



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: PECUARIA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICA
VETERINARIA**

**MODALIDAD:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
ACTIVIDAD *in-vitro* DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS
(*Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis*) PARA REDUCIR LA
COLONIZACIÓN DE *Salmonella entérica***

**AUTORA:
LILIAN ESTEFANÍA FUENTES OSORIO**

**TUTORA:
DRA. FÁTIMA GRACIELA ARTEAGA CHÁVEZ Mg. Sc.**

CALCETA, DICIEMBRE DEL 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

LILIAN ESTEFANÍA FUENTES OSORIO, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual y su reglamento.

LILIAN ESTEFANÍA FUENTES OSORIO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

DR. FÁTIMA GRACIELA ARTEAGA CHÁVEZ certifica haber tutelado el proyecto **ACTIVIDAD *in-vitro* DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS (*Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis*) PARA REDUCIR LA COLONIZACIÓN DE *Salmonella entérica***, que ha sido desarrollada por **LILIAN ESTEFANÍA FUENTES OSORIO**, previa la obtención del título de Médica Veterinaria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

DRA. FÁTIMA G. ARTEAGA CHÁVEZ, Mg. Sc.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **ACTIVIDAD *in-vitro* DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS (*Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis*) PARA REDUCIR LA COLONIZACIÓN DE *Salmonella entérica***, que ha sido propuesta, desarrollada por **LILIAN ESTEFANÍA FUENTES OSORIO**, previa la obtención del título de Médica Veterinaria de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN DE PROGRAMAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López.

Dr. Freddy A. Zambrano Zambrano, Mg. Sc. Q.F. Johnny D. Bravo Loor, MPA.

MIEMBRO

MIEMBRO

Ing. Jesús O. Muñoz Cedeño, Mg. Sc.

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a Dios por darme la vida y permitirme llegar a cumplir uno de los logros más importantes para mí.

A mis padres Lilian Osorio y Jorge Fuentes, por haberme dado los valores necesarios de ser una persona formada que hoy los llevo constantemente, sin mis queridos padres no hubiese sido posible haber llegado a cumplir esta meta, sin ellos, sin sus oraciones y apoyo incondicional lo que hoy es una realidad. A mi Hermana Elena Fuentes Osorio junto a mi cuñado Ronald Gabriel Sarmiento Martínez por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo de vida y entregada a Dios.

A mis amigos que han estado en toda circunstancia de mi vida y trayectoria estudiantil en especial a Sonia María Moreira Zambrano, ya que me brindó sus conocimientos y apoyo para poder realizar esta tesis.

Así también, quedo muy agradecida por la ayuda de los excelentes Docentes de la Escuela Superior Politécnica de Manabí “Manuel Feliz López”, por brindarme los conocimientos fundamentales para impulsarme a realizar como un buen profesional, y llegar así a conocer buenas amistades a lo largo de mi trayectoria estudiantil.

Expreso mi agradecimiento a mi Tutora y amiga la Dra. Fátima Arteaga junto al Ing. Diego Zambrano, al Dr. Edison Vélez , al Dr. José Ormaza, al Ing. Carlos Larrea y al Ing. Sergio Vélez, por su entrega sincera en cuanto a la confianza depositada en mí, por compartirme sus conocimientos y el apoyo profesional durante la realización de esta Tesis y de mi trayectoria estudiantil.

LILIAN E. FUENTES OSORIO

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a Dios, quién ha sabido guiarme por el camino del bien, brindarme la fortaleza necesaria para seguir adelante y ayudarme a enfrentar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Esta tesis está dedicada a la memoria de Diego Javier Álava Párraga y a mi abuelo Juan Fuentes Alvarado, quienes desde el cielo sé que han estado conmigo en cada momento de mi vida y sé que estarán orgullosos de uno de mis logros más importantes, siempre estarán en nuestros corazones.

A mis padres Lilian Jacqueline Osorio Terán y Jorge Antonio Fuentes Alvarado, por su apoyo, comprensión, amor y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Su tenacidad y lucha incansable los ha convertido en un gran ejemplo a seguir. Me enseñaron todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, y mi coraje para luchar por mis objetivos.

A mi hermana Elena Nataly Fuentes Osorio, a mi sobrina Romina Adriana Sarmiento Fuentes, a mi cuñado Ronald Gabriel Sarmiento Martínez, a mi abuela Luz Elena Terán Rengel y a mis tíos, por estar siempre presentes, acompañándome a cada paso de mi camino.

A mis amigos que siempre tuvieron la palabra precisa en cada momento, que confiaron en mí, me ayudaron y porque hicieron de mi etapa universitaria un trayecto lleno de vivencias que jamás olvidaré.

LILIAN E. FUENTES OSORIO

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO GENERAL.....	vii
CONTENIDO DE CUADROS.....	xi
CONTENIDO DE GRÁFICOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
PALABRAS CLAVES.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
KEY WORDS.....	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. Planteamiento y formulación del problema	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4

1.4. Hipótesis	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Probióticos.....	5
2.2. Características de los probióticos	5
2.2.1. Estabilidad en el paso por el estómago	6
2.2.2. Resistencia a las sales biliares	6
2.2.3. Capacidad de adhesión al intestino	7
2.3. Mecanismo de acción	7
2.4. Beneficio de los probióticos	8
2.4.1. Prevención de enfermedades	9
2.4.2. Efecto inmunológico	10
2.4.3. Contribución a la digestibilidad de nutrientes.....	10
2.4.4. Efecto hipocolesterolémico	10
2.4.5. Producción de vitamina	10
2.4.6. Efecto en indicadores productivos	10
2.5. <i>Lactobacillus</i>	11
2.5.1. Tipos de <i>lactobacillus</i>	11
2.6. <i>Lactobacillus brevis</i>	12
2.7. Uso de <i>lactobacillus brevis</i> como probiótico	12
2.8. <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.9. <i>Bacillus subtilis</i> como aditivo seguro.....	15

2.10. <i>Salmonella</i>	15
2.11. <i>Salmonellosis</i>	15
2.12. Espectrofotometria uv.....	16
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	17
3.1. Ubicación de la investigación.....	17
3.2. Características climáticas	17
3.3. Duración del trabajo.....	17
3.4. Factores en estudio	17
3.5. Tratamientos.....	18
3.6. Diseño experimental	18
3.7. Adeva	19
3.8. Unidad experimental.....	20
3.9. Variables en estudio	20
3.9.1. Variable independiente	20
3.9.2. Variables dependientes	20
3.10. Análisis estadístico	20
3.11. Procedimiento.....	21
3.11.1. Asepsia del área y materiales de laboratorio de biología molecular.....	21
3.11.2. Preparación de medios de cultivos para la activación de cepas <i>Lactobacillus brevis</i> (40 LP) y <i>Bacillus subtilis</i> (20 BP)	21

