%20digestivo%20porcino.pdf).

**DEROUCHEY, J.,** *Ciap*, Sistema digestivo: anatomía y funciones. [en línea], no. Ilustración 1, pp. 1-2. Disponible en: <http://www.elsitioporcino.com/>.

**DIAZ FERRER, J., PARRA, V., BENDAÑO, T., MONTES, P. & SOLORZANO, P.,** *Revista de gastroenterología del Perú: órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú,* [Probiotic supplement (Lactobacillus acidophilus and bulgaricus) utility in the treatment of

irritable bowel syndrome]. vol. 32, no. 4, pp. 387-393. ISSN 1609722X.

**FAO, E. & OMS, E.,** *Estudios FAO alimentación y nutrición*, Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. [en línea], vol. 85, pp. 52. ISSN1014-2916. Disponible en: <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIO - TICOS OPS 2006.pdf>.

**FONTALVO, J.L.,** *Manual de practicas de laboratorio de Microbiología*, Preparación De Medios De Cultivos. pp. 23-28. DOI 10.2307/j.ctt1zk0mfb.6.

**GIRALDO, J., NARVÁEZ, W. & DÍAZ, E.,** *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, Probiotics in Swine : Contradictory Results. [en línea], vol. 14, no. 2, pp. 143-150. ISSN 00040592. DOI 10.17151/biosa.2015.14.1.9. Disponible en: [http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/ProduccionOvina/images/Razas\\_produccion\\_lana\\_y\\_o\\_carne.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/ProduccionOvina/images/Razas_produccion_lana_y_o_carne.pdf) <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR32226.pdf> <http://www.paccperu.org.pe/publicaciones/pdf/147.pdf> <http://revistasinvestigacion.>

**GUALPA CANDO, E.G. & RUBIO RUBIO, D.A.,** *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad*, Universidad técnica de cotopaxi. [en línea], vol. 1, pp. 101. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>.

**GUTIÉRREZ RAMÍREZ, L.A., MONTOYA, O.I. & VÉLEZ ZEA, J.M.,** *Producción + Limpia*, Probiotics: an alternative for cleaner production and a possible replacement of the antibiotics as growth promoters in animal feeding. vol. 8, no. 1, pp. 135-146.

**GUTIÉRREZ, S.,** *Organización Panamericana de Salud*. Laboratorio De Microbiología Preparación De Medios De Cultivo. [en línea], vol. 1, no. 1, pp. 1-5. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_Preparación\\_de\\_medios\\_de\\_cultivo.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparación_de_medios_de_cultivo.pdf).

**IZURIETA, N.,** *Laboratorio de Bacteriología y Micología*. Slideshare [en línea]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-4-recuento-bacteriano-7723447>.

**KOCIUBINSKI, G., PÉREZ, P. & DE ANTONI, G.,** *Journal of Food Protection*, Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. vol. 62, no. 8, pp. 905-912. ISSN 0362028X. DOI 10.4315/0362-028X-62.8.905.

**MINOLTA, K.**, Entendiendo el Espacio de Color CIE L\*A\*B. [en línea]. Disponible en: <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>.

**MOLINA, A.**, *Agronomy Mesoamerican*, Probiotics and their mechanism of action in animal feed. vol. 30, no. 2, pp. 601-611. ISSN 22153608. DOI 10.15517/am.v30i2.34432.

**NEGRI, L.**, *Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad*. El pH y la acidez de la leche. [en línea], vol. 2, pp. 155-161. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>.

**NOBOA, T.**, *Caracterización Fermentativa, Bioquímica Y Microbiológica*. De Un Preparado Microbiano Nativo Con Potencial Uso En Animales Domésticos. S.l.: s.n.

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**, *Guías Mundiales de la WGO Probióticos y prebióticos*. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. [en línea], pp. 29. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-spanish>.

**PARRA HUERTAS, R.**, *Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, vol. 8, no. 1, pp. 93-105. ISSN 1909-9959.

**QUILES SOTILLO, A.**, Características de la flora intestinal del lechón: efecto de los probióticos. *Ediporc*, no. 102, pp. 19-27. ISSN 1698-305X.

**RONDÓN, A.J., FERNÁNDEZ, L.M.S. & SALABARRÍA, R.B.**, Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. , pp. 167 p.

**SALAZAR, B. & MONTOYA C., O.**, *Vitae*, Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. vol. 10, no. 2, pp. 20-26. ISSN 0121-4004.

**SÁNCHEZ, L., OMURA, M., LUCAS, A., PÉREZ, T., LLANES, M. & FERREIRA, C.**, *Revista de Salud Animal*, Cepas de Lactobacillus spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. vol. 37, no. 2, pp. 94-104. ISSN 0253-570X.

**SHAH, N.P.**, *Food Technology*, Funcional foods from probiotics and prebiotics. pp. 46-52.

**SUÁREZ-MACHÍN, C. & GUEVARA-RODRÍGUEZ, C.A.,** *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. Revisión bibliográfica. vol. 51, no. 2, pp. 21-30. ISSN 0138-6204.

**TUOMOLA, E., CRITTENDER, R., PLAYNE, M., ISOULAU, E. & S.S.,** *Supplement to the American Journal of Clinical Nutrition*. Criterios de garantía de calidad para bacterias probióticas. S.l.: s.n., pp. 73.

**VEGA, R.,** Uso de antibióticos y coadyuvantes del crecimiento animal y su repercusión en el ser humano. , pp. 19.

**VERA-MEJIA, R., ORMAZA-DONOSO, J., MUNOZ-CEDENO, J., et. al.** *Cepas de Lactobacillus plantarum con potencialidades probióticas aisladas de cerdos Criollos* Lactobacillus plantarum strains with probiotic potentials isolated from Creole pigs.. [en línea], vol. 40, no. 2, pp. unpaginated. ISSN 0253-570X. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2018000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es).

**VILLAREAL, E.,** *Electrodos De Medida Y De Referencia*, Determinacion de pH. 2018

## ANEXOS

### ANEXO A: TOMA DE MUESTRAS



Ilustración 2. Faenamiento y disección de los cerdos



Ilustración 1. Separación de duodeno, yeyuno e íleon



Ilustración 4. Pesaje de muestra 10g.

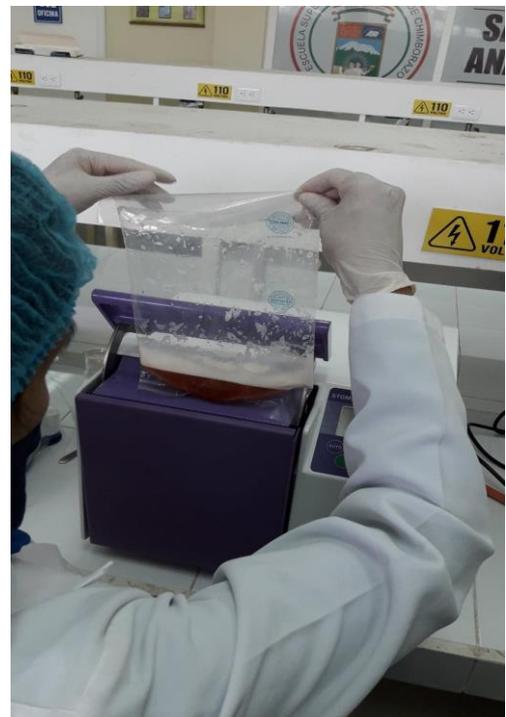


Ilustración 3. Homogenización de las muestras con el equipo Estomacher.

## ANEXO B: SIEMBRA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO



Ilustración 5. Disminución de pH del agar MRS con ácido clorhídrico



Ilustración 6. Diluciones de las muestras;  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$



Ilustración 8. Siembra a doble capa en Agar MRS.



Ilustración 7. Dar las condiciones ambientales para las bacterias anaerobias.

## ANEXO C: PURIFICACIÓN DE COLONIAS



Ilustración 9. Identificar diferentes colonias por su forma, color y textura.



Ilustración 10. Nutrir a las bacterias en caldo MRS por 18h antes de la siembra



Ilustración 11. División de las cajas petri en cuadrantes e identificación de cada una.

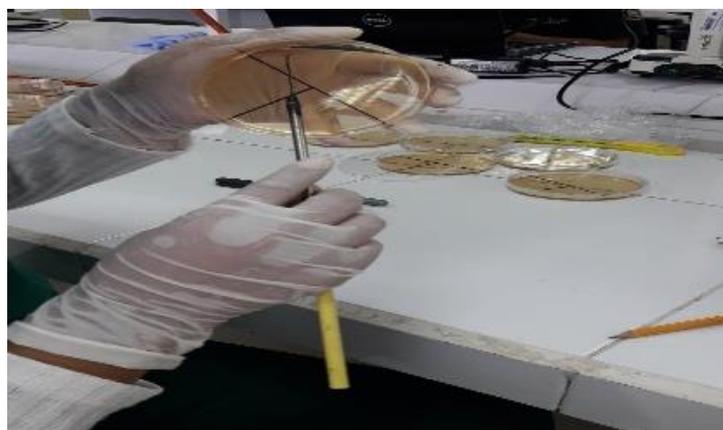


Ilustración 12. Siembra en estrías de cada colonia.

## ANEXO D: IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

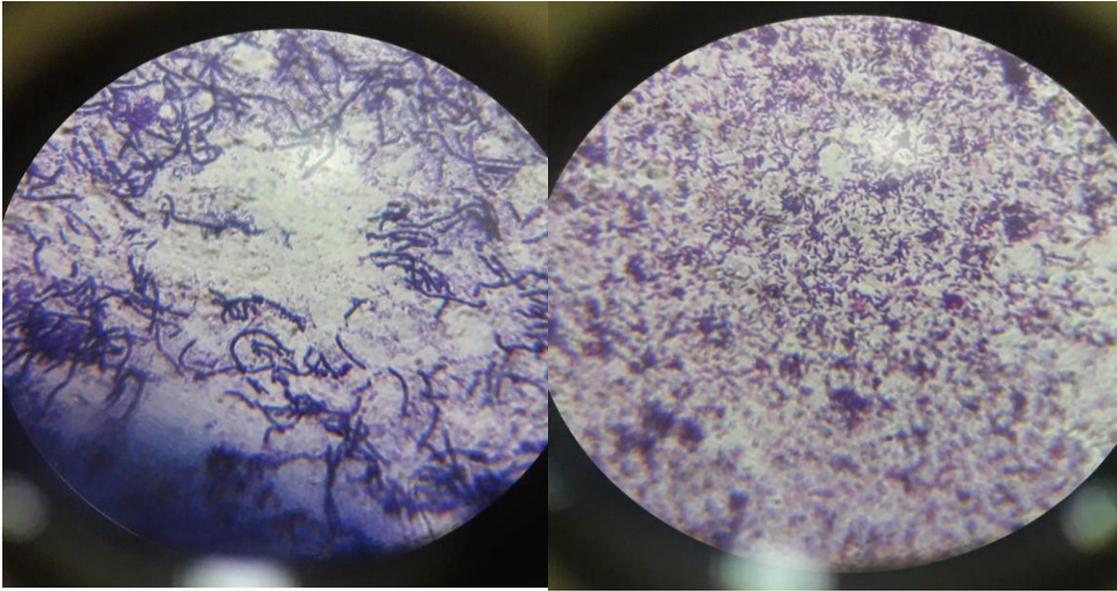


Ilustración 13. Tinción de gram



Ilustración 14. Pruebas Bioquímicas Catalasa y Oxidasa.