3.11.3. Activación de las cepas <i>Lactobacillus brevis</i> (40 LP), <i>Bacillus subtilis</i> (20 BP) y <i>Salmonella entérica</i> (ATCC13076).....	21
3.11.4. Crioconservación de las cepas <i>Lactobacillus brevis</i> (40 LP) y <i>Bacillus subtilis</i> (20BP)	22
3.11.5. Inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y la mezcla (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>) frente a <i>Salmonella entérica</i>	22
3.11.6. Determinación de la curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus brevis</i>	23
3.11.7. Supervivencia de <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en sales biliares.....	24
3.12. Visualización de resultados	25
3.12.3. Supervivencia de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> en sales biliares.....	25
CAPÍTULO IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN	26
4.1. Inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y la mezcla <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>) frente a <i>Salmonella entérica</i>	26
4.2. Determinación de la curva de crecimiento del <i>Bacillus subtilis</i> Y <i>Lactobacillus brevis</i> , mediante espectrofotometría UV	28

4.3 . Evaluación de la supervivencia de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> Y <i>Lactobacillus brevis</i> en sales biliares	29
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
5.1. Conclusiones	32
5.2. Recomendaciones	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	40

CONTENIDO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Principales probióticos.....	13
Cuadro 3.1. Características climáticas.....	18
Cuadro 3.2. Tratamientos.....	19
Cuadro 3.3. ADEVA para Halos Inhibitorios.....	20
Cuadro 3.4. ADEVA para Sales Biliares.....	21
Cuadro 4.1. Promedios de medición de halos inhibitorios mediante la técnica de Kirby-Bauer a las 24 horas de cultivación con la aplicación de diferentes métodos de infusión en cepas de <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> frente a <i>Salmonella entérica</i>	28
Cuadro 4.2. Promedios de medición de supervivencia de cepas de <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en sales biliares de 0 a 120 minutos mediante conteo de UFC.....	32

CONTENIDO DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 4.1. Tendencia de promedios de la medición de la curva de crecimiento de <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> 0 a 32 horas mediante espectrofotometría UV.....	30

RESUMEN

Se determinó la actividad *in-vitro* de microorganismos autóctonos (*Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y la mezcla de ambos) para reducir la colonización de *Salmonella entérica*. Para ello se utilizó un DCA con arreglo factorial, en la inhibición del enfrentamiento de microorganismos se utilizaron 9 tratamientos con 4 repeticiones por la técnica de Kirby-Bauer; en la supervivencia de sales biliares se utilizaron 4 tratamientos y 12 repeticiones por conteo de UFC y en el análisis de la curva de crecimiento se determinó por estadística descriptiva mediante absorbancia con un espectrofotómetro UV con longitud de onda de 560 nm y un factor de 0,9. Los microorganismos con aplicación de 3 métodos frente a *Salmonella entérica* tuvieron un crecimiento favorable a las 24 horas, obteniendo un mayor desarrollo con *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* por método de filtración. En la curva de crecimiento el *Lactobacillus brevis* tuvo un mayor desarrollo a la hora 20, con un declive de entre 24 a 32 horas, mientras que el *Bacillus subtilis* tuvo un mayor crecimiento a las 24 horas, disminuyendo su actividad a las 28 y 32 horas manteniéndose por encima del *Lactobacillus brevis*. En la supervivencia a sales biliares, no se encontró variabilidad de resultados, sin embargo, el *Lactobacillus brevis* sin sales biliares se destacó desde el minuto 30 hasta el minuto 120. Se concluye que ambos microorganismos cumplen con características físicas y biológicas que los harían candidatos idóneos para ser utilizados como probióticos en alimentación animal con fines en la producción animal.

PALABRAS CLAVES

Bacterias, prebióticos, sales biliares, halos de inhibición, curva de crecimiento.

ABSTRACT

The in-vitro activity of autochthonous microorganisms (*Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* and the mixture of both) was determined to reduce the colonization of enteric *Salmonella*. To this end, a DCA with a factorial arrangement was used, in the inhibition of the confrontation of microorganisms, 9 treatments were used with 4 repetitions by the Kirby-Bauer technique; In the survival of bile salts, 4 treatments and 12 repetitions were used by counting CFU and in the analysis of the growth curve was determined by descriptive statistics by absorbance with a UV spectrophotometer with a wavelength of 560 nm and a factor of 0.9. The microorganisms with application of 3 methods against enteric *Salmonella* had a favorable growth at 24 hours, obtaining a greater development with *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* by filtration method. In the growth curve, *Lactobacillus brevis* had a greater development at hour 20, with a decline of between 24 to 32 hours, while *Bacillus subtilis* had a greater growth at 24 hours, decreasing its activity at 28 and 32 hours staying above *Lactobacillus brevis*. In the survival to bile salts, no variability of results was found, however, the *Lactobacillus brevis* without bile salts stood out from minute 30 until minute 120. It is concluded that both microorganisms meet physical and biological characteristics that would make them suitable candidates to be used as probiotics in animal feed for animal production purposes.

KEY WORDS

Bacteria, probiotics, bile salts, inhibition halos, growth curve.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Hernández *et al.* (2013) mencionan que las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en el Ecuador. Se transmiten por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados; en los laboratorios se centra principalmente en patógenos como: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, entre otras. Agrocalidad (2013) argumenta que el país actualmente no cuenta con ningún programa oficial para el control, prevención y peor aún la erradicación de principales enfermedades que afectan a los animales.

Jurado *et al.* (2009) indican que uno de los procedimientos tradicionalmente utilizados consiste en el suministro de antibióticos, sin embargo, han sido empleados de modo y en dosis inadecuadas, generando la aparición de cepas resistentes, cada vez más patógenas y con implicaciones negativas en la salud humana y animal; por este motivo es recomendable disminuir su utilización, promoviendo como una alternativa el uso de probióticos con el propósito de equilibrar la microbiota intestinal.

Los probióticos son una alternativa para desarrollar una colonización microbiológica efectiva del tracto digestivo de los animales mejorando la producción, el desconocimiento de los beneficios de las bacterias probióticas en la productividad hace que estas no sean muy utilizadas por los productores pecuarios y por lo tanto no se favorezcan de las propiedades de estos microorganismos (Enríquez, 2012).

Se han realizado investigaciones *in vitro* sobre la actividad antagonista de los probióticos frente a cepas patógenas; los cuales antes de ser usados deben pasar por un proceso de selección en los cuales se consideran varios aspectos incluyendo características funcionales como: viabilidad, persistencia en el tracto intestinal, inmunomodulación y propiedades antagonistas; estas características de funcionalidad se establecen en los laboratorios con pruebas *in vitro* (González *et al.*, 2016).

Por lo antes mencionado se plantea la siguiente interrogante: ¿Con la utilización de los microorganismos benéficos (*Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*) se reducirá el crecimiento de *Salmonella entérica*?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Chavarrías (2007) afirma que desde hace tiempo se estudia la capacidad de las bacterias ácido-lácticas probióticas, conocidas también como las «bacterias buenas» para prevenir problemas como desórdenes gastrointestinales, y se ha demostrado cómo determinadas cepas de este tipo de bacterias tienen efectos beneficiosos en la salud animal y se utilizan ya en algunos productos alimenticios. Para disponer de probióticos eficientes para animales es necesaria la utilización de cepas con actividad probiótica científicamente comprobada.