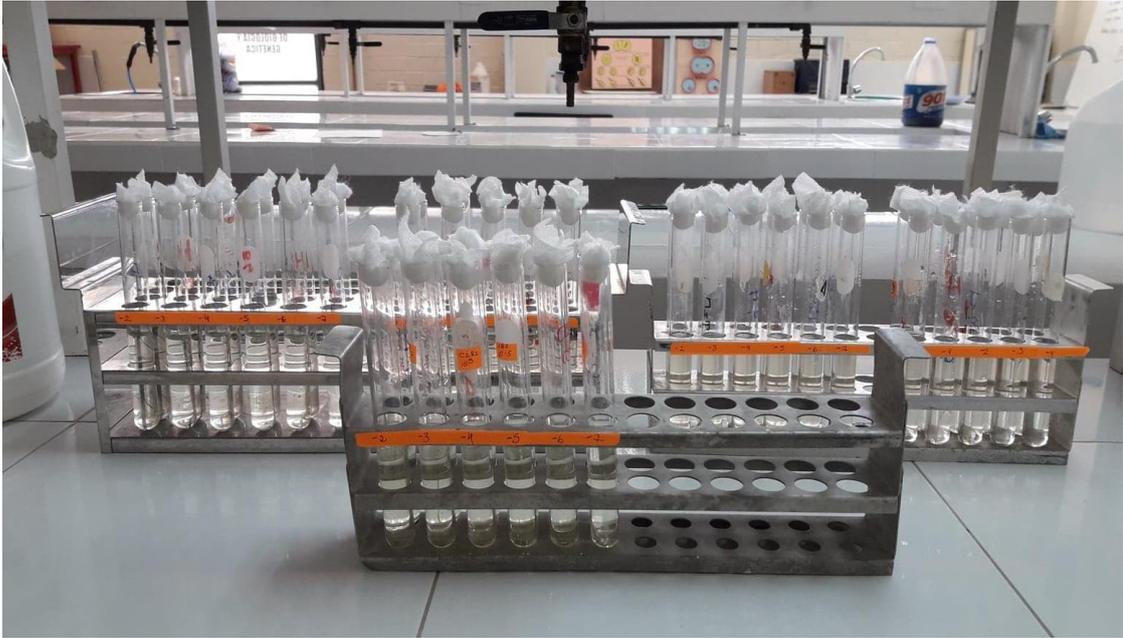


Ilustración 15. Pruebas de Viabilidad de Bilis de Buey deshidrata



Ilustración 16. Identificación de ocho cepas de Lactobacillus con propiedad probiótica

## ANEXO E: CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

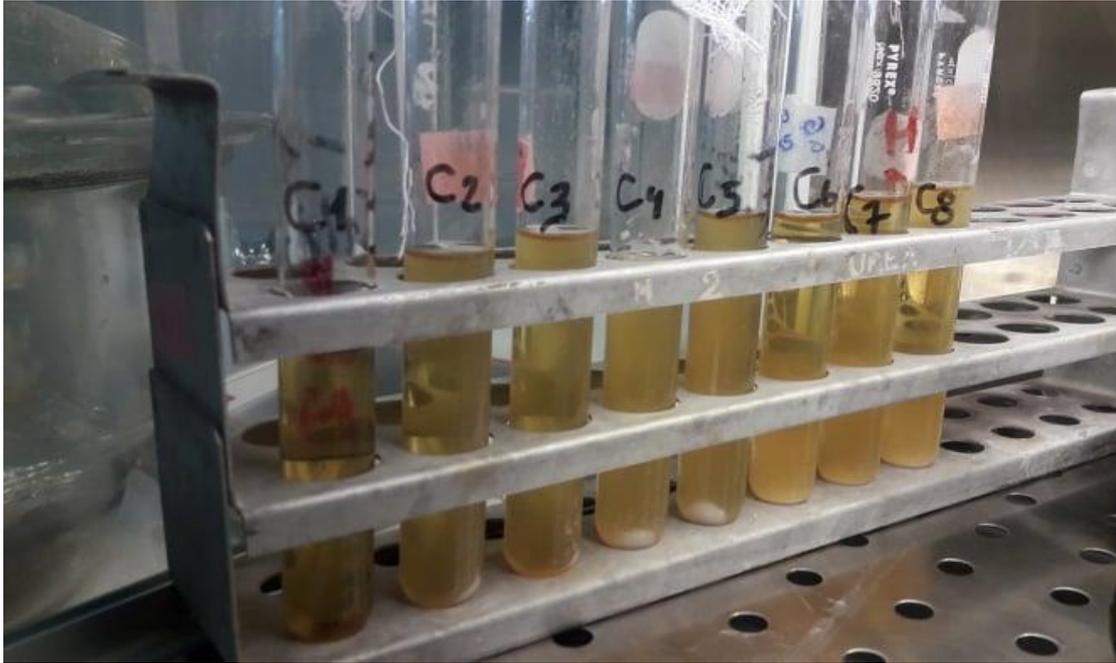


Ilustración 17. Nutrición de las ocho cepas en caldo MRS



Ilustración 18. Cepa 1 *Lactobacillus fermentarum*



Ilustración 19. cepa 2\_lactobacillus delbrueckii

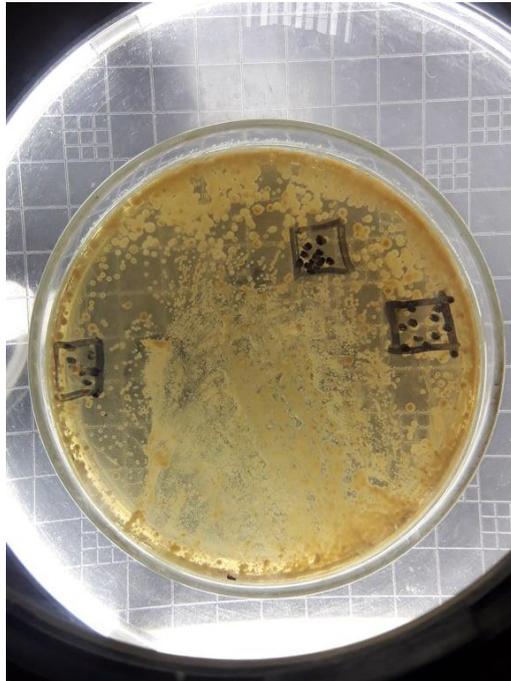


Ilustración 20. Cepa 3\_lactobacillus reuteri

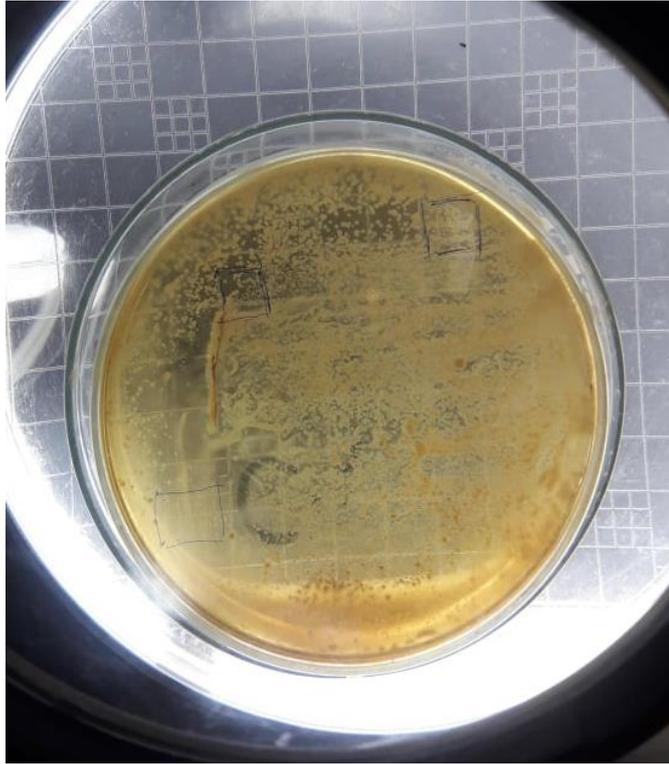


Ilustración 21. Cepa 4\_lactobacillus casei

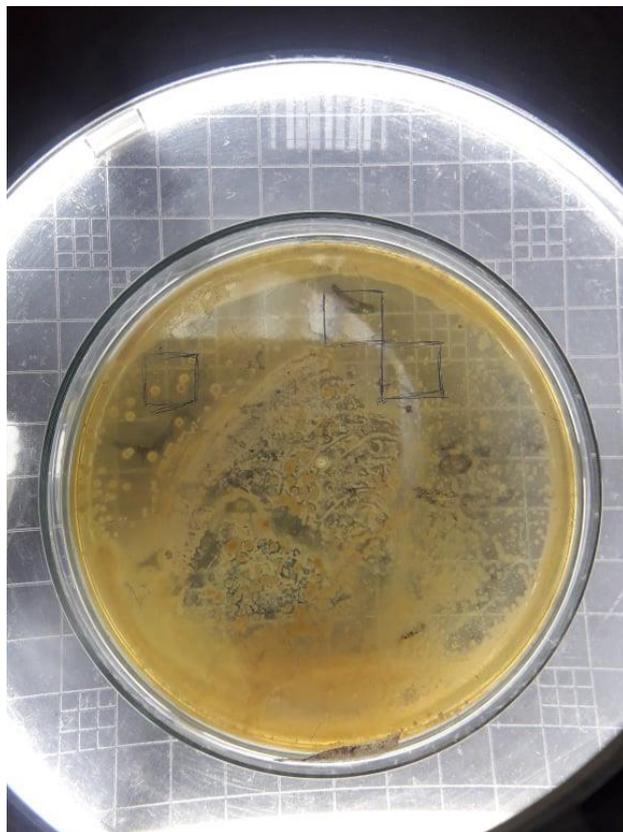


Ilustración 22. Cepa 5\_lactobacillus acidophilus

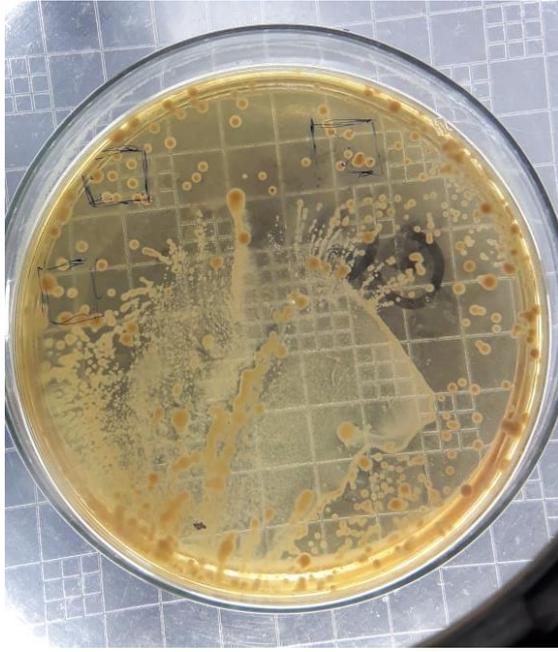


Ilustración 23. Cepa 6\_lactobacillus brevis

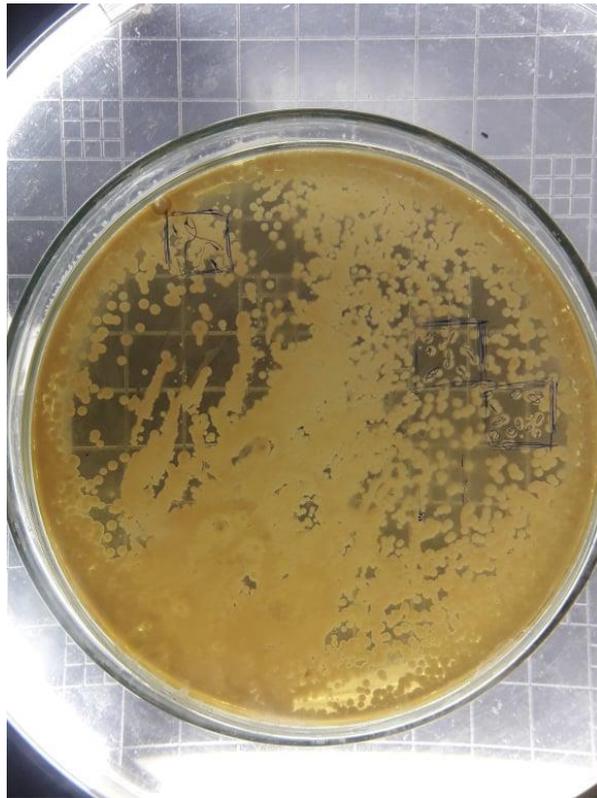


Ilustración 24. Cepa 7\_lactobacillus johnsonii

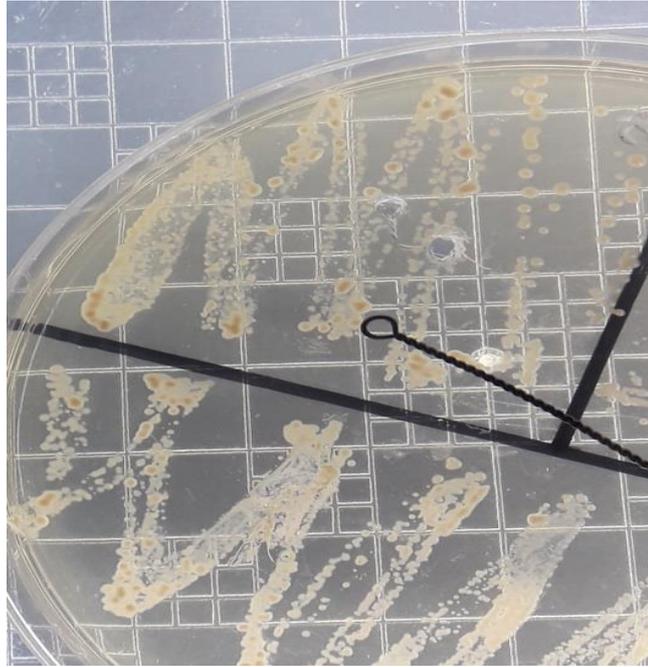


Ilustración 25. Cepa 8\_lactobacillus plantarun

## ANEXO F: CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS



Ilustración 26. Selección de una colonia de cada cepa