Jurado *et al.* (2009) argumentan que una alternativa al uso de antibióticos son las bacterias lácticas probióticas suministradas a través de inóculos, con el propósito de equilibrar la microbiota intestinal. El uso de los microorganismos autóctonos con capacidad probiótica es una opción terapéutica para el tratamiento y prevención de algunas patologías animales (Rosmini *et al.*, 2004).

Jurado *et al.* (2012) expresan que los probióticos como aditivos microbianos vivos aportan beneficios a la salud del animal, por cuanto mejoran su equilibrio microbiano intestinal. La aplicación de estos probióticos en la alimentación de animales de interés zootécnico ha permitido mejorar los parámetros productivos de conversión alimenticia, ganancia de peso vivo final y respuesta inmune. Pérez (2015) indica que las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bacillus* son uno de los tipos de probióticos más comunes utilizados actualmente para mejorar la tasa de crecimiento, la eficiencia y la resistencia a las enfermedades de los animales.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad *in-vitro* de microorganismos autóctonos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) para reducir la colonización de *Salmonella entérica*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* y la mezcla de ambas microorganismos) frente a *Salmonella entérica*.

Determinar la curva de crecimiento de los microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis*), mediante espectrofotometría UV.

Evaluar la supervivencia de cepas de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* en sales biliares.

1.4. HIPÓTESIS

La actividad *in-vitro* de microorganismos autóctonos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) obtendrán resultados favorables mediante el desarrollo en la curva de crecimiento, supervivencia en sales biliares y la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella entérica* para reducir su colonización.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. 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. Eli Metchnikoff en el año 1907, fue 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 (Vázquez, 2013).

García *et al.* (2012) mencionan que los probióticos son microorganismos vivos (amistosos o beneficiosos) que si se consumen regularmente en cantidades suficientes, pueden modificar el equilibrio bacteriano en el intestino, la microflora de la cavidad oral, vagina y piel (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped y tienen efectos beneficiosos para la salud, disminuyen en algunos casos la presencia de bacterias patógenas, estos pueden añadirse a los alimentos, la composición es a base de bacterias Gram (+) y (-), levaduras u hongos.

Delgado (2016) argumenta además que los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo y que también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos; su uso ayuda a prevenir las infecciones gastrointestinales en personas y animales y poseen un efecto estimulador en el sistema inmune.

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

García *et al.* (2014) indican que los probióticos deben reunir las siguientes características: No ser sensibles a las enzimas gastrointestinales, ser estables frente a ácidos y bilis, no conjugarse con sales biliares, poseer capacidad para adherirse a las superficies epiteliales, sobrevivir en el ecosistema intestinal, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad de crecimiento rápido en las condiciones del intestino grueso.

Además en el caso de ser utilizados en el alimento deben tener la suficiente estabilidad y capacidad de supervivencia en el pienso, sobrevivir y mantenerse viable en el aparato digestivo, particularmente durante su tránsito por el estómago cuyo bajo pH supone una barrera, poseer capacidad para competir con la flora potencialmente patógena en algún tramo del aparato digestivo o producir metabolitos con efecto antimicrobiano para la flora indeseable (Segura *et al.*, 2013).

2.2.1. ESTABILIDAD EN EL PASO POR EL ESTÓMAGO

Los probióticos pueden afectar de forma benéfica al animal modificando las interacciones metabólicas que tienen lugar en el intestino. Esto puede suceder por medio de la supresión de reacciones generadoras de metabolitos. La mayoría de los microorganismos caracterizados como probióticos no han sido sometidos a pruebas de resistencia frente a ácidos. Varios estudios han demostrado que la matriz de alimentos consumidos juntamente con los probióticos puede tener un efecto protector frente a los ácidos del estómago (Gonzales, 2011).

Los microorganismos probióticos pueden potenciar reacciones de desintoxicación, estimulando la digestión mediante sustitución de deficiencia de enzimas digestivas o sintetizando vitaminas u otros nutrientes no disponibles en la dieta, mejorando la absorción de nutrientes, resultante en un aumento de peso, especialmente benéfico en animales de engorde (Ortiz, 2007).

2.2.2. RESISTENCIA A LAS SALES BILIARES

La bilis, es una solución acuosa verde-amarillenta cuyos mayores componentes son ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliveridina. Es sintetizada en los hepatocitos del hígado, almacenada y concentrada en la vesícula biliar y liberada al duodeno después de la ingesta de comida, la bilis es un detergente biológico que emulsiona y solubiliza los ácidos grasos de cadena larga; por lo tanto juega un rol esencial en la digestión de grasas. Esta propiedad de detergentes, también le confiere actividad antimicrobiana, al generar la disolución de las membranas bacterianas (Ortiz, 2007).

Los ácidos biliares primarios, el ácido cólico y quenodeoxicólico, son sintetizados el colesterol en el hígado. Los ácidos biliares son eficientemente conservados bajo condiciones normales, por un proceso de recirculación enteroepática, microorganismos como *Lactobacillus spp*, poseen enzimas hidrolasas (BSH) que generan la desconjugación de las sales biliares, que hidrolizan el enlace amida y liberan glicina y taurina de la base esteroide, mecanismo por el cual pueden resistir concentraciones de sales biliares en pruebas *in vitro* y el paso por el TGI en animales (Ortiz, 2007).

Sin embargo, el pH ácido del estómago, no es el único impedimento con el que se encuentran los microorganismos candidatos a llegar vivos al intestino para ejercer allí su efecto beneficioso en el huésped. En el intestino delgado, el obstáculo más importante para los microorganismos son las sales biliares, por lo que los probióticos para ejercer sus efectos beneficiosos no deben sucumbir a la acción de este bactericida natural. La concentración de sales biliares en el intestino es variable y difícil de predecir. Las transformaciones microbianas de los ácidos y sales biliares son numerosas (Gonzales, 2011).

2.2.3. CAPACIDAD DE ADHESIÓN AL INTESTINO

La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino es un importante criterio para los probióticos ya que sólo las cepas que se puedan adherir podrán llevar a cabo una colonización efectiva y ejercer los efectos beneficiosos que proveen los probióticos en su interacción con el huésped. La capacidad de adhesión es un factor más importante que el tamaño de la bacteria a la hora de competir con el resto de la flora (Gonzales, 2011).

2.3. MECANISMO DE ACCIÓN

López *et al.* (2007) señalan que los mecanismos por los que los probióticos realizan su función son diversos, si bien podrían ser fácilmente entendidos desde el punto de vista del equilibrio ecológico bacteriano, y esto es importante en especial en el caso del efecto de los probióticos en el intestino.

Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y competencia por nutrientes. Esta apreciación se refiere a la capacidad de las bacterias probióticas de competir con bacterias patógenas por un lugar en la

pared intestinal y por nutrientes para fijarse exitosamente en el epitelio, generando la oportunidad de reconocer cualquier cosa que afecte el equilibrio de la flora intestinal normal pudiendo dar acceso directo a los patógenos que se multiplicarán más fácilmente para fijarse en el epitelio (Ángel, 2013).

Las bacterias intestinales contribuyen a la correcta permeabilidad de la mucosa intestinal. Determinados microorganismos perjudiciales incrementan la permeabilidad y favorecen el paso de bacterias y macromoléculas de la dieta a través de la mucosa. Diferentes probióticos pueden prevenir y reparar dicho daño, lo cual ha sido constatado *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* utilizando animales de experimentación (López *et al.*, 2007).

Alteración de los niveles de pH y de Oxígeno haciéndolos desfavorables a los patógenos. La inducción de un pH ácido por debajo de 4, En parte por la producción de acetatos, butiratos, favorece el crecimiento de las bacterias tolerantes del ácido. Algunos probióticos, como los lactobacilos, generan peróxido de hidrógeno, que reduce el pH luminal y el potencial redox, produciendo bacteriocinas que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas que, en ocasiones, mediante la presión baja de oxígeno favorecen el crecimiento de anaerobios (Ángel, 2013).

Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, di acetilo y bacteriocinas, entre otros que reducen el número de células patógenas posibles, perturbando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Ángel, 2013).

2.4. BENEFICIO DE LOS PROBIÓTICOS

El efecto benéfico de los probióticos está relacionado con su habilidad para interactuar y adherirse a la pared intestinal. La adhesión de las bacterias probióticas al intestino ocurre por la asociación de las mismas con la mucosa o por adherencia al epitelio; para ello, deberá haber una interacción de fuerzas atractivas y repulsivas entre las superficies participantes. Las bacterias probióticas tienen efectos benéficos en el epitelio intestinal ejerciendo acciones diversas sobre la salud mediante distintos mecanismos de acción (Rodríguez *et al.*, 2010).

Además de su contribución al mantenimiento del equilibrio en la microbiota y de las funciones normales del intestino, los probióticos pueden mejorar la productividad del animal a través de una serie de acciones benéficas; es importante considerar su contribución para modular el funcionamiento óptimo del sistema inmunológico y para bloquear las señales químicas que emiten los enteropatógenos para coordinar su virulencia. Adicionalmente, los probióticos contribuyen a la digestión de la fibra dietética, también estimulan la absorción de nutrientes (Hansen, 2011).

Las preparaciones probióticas pueden ser administradas inmediatamente después del nacimiento de los animales o en periodos en los que el productor espera la aparición de enfermedades (preventivo), o mezcladas en el alimento por periodos de tiempo largo; los microorganismos pueden ser ingeridos mediante su adición en el agua o en el alimento. En lugares con alta incidencia de enfermedades diarreicas es apropiado introducir una cepa probiótica tan pronto como sea posible, de tal forma que se garantice la colonización del intestino con la cepa prebiótica capaz de inhibir al patógeno (García *et al.*, 2014).

2.4.1. PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

Las bacterias probióticas frenan el crecimiento de organismos patógenos en el tracto gastrointestinal, luchan por los alimentos disponibles y el espacio disponible y segregan entonces sustancias como ácido láctico y otros ácidos orgánicos, y sustancias que funcionan como antibióticos, que se conocen por el nombre de bacteriocinas, de esta manera se crea un medio en el que los elementos patógenos no pueden crecer. Las investigaciones realizadas demuestran el funcionamiento antagónico de los probióticos y la capacidad para curar infecciones intestinales (García *et al.*, 2012).

En aves de corral los beneficios de la suplementación probiótica se divulgan en el funcionamiento de los pollos y la salud con evidencia de una mayor resistencia de los pollos a *Salmonella*, *E. coli* o infecciones por *perfringens* (Chaucheyras, 2010).

2.4.2. EFECTO INMUNOLÓGICO

Al mejorar la resistencia inmunológica del animal, se disminuye la utilización abusiva de antibióticos, su costo y dificultad de administración. Particularmente en el tratamiento de aves ponedoras, se evita la transmisión de salmonelosis a través de los huevos. Se ha comprobado que los intestinos de los animales nacidos de madres tratadas con probióticos están libres de patógenos, lo que optimiza la capacidad de supervivencia en las primeras 72 horas de vida (Wirz, 2017).

2.4.3. CONTRIBUCIÓN A LA DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES

Contribuye a la digestibilidad de nutrientes porque contienen enzimas que ayudan a digerir los alimentos. Realizan un control higiénico ambiental de las naves de producción, esto se debe a que al ser las heces provenientes de intestinos no contaminados y al realizarse correctas fermentaciones intestinales, se logra homogeneizar y mejorar la textura y olor de las heces siendo estas aptas como fertilizantes (García *et al.*, 2012).

2.4.4. EFECTO HIPOCOLESTEROLÉMICO

La presencia de probióticos ha mostrado que aumenta la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudando a su eliminación, por lo que tiene un efecto hipocolesterolémico (Ewaschuk y Dieleman, 2006).

2.4.5. PRODUCCIÓN DE VITAMINA

Producción de micronutrientes, especialmente vitaminas (algunas vitaminas del complejo B), antioxidantes y aminos, muchos de los cuales son utilizadas por todo el organismo. Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen. Participa en la regulación de funciones intestinales, tales como: Utilización de mucus, absorción de nutrientes, motilidad gastrointestinal y flujo de sangre, lo cual ocurre a través de la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, hormonas, enzimas, poliaminas y citoquinas y óxido nítrico (Aguavil, 2012).

2.4.6. EFECTO EN INDICADORES PRODUCTIVOS

La adición de probióticos ha demostrado efectos beneficiosos en el rendimiento de crecimiento de las aves de corral. En los pollos de engorde, la suplementación

de una dieta con probióticos ha dado como resultado una tasa de conversión de alimento mejorada y un peso vivo promedio en comparación con el grupo control. Además la administración del probiótico de múltiples cepas en el agua potable aumenta significativamente la ganancia de peso diaria promedio, la eficiencia de la alimentación y una reducida tasa de mortalidad (Yirga, 2015).

Favorece con una mejor absorción de los nutrientes de los formulados alimenticios con el consiguiente aumento del índice de conversión y su significado económico en ganancia de peso (Toledo, 2015).

2.5. *Lactobacillus*

John *et al.* (2013) expresan que el *Lactobacillus* o bacteria del ácido láctico es un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. Es susceptible a temperaturas elevadas 45 °C. Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos, otros son algo parecido al colibacilo. Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica, a menudo reniforme.

2.5.1. TIPOS DE *Lactobacillus*

John *et al.* (2013) afirma que dentro del género de los *Lactobacillus*, los microorganismos más relevantes son:

- ***Lactobacillus acidophilus DDS-1*** Es la cepa más importante.
- ***Lactobacillus casei*** Trabaja conjuntamente con otros organismos ayudando al crecimiento de otras bacterias benéficas.
- ***Lactobacillus plantarum*** Resiste niveles bajos de pH y es capaz de sobrevivir a las concentraciones de bilis del intestino.
- ***Lactobacillus salivarius*** Promueve la salud intestinal y ayuda también a mantener la salud oral.
- ***Lactobacillus rhamnosus*** Ayuda a eliminar las ocasionales molestias intestinales trabajando para mantener una microflora saludable.