Ilustración 28. Conservación de bacterias en glicerol al 30%



Ilustración 27. Conservación en Nitrógeno Líquido

## ANEXO G: FORMULACIÓN DEL PREPARADO MICROBIANO



Ilustración 29. Sustrato de cada cepa 330ml

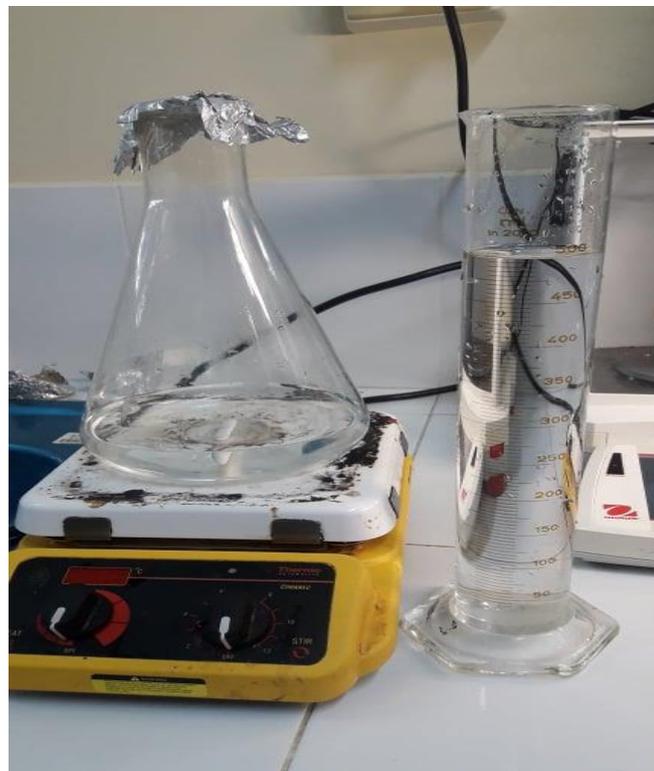


Ilustración 30. Agua 550ml



Ilustración 31. Melaza 100ml

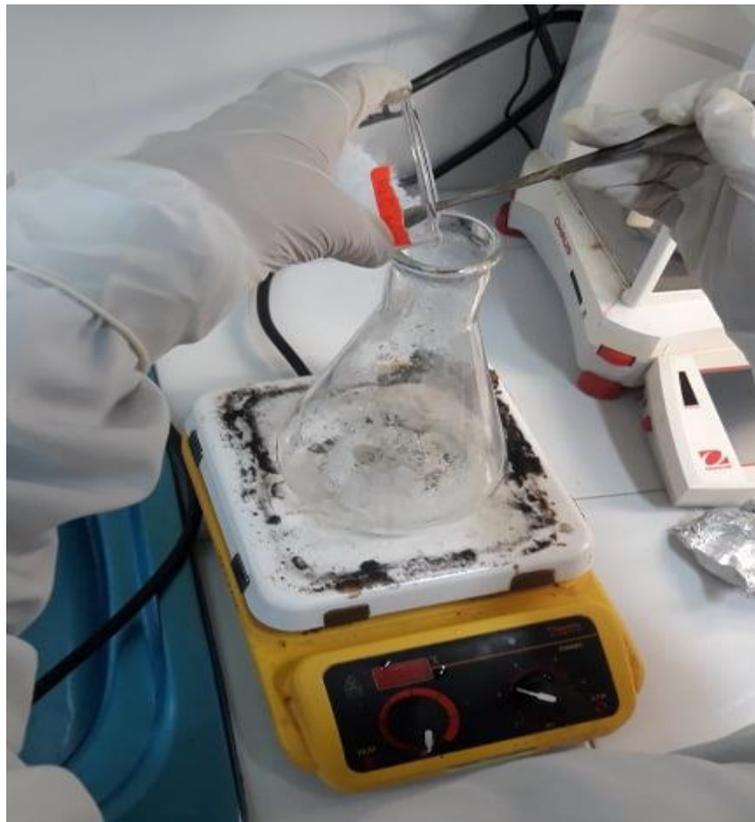


Ilustración 32. Urea 10 gr.



Ilustración 33. Sal Mineral 10 gr.

## ANEXO H: DETERMINACIÓN DE pH y ÁCIDO LÁCTICO



Ilustración 34. Toma de pH de cada muestra cada 4 horas (24 horas)



Ilustración 35. Ácido Láctico

## ANEXO I: DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN BACTERIANA



Ilustración 36. Determinación de color (Colorímetro)

## ANEXO J: CONCENTRACIÓN UFC/ML



Ilustración 37. Conteo de UFC/ml con la utilización del equipo cuenta colonias.

## ANEXO K: PRUEBA DE VIABILIDAD



Ilustración 38. Prueba Bioquímica de Bilis de Buey deshidratada.