- ***Lactobacillus brevis*** Bacterias productores de ácido láctico que ayudan a mantener el tracto intestinal saludable.
- ***Bifidobacterium lactis*** Bacteria benéfica que se encuentra en el yogurt de leche cruda que ayuda a mantener la respuesta inmunitaria.
- ***Bifidobacterium longum*** Ayuda a mantener el sistema digestivo en perfecto estado a la vez que estimula el sistema inmunológico.

2.6. *Lactobacillus brevis*

Pavlova *et al.* (2012) indican que el *Lactobacillus brevis* es una bacteria Gram-positiva de la especie de bacterias del ácido láctico, hay aproximadamente 16 cepas diferentes. Puede encontrarse en muchos ambientes diferentes: alimentos fermentados y como microbiota normal. *L. brevis* es uno de los principales *Lactobacillus* especies encontradas en Tibicos granos (aka agua kéfir) y ha sido identificado como las responsable de la producción de especies la polisacárido (dextrano) que forma los granos. Principales metabolitos de *L. brevis* incluyen ácido láctico y etanol (Pidoux, 1989).

2.7. USO DE *Lactobacillus brevis* COMO PROBIÓTICO

Entre los microorganismos que más se utilizan como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), específicamente los del género *Lactobacillus*, los cuales tienen un uso benéfico en el tracto gastrointestinal de los animales, fortaleciendo la actividad del tracto gastrointestinal sin cambiar o alterar las normales funciones del organismo y se caracterizan por producir diferentes sustancias que inhiben a los microorganismos patógenos (Rondón *et al.*, 2012).

Cuadro 2.1. Principales probióticos

Género <i>Lactobacillus</i>	Género <i>Saccharomyces</i>	Genero <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. Johnsonii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ln. latis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>S. unisporus</i>	<i>Ln. Mesentroides. sp cremoris</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>		<i>Ln. Mesentroides. sp</i>
<i>Lb. zaeae</i>		<i>Dextranicum</i>
<i>Lb. plantarum</i>	Genero <i>Kluyveromyces</i>	Otros Géneros

<i>Lb. brevis</i>	<i>K. marxianus sp. Marxianus</i>	<i>Candida Kefir</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>K. marxianus sp.</i>	<i>Torulaspota delbrueckin</i>

Fuente: García *et al.* (2012).

Se ha observado que la adición de probióticos genera estímulo en el desarrollo de órganos linfoides como el timo y la bolsa de Fabricio. Probablemente esta acción permite a las aves ejercer una mejor respuesta inmune frente al ataque de patógenos (Alkhalifa *et al.*, 2010).

Especies del género *Lactobacillus* han demostrado en granja su eficacia en la disminución de la mortalidad por enteritis necrótica (30% vs 60%), un probiótico a base de cultivos de *Lactobacillus* redujo significativamente la presencia de *Salmonella enteritidis* en pollitos neonatales tras ser infectados con este patógeno (Higgins *et al.*, 2008).

Capcarova *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la cepa de *E. faecium* y de otra bacteria productora de ácido láctico, *Lactobacillus fermentum*, sobre el metabolismo y el estado antioxidante de los pollos. Los autores observaron que la adición de probióticos en el agua redujo el contenido de triglicéridos en sangre. Además, el estado antioxidante plasmático total en los dos grupos suplementados con probióticos mejoró significativamente respecto al grupo control.

Mookiah *et al.* (2014) desarrollaron una investigación en efectos de los probióticos sobre el rendimiento, las poblaciones de bacterias cecales y las concentraciones de fermentación cecal de los pollos de engorde, en este trabajo se utilizaron algunas cepas de *Lactobacillus*, entre ellas cepas de *L. brevis*; se demostró el aumento de las poblaciones cecales de *lactobacilos* y *bifidobacterias* y disminuyó *E. coli* cecal.

Algunos experimentos hechos por Yamawaki *et al.* (2013) al realizar conteo de *Salmonella enteritidis*, después de la inoculación *in ovo* y la inoculación por inmersión de cepas de *Lactobacillus*, no demostraron una disminución significativa de esta bacteria en los ciegos de las aves. A diferencia, de Olivera *et al.* (2014) quienes al administrar probióticos *in ovo* a través de la cámara de

aire, demostraron que las aves suplementadas e infectadas con *Salmonella enteritidis* tenían significativamente menor carga de *Salmonella* y mejor ganancia de peso.

Alkhalif *et al.* (2010) utilizaron un probiótico a base de *Pediococcus acidilactic* a una dosis de 10^9 ufc/g observaron aumento significativo sobre el peso de las aves, respecto a la conversión alimenticia, también evidenciaron efecto significativo, los resultados descritos corroboran los hallazgos de Kabir (2009) quien evidenció una ganancia de peso altamente significativa, después de suministrar probióticos a pollos de engorde en el alimento.

Kabir (2009) observó resultados significativos al encontrar un mejor sabor en la carne de aves suplementadas con probióticos; mientras que Pelicano *et al.* (2003) no evidenciaron mejoras en la palatabilidad ni en el aspecto general de esta. Por otra parte, la suplementación con probióticos también ha manifestado tener efectos sobre las grasas, ya que disminuyen la concentración de fosfolípidos de la carne, el colesterol en la yema de los huevos y la reducción de la grasa abdominal de las aves (Král *et al.*, 2013).

2.8. *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus subtilis* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía $0,5$ a $2,5 \mu\text{m}$ x $1,2-10 \mu\text{m}$. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno (Koneman, 2001).

Vive dentro de los límites de 55 a 70°C . Es un gran controlador biológico, *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfii*, *Fusarium spp.*, *Verticillium spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium spp*, y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne spp*) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del tallito” del algodónero (Cuervo, 2010).

2.9. *Bacillus subtilis* COMO ADITIVO SEGURO

Bacillus subtilis ha sido utilizado como probiótico desde 1986 para mejorar el rendimiento productivo. El *B. subtilis* como aditivo para pollos de engorda con un contenido mínimo de 1×10^7 , y uno máximo de 5×10^7 UFC/kg en dieta completa. *B. subtilis*; es una especie con evaluación QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA por la sensibilidad a antibióticos y la ausencia de potencial toxigénico, lo que es considerado aditivo seguro para aves, para el consumidor y para el medio ambiente (González, 2009).

2.10. *Salmonella*

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos gramnegativos, incluidos en el grupo de las enterobacterias; son móviles, con pocas excepciones, no fermentan la lactosa, no producen desaminasas y se identifican con base en sus propiedades bioquímicas. Muchos serovares de *Salmonella* son patógenas para el hombre, los animales o ambos (Rincón *et al.*, 2011).

En la actualidad se reconoce la existencia de dos especies: *S. entérica* y *S. bongori*; a su vez *S. entérica* se subdivide en seis subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, indica y dentro de cada subespecie se encuentran distintos serotipos o serovares identificados en función de su respuesta serológica, permitiendo la caracterización de 2,579 serotipos, este es un método ampliamente utilizado con fines epidemiológicos, que identifica los serovares prevalentes en cada región y la etiología de brotes e infecciones en humanos y animales (Rincón *et al.*, 2011).