**ANEXO L: ANÁLISIS DE VARIANZA – PH**

F.V.	SC	Gl	CM	F	P – valor
CEPAS	2,04	7	0,29	115,39	< 0,0001
HORAS	19,88	5	3,98	1574,12	< 0,0001
CEPAS*HORAS	1,43	35	0,04	16,19	< 0,0001
Error	0,24	96	2,5E -03		
Total	23,59	143			

**ANEXO M: SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – PH**

CEPAS	HORAS	Medias	n	E.E.	
Delbrueckii	24	3,13	3	0,03	A
Fermentarium	24	3,14	3	0,03	A
Johnsonii	24	3,17	3	0,03	A B
Brevis	24	3,28	3	0,03	ABC
Fermentarium	20	3,29	3	0,03	ABC
Johsonii	20	3,31	3	0,03	BCD
Delbrueckii	20	3,33	3	0,03	BCD
Acidiphilus	24	3,36	3	0,03	CDE
Reuteri	24	3,38	3	0,03	CDEF
Brevis	20	3,45	3	0,03	CDEFG
Fermentarium	16	3,46	3	0,03	DEFG
Fermentarium	12	3,50	3	0,03	EFGH
Reuteri	20	3,50	3	0,03	EFGH
Johnsonii	16	3,53	3	0,03	FGHI
Brevis	16	3,54	3	0,03	FGHI
Brevis	12	3,55	3	0,03	GHIJ
Plantarum	24	3,56	3	0,03	GHIJ
Delbrueckii	16	3,57	3	0,03	GHIJ
Delbrueckii	12	3,58	3	0,03	GHIJ
Johnsonii	12	3,63	3	0,03	HIJK
Casei	24	3,65	3	0,03	HIJK
Plantarun	20	3,67	3	0,03	HIJKL
Acidiphilus	20	3,67	3	0,03	IJKL
Reuteri	16	3,72	3	0,03	JKLM
Plantarun	16	3,79	3	0,03	KLMN
Casei	20	3,82	3	0,03	LMNO
Reuteri	12	3,84	3	0,03	MNOP
Acidiphilus	16	3,85	3	0,03	MNOP
Reuteri	8	3,87	3	0,03	MNOP
Plantarun	12	3,87	3	0,03	MNOP
Acidiphilus	12	3,90	3	0,03	NOPQ
Plantarun	8	3,91	3	0,03	NOPQ
Acidiphilus	8	3,96	3	0,03	NOPQ
Johnsonii	8	3,97	3	0,03	OPQ
Casei	16	3,98	3	0,03	OPQ
Casei	12	3,99	3	0,03	PQ
Brevis	8	4,07	3	0,03	OPQ
Fermentarium	8	4,07	3	0,03	PQ
Delbrueckii	8	4,17	3	0,03	QR
Casei	8	4,27	3	0,03	QR

Brevis	4	4,47	3	0,03	RS
Acidiphilus	4	4,47	3	0,03	S
Reuteri	4	4,47	3	0,03	T
Delbrueckii	4	4,47	3	0,03	T
Fermentarium	4	4,47	3	0,03	T
Plantarum	4	4,47	3	0,03	T
Johnsonii	4	4,47	3	0,03	T
Casei	4	4,47	3	0,03	T

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### ANEXO N: ANÁLISIS DE VARIANZA – ÁCIDO LÁCTICO

F.V.	SC	gl	CM	F	P - valor
CEPAS	4,41	7	0,63	32,21	< 0,0001
HORAS	165,03	5	33,01	1686,34	< 0,0001
CEPAS*HORAS	10,81	35	0,31	15,77	< 0,0001
Error	1,88	96	0,02		
Total	182,13	143			

#### ANEXO Ñ: SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – ÁCIDO LÁCTICO

CEPAS	HORAS	Medias	n	E.E.	
Fermentarium	4	7,20	3	0,08	A
Acidiphilus	4	7,70	3	0,08	B
Johnsonii	4	7,80	3	0,08	B
Plantarum	4	7,90	3	0,08	BC
Brevis	4	7,99	3	0,08	BC
Casei	4	8,00	3	0,08	BC
Delbrueckii	4	8,10	3	0,08	BC
Casei	8	8,10	3	0,08	BC
Reuteri	4	8,34	3	0,08	CD
Reuteri	8	8,59	3	0,08	DE
Plantarum	8	8,59	3	0,08	DE
Brevis	8	8,60	3	0,08	DE
Delbrueckii	8	8,60	3	0,08	DE
Acidiphilus	8	8,79	3	0,08	DE
Johnsonii	8	8,79	3	0,08	DE
Fermentarium	8	8,79	3	0,08	DE
Fermentarium	12	9,03	3	0,08	EF
Delbrueckii	12	9,29	3	0,08	FG
Johnsonii	12	9,39	3	0,08	FGH
Plantarum	12	9,49	3	0,08	FGHI
Reuteri	12	9,50	3	0,08	GHI
Acidiphilus	12	9,50	3	0,08	GHI
Plantarum	16	9,60	3	0,08	GHIJ
Brevis	12	9,71	3	0,08	GHIJK
Casei	12	9,77	3	0,08	HJKLM
Brevis	16	9,79	3	0,08	HJKLM
Delbrueckii	16	9,81	3	0,08	HJKLM
Plantarum	20	9,89	3	0,08	IJKL
Reuteri	16	9,90	3	0,08	IJKL
Casei	16	9,99	3	0,08	JKLM

Fermentarum	16	10,11	3	0,08	KLMN
Casei	20	10,20	3	0,08	LMNO
Plantarum	24	10,21	3	0,08	LMNO
Johnsonii	16	10,39	3	0,08	MNOP
Acidiphilus	16	10,40	3	0,08	MNOP
Casei	24	10,40	3	0,08	MNOP
Reuteri	20	10,41	3	0,08	MNOP
Brevis	20	10,49	3	0,08	NOPQ
Fermentarum	20	10,51	3	0,08	NOPQ
Acidiphilus	20	10,61	3	0,08	OPQ
Fermentarum	24	10,81	3	0,08	PQ
Acidiphilus	24	10,89	3	0,08	Q
Delbrueckii	20	10,89	3	0,08	Q
Brevis	24	10,90	3	0,08	Q
Johnsonii	20	10,91	3	0,08	Q
Reuteri	24	11,50	3	0,08	R
Johsonii	24	11,59	3	0,08	R
Delbrueckii	24	11,72	3	0,08	R

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### ANEXO O: ANÁLISIS DE VARIANZA - VIABILIDAD POR PRUEBA DE BILIS 0,03%

variable	UFCN0	UFCN1
Media	1048,5	728,125
Varianza	24589,4286	22881,2679
Observaciones	8	8
Coeficiente de correlación de Pearson	0,92123976	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	14,7638151	
P(T<=t) una cola	7,8277E-07	**
Valor crítico de t (una cola)	1,89457861	
P(T<=t) dos colas	1,5655E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2,36462425	