2.11. *Salmonellosis*

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica que afecta tanto al humano como a los animales, es causada por una bacteria de la especie *Salmonella*. Es de distribución mundial y se considera un importante problema de salud pública. Las aves se ven involucradas en la transmisión debido a que estas, una vez están infectadas con el microorganismo en su sistema digestivo pueden eliminarlo y contaminar los huevos al pasar por la cloaca y la carne a la

hora de su manipulación siendo estas formas las vías más importantes de contaminación de las aves (Herrera y Jabid, 2015).

Los animales infectados excretan *Salmonellas* en cantidades considerables en las heces y orina, contaminando el ambiente, lo cual propicia la diseminación por vía oral, cuando los animales susceptibles ingieren agua o alimento contaminado con materia fecal; las bacterias eliminadas en las heces pueden sobrevivir hasta 10 o más meses (Flores, 2016).

Una vez que *Salmonella* ha alcanzado el intestino, es capaz de persistir en la mucosa, evadiendo los mecanismos bactericidas de las enzimas digestivas, las sales biliares, Inmunoglobulina A secretoria, péptidos antimicrobianos y otros mecanismos defensivos de la inmunidad innata. La forma en que *Salmonella* interacciona con las células epiteliales y es capaz de atravesar el epitelio hasta la submucosa ha sido ampliamente estudiada en modelos animales e infecciones de cultivos celulares *in vitro* (Betancor y Yim, 2012).

2.12. ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Camelino *et al.* (2018) expresan que la espectrofotometría UV/Visible es una técnica que se basa en la capacidad de las moléculas en solución de absorber la radiación incidente, ya sea en forma total o parcial, es posible detectar la absorbancia de determinados elementos cromóforos en el rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 700 nm, es decir, desde el cercano UV (190 a 400 nm) hasta todo el espectro visible (400 a 700 nm) inclusive. La eficiencia con la cual las moléculas absorben energía a una determinada longitud de onda, depende de la estructura atómica y de distintas condiciones del medio (temperatura, pH, fuerza iónica, etc.).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de esta investigación se efectuó en la Unidad de Docencia, Investigación y Vinculación del Laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria perteneciente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” ubicada en el sitio el Limón en la ciudad de Calceta-Manabí-Ecuador, en las coordenadas 0°49´15.35” de latitud Sur y a 80°11´01.52” de longitud Oeste, con 15 msnm.

3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS

Las características climáticas en el sitio El Limón, de la parroquia Calceta ubicada en el cantón Bolívar de la Provincia de Manabí son:

Cuadro 3.1. Características climáticas

Precipitación media anual	782,6 mm
Temperatura media anual	26 °C
Humedad relativa	81,40%
Heliofanía anual	1109,8 (horas)
Viento	1,6 m/s
Evaporación Anual	1256,3 mm

FUENTE: Estación Meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” (2018).

3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

La presente investigación tuvo una duración de 24 semanas, las cuales, se repartieron de la siguiente manera; se dedicaron 10 semanas al trabajo de campo en laboratorio y las 14 semanas restantes fueron empleadas para la tabulación, organización y corrección de material investigativo.

3.4. FACTORES EN ESTUDIO

Lactobacillus brevis, *Bacillus subtilis*, Sales Biliares y *Salmonella entérica*.

3.5. TRATAMIENTOS

Para la evaluación de la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) frente a *Salmonella entérica*, y supervivencia de cepas en sales biliares, se realizó de acuerdo los siguientes tratamientos, dando como resultado:

Cuadro 3.2. Tratamientos.

EFECTO HALOS DE INHIBICIÓN		
T1	<i>Lactobacillus brevis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo
T2	<i>Lactobacillus brevis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Filtración
T3	<i>Lactobacillus brevis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Dilución
T4	<i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo
T5	<i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Filtración
T6	<i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Dilución
T7	<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo
T8	<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Filtración
T9	<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Dilución
EFECTO SALES BILIARES		
T10	<i>Lactobacillus brevis</i>	Presencia de sales biliares
T11	<i>Bacillus subtilis</i>	Presencia de sales biliares
T12	<i>Lactobacillus brevis</i>	Ausencia de sales biliares
T13	<i>Bacillus subtilis</i>	Ausencia de sales biliares

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x3, en el caso de la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella entérica* se utilizaron 9 tratamientos con 4 repeticiones; en el análisis de la curva de crecimiento fue una

característica que se determinó mediante estadística descriptiva; y en el estudio del efecto de las sales biliares se utilizaron 4 tratamientos y 12 repeticiones, para los 2 experimentos se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Observación del i-ésimo nivel del factor A, j-ésimo nivel del factor B y k-ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (Microorganismos).

B_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (Métodos de difusión y sales biliares).

AB_{ij} = Efecto de la interacción de primer orden del i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo nivel del factor B.

ε_{ijk} = Error experimental de i-ésimo nivel del factor A, el j-ésimo nivel del factor B y la k-ésima repetición.

3.7. ADEVA

Cuadro 3.3. ADEVA para Halos Inhibitorios.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Factor A (Microorganismos)	2
Factor B (Métodos de difusión)	2
Factor A x B (Met. Difusión x Bact. Benéficas)	4
Error Experimental	27
Total	35

Cuadro 3.4. Cuadro de ADEVA para Sales biliares.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Factor A (Microorganismos)	1
Factor B (Sales Biliares)	1
Factor A x B (Microorganismos x Sales Biliares)	1
Error Experimental	44
Total	47

3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se consideró como unidad experimental a cada cepa de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*; y cada uno de los factores considerados en evaluación, siendo así para la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a la dilución 10^{-8} de *Salmonella entérica*, se estudiaron 36 unidades experimentales, para el factor de curva de crecimiento se analizaron 80 unidades experimentales y para el factor sales biliares se trabajó con 36 unidades experimentales.

3.9. VARIABLES EN ESTUDIO

3.9.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Actividad *in vitro* de cepas de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*.

3.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Halos de inhibición

Curva de crecimiento

Supervivencia del *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* en sales biliares

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variabilidad de la respuesta medible con el efecto de tratamientos fue analizada mediante un análisis de varianza, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0,05; los datos se analizaron con el paquete estadístico InfoStat (2017) y se plasmaron en tablas y gráficos.

3.11. PROCEDIMIENTO

3.11.1. ASEPSIA DEL ÁREA Y MATERIALES DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Antes de realizar la asepsia del área y materiales se utilizó la respectiva protección personal (guantes, mandil, mascarilla, etc) y se procedió a limpiar y a desinfectar los pisos y mesones del área, utilizando desinfectantes y agregando por último alcohol al 3%, después se procedió a lavar, desinfectar y a esterilizar los materiales a utilizar en el autoclave.