#### ANEXO P: ANÁLISIS DE VARIANZA – UFC en 1ml

F.V.	SC	gl	CM	F	P – valor
CEPAS	2890125,50	7	412875,07	5110,37	< 0,0001
HORAS	6251281,75	2	3125640,88	38687,66	< 0,0001
CEPAS*HORAS	3100848,25	14	221489,16	2741,49	< 0,0001
Error	3878,00	48	80,79		
Total	12246133,50	71			

#### ANEXO Q: SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY – UFC en 1ml

CEPAS	HORAS	Medias	N	E.E.	
Reuteri	0	325,00	3	5,19	A
Brevis	0	368,00	3	5,19	B
Brevis	24	390,00	3	5,19	BC
Johnsonii	0	412,00	3	5,19	C

Acidiphilus	0	477,00	3	5,19	D
Delbrueckii	0	498,00	3	5,19	DE
Fermentarium	0	520,00	3	5,19	E
Casei	0	520,00	3	5,19	E
Johnsonii	24	563,00	3	5,19	F
Delbrueckii	24	585,00	3	5,19	FG
Delbrueckii	48	604,00	3	5,19	G
Johnsonii	48	607,00	3	5,19	G
Acidiphilus	24	650,00	3	5,19	H
Plantarum	0	653,00	3	5,19	H
Reuteri	24	758,00	3	5,19	I
Casei	24	823,00	3	5,19	J
Plantarum	24	910,00	3	5,19	K
Acidiphilus	48	931,00	3	5,19	K
Reuteri	48	1041,00	3	5,19	L
Fermentarium	24	1111,00	3	5,19	M
Fermentarium	48	1192,00	3	5,19	N
Brevis	48	1582,00	3	5,19	O
Casei	48	1733,00	3	5,19	P
Plantarum	48	1777,00	3	5,19	Q

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### ANEXO R: CUANTIFICACIÓN DEL COLOR

		HORA 0	24 HORAS	48 HORAS
1	L	20,43	22,78	16,73
	A	4,42	0,01	1,44
	B	6,20	1,27	2,41
2	L	19,65	22,69	19,65
	A	2,82	0,01	2,68
	B	4,3	0,28	4,32
3	L	16,68	23,84	15,61
	A	0,84	0,01	0,42
	B	1,22	0,13	0,83
4	L	29,62	22,76	23,25
	A	4,33	0,04	3,73
	B	9,86	0,56	8,76
5	L	19,95	19,89	17,42
	A	3,2	0,26	1,09
	B	5,14	0,45	2,42
6	L	22,11	24,05	19,22
	A	3,52	0	1,57
	B	6,1	0,03	3,67
7	L	20,62	24,77	17,38
	A	3,77	0,11	1,76
	B	6,27	0,09	3,34
8	L	17,04	18,41	16,99
	A	0,46	0,13	0,15
	B	1,11	0,09	0,59

**ANEXO S: REPORTE DE RESULTADOS DEL LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.**



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
**HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**



**HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS**

**1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

PARÁMETROS	
CÓDIGO	TGC
NOMBRE DE LA MUESTRA	<i>Lactobacillus</i>
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	21 de enero del 2021
FECHA DE FINALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	28 de abril del 2021
ANÁLISIS SOLICITADO	Determinación de pH, ácido láctico, viabilidad, UFC y Colorimetría
TESISTA	MARÍA BELÉN PONCE CHUTO

**2.- RESULTADOS**

• **ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

**Tablas. N°1.- Ph de los preparados microbianos**

1. Fermentarum

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,47	4,45	4,49	4,47
8	4,1	4,08	4,03	4,07
12	3,3	3,8	3,4	3,5
16	3,48	3,42	3,47	3,46
20	3,3	3,27	3,29	3,29
24	3,11	3,16	3,14	3,14



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



2. Delbrueckii

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,49	4,47	4,45	4,47
8	4,18	4,19	4,15	4,17
12	3,6	3,54	3,59	3,58
16	3,6	3,57	3,55	3,57
20	3,3	3,33	3,35	3,33
24	3,09	3,14	3,15	3,13

3. Reuteri

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,48	4,47	4,46	4,47
8	3,83	3,9	3,87	3,87
12	3,85	3,86	3,82	3,84
16	3,69	3,72	3,75	3,72
20	3,53	3,48	3,5	3,50
24	3,35	3,4	3,39	3,38

4. Casei

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,47	4,47	4,48	4,47
8	4,23	4,28	4,3	4,27
12	3,89	3,98	4,1	3,99
16	3,98	4	3,95	3,98
20	3,8	3,84	3,82	3,82
24	3,63	3,67	3,65	3,65



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



5. Acidiphilus

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,45	4,48	4,47	4,4667
8	3,95	3,93	3,99	3,957
12	3,9	3,92	3,89	3,90
16	3,9	3,85	3,8	3,85
20	3,64	3,68	3,7	3,673
24	3,36	3,33	3,38	3,3567

6. Brevis

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,42	4,48	4,5	4,467
8	4,06	4,05	4,1	4,07
12	3,5	3,59	3,57	3,553
16	3,57	3,53	3,51	3,537
20	3,4	3,49	3,45	3,447
24	3,29	3,25	3,3	3,28

7. Johnsonii

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,49	4,5	4,42	4,47
8	3,99	3,97	3,94	3,9667
12	3,66	3,6	3,62	3,6267
16	3,52	3,55	3,51	3,527
20	3,32	3,29	3,33	3,313
24	3,19	3,11	3,2	3,167



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



8. Plantarum

HORAS	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
4	4,5	4,49	4,42	4,47
8	3,91	3,89	3,92	3,907
12	3,84	3,89	3,87	3,867
16	3,77	3,79	3,81	3,79
20	3,67	3,64	3,69	3,667
24	3,53	3,56	3,6	3,563

Tablas. N<sup>o</sup>2.- ácido láctico de los preparados microbianos

1. Fermentarum

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	7,2	7,23	7,16
8	8,73	8,77	8,88
12	9,54	8,28	9,26
16	10,04	10,21	10,07
20	10,47	10,56	10,5
24	10,5	10,73	10,8

2. Delbrueckii

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	8,13	8,1	8,06
8	8,62	8,64	8,55
12	9,35	9,19	9,32
16	9,83	9,8	9,74
20	10,3	10,9	10,96
24	11,53	11,77	11,81