3.11.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA LA ACTIVACIÓN DE CEPAS *Lactobacillus brevis* (40 LP) Y *Bacillus subtilis* (20BP)

Para la preparación de los medios Caldo MRS (*Lactobacillus brevis*) se utilizó 8,27 g del mismo en 150 mL de agua destilada, en el Caldo Nutriente (*Bacillus subtilis*) se manipuló 1,2 g del mismo en 150 mL de agua destilada y se agregó 0,75 g de NaCl para que la cepa (*Bacillus subtilis*) se desarrolle de una manera más favorable, ya que estas necesita pequeñas concentraciones mínimas de cloruro de sodio, una vez pesados y colocados en matraces se ubicó el agitador magnético para homogenizar el medio con agua peptonada y se midió el pH de cada uno de los medios, ya que este debe de ser neutro.

3.11.3. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS *Lactobacillus brevis* (40 LP), *Bacillus subtilis* (20BP) Y *Salmonella entérica* (ATCC 13076)

Los microorganismos para la prueba fueron 2 bacterias gram positivas: *Lactobacillus brevis* se inocularón en Caldo MRS (*Titanium*), la cepa gram positivo *Bacillus subtilis* en Caldo Nutritivo (Difco™), el patógeno gram negativa *Salmonella entérica* en Caldo Selenito. Se retiró las cepas que se encontraban en la refrigeradora -20°C y se colocó en la refrigeradora a 4°C para que no haya un shock térmico.

Una vez preparados los medios de cultivo se inoculó el *Lactobacillus brevis* que se encontraba en la refrigeradora de 4°C en tubos eppendorf y se ubicó en cada tubo falcons (Caldo MRS+ *Lactobacillus brevis*) y el tubo eppendorf de *Bacillus subtilis*, seguido a esto se situó 0,1 mL en cada matraz de elermeyers de 100 mL (Caldo Nutriente + *Bacillus subtilis*), mientras que en la *Salmonella entérica* se

tomó 1 mL y se inoculó en tubos de 12 mL de Caldo Selenito, y se procedió a colocar cada una de estas cepas en la incubadora a 37°C por un lapso de tiempo de 24 - 48horas.

3.11.4. CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS *Lactobacillus brevis* (40 LP) Y *Bacillus subtilis* (20BP)

Se colocó 2 mL de la cepa reactivada (*Lactobacillus brevis* y/o *Bacillus subtilis*) en eppendorf, se centrifuga a 1000 rpm/min. Después de centrifugar se elimina el sobrenadante y se deja la sustancia activa, se hace un lavado con 1 mL de agua peptonada en cada eppendorf, se coloca en la centrifuga de nuevo a 1000 rpm/min, se vuelve a retirar el sobrenadante, en el *Lactobacillus brevis* se coloca 1 mL de Glicerol al (3%) y 500 µl de leche semidescremada y se almacena en la refrigeradora a -2°C, mientras que *Bacillus subtilis* sólo se coloca el glicerol al 3% y se conserva en la refrigeradora a -2°C.

3.11.5. INHIBICIÓN EN EL ENFRENTAMIENTO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* Y LA MEZCLA (*Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*) FRENTE A *Salmonella entérica*

Se transfirió a partir del inóculo de *Salmonella entérica* 1 mL y se procedió a realizar diluciones seriadas en base 10 (10^{-1} a 10^{-8}). A partir de la dilución 10^{-7} y 10^{-8} se tomó 1mL de *Salmonella entérica* y se la colocó en Agar (Mueller Hinton y MRS) y con el asa de Drigalsky se difunde por toda la caja Petri, para realizar el método de difusión en pocillos para el enfrentamiento de las cepas benéfica: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* y la mezcla *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*).

3.11.5.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN DIRECTO

Una vez situada la *Salmonella entérica* (1mL) en los Agares: Mueller Hinton y MRS, se hicieron los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro, y en cada uno de los pocillos se vertieron 100 µL de *Lactobacillus brevis*, en otro pocillos 100 µL de *Bacillus subtilis*, así mismo en un mismo pocillos se inoculó 50 µL de *Lactobacillus brevis* + 50 µL de *Bacillus subtilis*, Se dejó reposar por 10 minutos

y se incubó a 37°C por un tiempo de 24 horas, después de este tiempo se hizo la lectura de las placas por test Kirby Bauer.

3.11.5.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN FILTRADO

Se aplicó 1 mL de *Salmonella entérica* en los Agares: Mueller Hinton y MRS, se hicieron los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro.

Para la obtención de los extractos bacterianos (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis*), se aplicó 1 mL de la cepa reactivada (*Lactobacillus brevis*) en eppendorf, cada inóculo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 5min. Después de centrifugar se filtra el sobrenadante con un filtro bacteriológico Millipore® de 0,2 µm y una jeringa descartable de 5 mL, posteriormente se colocó los extractos de cada cepa en vasos de precipitación de 10 mL; por último se inoculo el extracto en el pocillo correspondiente y se dejó reposar por 10 minutos y se incubó a 37°C por un tiempo de 24 horas, después de este tiempo se hizo la lectura de las placas por test Kirby Bauer.

3.11.5.3. MÉTODO DE DIFUSIÓN DILUIDO

Se empleó 1 mL de *Salmonella entérica* en los Agares: Mueller Hinton y MRS, se hicieron los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro.

El método de dilución con solución salina (0,85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada estéril) a partir de los inóculos de (*Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*) se tomó 1 mL y se procedió a realizar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}), una vez realizado esto, se tomó la última dilución y se la adicionó en el pocillos correspondiente. Se dejó reposar por 10 minutos y se incubó a 37°C por un tiempo de 24 horas, después de este tiempo se hizo la lectura de las placas por test Kirby Bauer.

3.11.6. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*

Se colocó 15 mL de Caldo MRS en 45 tubos donde se utilizó para el crecimiento de *Lactobacillus brevis*:

Se aplicó 1 mL de la cepa reactivada (*Lactobacillus brevis*) en eppendorf, se centrifugó a 1000 rpm/min. Después de centrifugar se elimina el sobrenadante y se deja la sustancia activa, se hace un lavado con 1 mL de agua Peptonada en cada eppendorf, se coloca en la centrifuga de nuevo a 1000 rpm/min, se vuelve a retirar el sobrenadante y se inocula 30 µl de la cepa (*Lactobacillus brevis*) a los tubos falcons con caldo MRS y se procede a Incubar registrando los tiempos de incubación, cuando llega la hora de la lectura se coloca 3 µl de la cepa en una cubetita y se ubica en el espectrofotómetro.

Se colocó 4000 mL de Caldo MRS en 40 matraces donde se utilizó para el crecimiento de *Bacillus subtilis* y se realiza el mismo procedimiento que el *Lactobacillus brevis*.

3.11.7. SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus brevis* Y *Bacillus subtilis* EN SALES BILIARES

Se plaqueó 12 mL de Agar MRS (*Lactobacillus brevis*) Agar Nutriente (*Bacillus subtilis*) a las cajas Petri, se deja solidificar, una vez preparado el material a utilizar, se coloca 1,5 mL de Sales Biliares (5%) en Caldo MRS y Caldo Nutriente, se colocó en tubos falcons de 50 mL. En tubos falcon de 15 mL se inoculó 5 mL de *Lactobacillus brevis* previamente centrifugando a 600rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se colocó 5 mL de solución salina y se vuelve a centrifugar 600 rpm por 5 minutos una vez centrifugado se eliminó el sobrenadante y se colocó 3 mL de caldo MRS y se homogenizó en el vortex.