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



3. Reuteri

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	8,12	8,1	8,8
8	8,5	8,67	8,6
12	9,52	9,54	9,45
16	9,82	9,9	9,98
20	10,49	10,34	10,4
24	11,4	11,57	11,53

4. Casei

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	8	8	8,01
8	8,02	8,12	8,16
12	9,55	9,76	10
16	10	10,05	9,93
20	10,15	10,25	10,2
24	10,34	10,46	10,4

5. Acidiphilus

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	7,67	7,72	7,7
8	8,77	8,73	8,87
12	9,5	9,55	9,46
16	10,54	10,4	10,26
20	10,51	10,63	10,69
24	10,9	10,8	10,96



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



6. Brevis

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	7,91	8,02	8,05
8	8,58	8,56	8,66
12	9,56	9,81	9,75
16	9,88	9,77	9,72
20	10,35	10,62	10,5
24	10,93	10,8	10,97

7. Johnsonii

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	7,83	7,85	7,17
8	8,84	8,8	8,73
12	9,48	9,32	9,37
16	10,37	10,46	10,34
20	10,93	10,83	10,97
24	11,67	11,38	11,71

8. Plantarum

HORAS	REPETICIONES		
	1	2	3
4	7,95	7,94	7,81
8	8,6	8,56	8,62
12	9,43	9,55	9,5
16	9,55	9,6	9,65
20	9,9	9,82	9,95
24	10,11	10,2	10,31



Tablas. N°3 *Conteo de UFC/ml de los preparados microbianos*

1. Hora inicial

CEPAS	1	2	3	PROMEDIO	0,1ml UFC	EXPON.
Fermentarium	520	555	485	520	520C00	5.2 x 10 <sup>5</sup>
Delbrueckii	498	457	499	498	498C00	4.98 x 10 <sup>5</sup>
Reuteri	325	330	320	325	325C00	3.25 x 10 <sup>5</sup>
Casei	520	529	511	520	520C00	5.2 x 10 <sup>5</sup>
Acidiphilus	477	479	475	477	477C00	4.77 x 10 <sup>5</sup>
Brevis	358	375	361	368	368C00	3.68 x 10 <sup>5</sup>
Johnsonii	412	420	404	412	412C00	4.12 x 10 <sup>5</sup>
Plantarum	650	654	655	653	653C00	6.5 x 10 <sup>5</sup>

2. 24 horas

# COLONIAS	1	2	3	PROMEDIO	0,1 ml UFC	EXPON.
Fermentarium	1110	1107	1116	1111	1111C00	1.11 x 10 <sup>6</sup>
Delbrueckii	585	586	584	585	585C00	5.85 x 10 <sup>5</sup>
Reuteri	758	754	762	758	758C00	7.58 x 10 <sup>5</sup>
Casei	823	827	819	823	823C00	8.23 x 10 <sup>5</sup>
Acidiphilus	650	648	652	650	650C00	6.5 x 10 <sup>5</sup>
Brevis	390	386	394	390	390C00	3.9 x 10 <sup>5</sup>
Johnsonii	563	568	558	563	563C00	5.63 x 10 <sup>5</sup>
Plantarum	910	905	915	910	910C00	9.1 x 10 <sup>5</sup>

3. 48 horas

# COLONIAS	1	2	3	PROMEDIO	0,1 ml UFC	EXPON.
Fermentarium	1192	1185	1199	1192	1192C00	1.192 x 10 <sup>6</sup>
Delbrueckii	607	558	607	604	604C00	6.07 x 10 <sup>5</sup>
Reuteri	1040	1045	1038	1041	1041C00	1.04 x 10 <sup>6</sup>
Casei	1733	1739	1727	1733	1733C00	1.733 x 10 <sup>6</sup>
Acidiphilus	931	942	920	931	931C00	9.31 x 10 <sup>5</sup>
Brevis	1582	1585	1579	1582	1582C00	1.582 x 10 <sup>6</sup>
Johnsonii	607	605	609	607	607C00	6.07 x 10 <sup>5</sup>
Plantarum	1777	1757	1787	1777	1777C00	1.777 x 10 <sup>6</sup>



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



Tabla. N°4 Prueba de Viabilidad – bilis de buey 0,3%

# cepa	UFCN0	UFCN1	% Supervivencia
Fermentarium	1110	758	68,29
Delbrueckii	1061	791	74,55
Reuteri	1148	755	65,77
Casei	1301	958	73,64
Acidiphilus	931	531	57,04
Brevis	1126	867	77,00
Johnsonii	845	607	71,83
Plantarum	866	558	64,43

# cepa	% Supervivencia
Fermentarium	68,29
Delbrueckii	74,55
Reuteri	65,77
Casei	85,47
Acidiphilus	57,04
Brevis	77,00
Johnsonii	71,83
Plantarum	64,43



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



Tabla. N°5. Determinación de colorimetría

		HORA 0	24 HORAS	48 HORAS
1	L	20,43	22,78	16,73
	a	4,42	0,01	1,44
	b	6,20	1,27	2,41
2	L	19,65	22,69	19,65
	a	2,82	0,01	2,68
	b	4,3	0,28	4,32
3	L	16,68	23,84	15,61
	a	0,84	0,01	0,42
	b	1,22	0,13	0,83
4	L	29,62	22,76	23,25
	a	4,33	0,04	3,73
	b	9,86	0,56	8,76
5	L	19,95	19,89	17,42
	a	3,2	0,26	1,09
	b	5,14	0,45	2,42
6	L	22,11	24,05	19,22
	a	3,52	0	1,57
	b	6,1	0,03	3,67
7	L	20,62	24,77	17,38
	a	3,77	0,11	1,76
	b	6,27	0,09	3,34
8	L	17,04	18,41	16,99
	a	0,46	0,13	0,15
	b	1,11	0,09	0,59

REALIZADO POR: María Belén Ponce Chuto

FUENTE: Laboratorio de Ciencias Biológicas

DIRIGIDO POR: Ing. Luis Tello Flores.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HOJA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



**ATENTAMENTE.**

Firmado digitalmente por  
LUIS ANDRES  
TELLO FLORES  
Fecha: 2021.07.21  
12:27:25 -05'00'

LUIS ANDRES  
TELLO  
FLORES

**Ing. Luis Tello Flores.**

**TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. CIENCIAS BIOLÓGICAS -ESPOCH**

FECHA DE ENTREGA: 2021/07/20