Se inocula en 15 tubos con 3 repeticiones por minutos (minuto 0, minutos 30, minutos 60, minutos 90, minutos 120 minutos) y se coloca en la incubadora a 37°C. Una vez cumplido el tiempo esperado se realiza diluciones desde 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} , se procede a sembrar en las cajas y se coloca la segunda capa.

Se incubó a 37 °C durante 48 horas y se midió el crecimiento celular mediante unidades formadoras de colonias (UFC), a intervalos por minutos (minutos 0, minutos 30, minutos 60, minutos 90, minutos 120).

3.12. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS

3.12.1. HALOS DE INHIBICIÓN

Para medir los halos de inhibición se utilizó una regla milimétrica y se midió el diámetro del halo de inhibición partiendo desde donde está el pocillo de los microorganismos (*Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis*) hasta donde se inhibe el crecimiento. Para categorizar los niveles de susceptibilidad de los microorganismos frente al patógeno, se toma en cuenta la siguiente Categoría Interpretativa, donde:

Sensible: Presenta un halo con una buena probabilidad de éxito (≥ 21 mm).

Intermedio: Se presenta un halo de inhibición más reducido (16 mm- 20 mm).

Resistente: Presenta muy poco o casi nada de halo (< 15 mm).

3.12.2. CURVA DE CRECIMIENTO

Para evaluar la Curva de crecimiento se realizó la lectura por espectrofotometría. Se midió mediante Absorbancia (ABS%) con el espectrofotómetro de marca JENWAY 6305. Se procedió a encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de sacar las cepas de la incubadora para calibración interna (automáticamente). Pasado los 15 minutos se procedió a la calibración manual que consistió en mover el rango de Longitud de Onda a 560 nm con un factor de 0,9. Seguido a esto se tomó una cubeta plástica en la cual se llevó la muestra al espectrofotómetro donde se calibró la tolerancia al 100%.

3.12.3. SUPERVIVENCIA DE *Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis* EN SALES BILIARES

Para valorar la supervivencia del *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* en sales biliares simulando el paso al tracto gastrointestinal se inoculó el 5% de sales biliares en cada microorganismo (*Lactobacillus brevis*) y Caldo Nutriente (*Bacillus subtilis*) y con 3% de sales biliares. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se midió el crecimiento celular mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), a intervalos por minutos (minutos 0, minutos 30, minutos 60, minutos 90, minutos 120).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 . INHIBICIÓN EN EL ENFRENTAMIENTO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* Y LA MEZCLA *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*) FRENTE A *Salmonella entérica*

Como se puede observar en el cuadro 4.1., en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella entérica* mediante diferentes métodos de difusión, se pudo apreciar que hubo diferencia estadística entre tratamientos ($P > 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que las bacterias que tuvieron un mejor desarrollo fueron la mezcla de las bacterias *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis* mediante el método de difusión de filtración (29,33 mm \pm 2,70) y *Lactobacillus brevis* por método directo (22,00 mm \pm 2,70).

Cuadro 4.1. Promedios de medición de halos inhibitorios mediante la técnica de Kirby-Bauer a las 24 horas de cultivación con la aplicación de diferentes métodos de infusión en cepas de *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* frente a *Salmonella entérica* (Ver Anexo 10).

Microorganismos	Métodos	Media (mm)	
<i>Lactobacillus brevis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo	22,00	AB
	Filtración	13,67	C
	Dilución	17,33	BC
<i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo	18,00	BC
	Filtración	18,00	BC
	Dilución	18,33	BC
<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Salmonella entérica</i>	Directo	17,33	BC
	Filtración	29,33	A
	Dilución	17,67	BC
EE		2,70	
P-valor		0,0001	

A, B y C letras iguales en la misma columna, no difieren estadísticamente según Tukey al 5% de probabilidad

Los resultados obtenidos en la presente investigación se muestran similares a los obtenidos por Vélez *et al.* (2015) donde expone que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) crearon halos inhibitorios que mostraron la susceptibilidad al crecimiento de cepas de *Salmonella tiphymurium*, por la observación de zonas claras sin crecimiento de colonias de la bacteria patógena.

Ramírez (2010) afirma que investigaciones realizadas al encaminamiento de la actividad antimicrobiana probiótica de cepas *Lactobacillus* y *Bacillus*, se ha precisado evaluar su capacidad antagónica de producción de bacteriocinas y otras sustancias eviten el normal desarrollo de microorganismos patógenos.

En estudios realizados por Fernández *et al.*, (2014) afirman que investigaciones encaminadas al enfrentamiento de patógenos con Bacterias Ácido Lácticas, aproximadamente un 44% de estas actúan mediante bacteriocinas que enfrentan patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, entre otros. Estos resultados atribuyen las características necesarias para considerar a los *Bacillus* y *Lactobacillus* como una alternativa natural con potencial inhibitorio para inactivar patógenos presentes en los alimentos y tracto gastrointestinal.

Sánchez *et al.* (2011) expresa que las cepas de *Lactobacillus* y *Bacillus* frente a cultivos frescos *Escherichia coli* y *Candida albicans* mediante el método filtración, la prueba de inhibición *in vitro* frente a los patógenos dio positiva a la acción antimicrobiana de las cepas ácido lácticas, lo que podría verse atribuido a producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético causando una alteración de la permeabilidad celular, donde se disminuye el porcentaje de patogenicidad otorgando las características idóneas para considerarlos una alternativa frente a retos sanitarios.

En investigaciones realizadas por Rebolledo *et al.* (2013) encontraron que la actividad antagónica de cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus johnsonii* mediante método de dilución y directo frente a *Streptococcus mutans*, donde no encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$), sin embargo, se obtuvo una mayor capacidad inhibitoria mediante en ambos métodos de *Lactobacillus casei*. De la misma manera Castañeda y Consuelo (2016) afirman que en evaluaciones realizadas a *Bacillus subtilis* encontraron que la capacidad antagónica es mayor que en otras cepas de *Bacillus*.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en esta investigación, donde se encontró que hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0,05$), obteniendo una mayor capacidad antagonista en la mezcla de *Lactobacillus*

brevis + *Bacillus subtilis* (29,33 mm \pm 2,70) por método de filtración y *Lactobacillus brevis* (22,00 mm \pm 2,70) por método directo.

4.2 . DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL *Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis*, MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Como se puede observar en el gráfico 4.2., el *Lactobacillus brevis* tuvo un mayor desarrollo en la hora 20, donde se obtuvo un declive de entre 24 a 32 horas, mientras que el *Bacillus subtilis* obtuvo un crecimiento normal, donde se pudo apreciar un mayor crecimiento a las 24 horas, disminuyendo su actividad a las 28 y 32 horas manteniéndose por encima del *Lactobacillus brevis*.

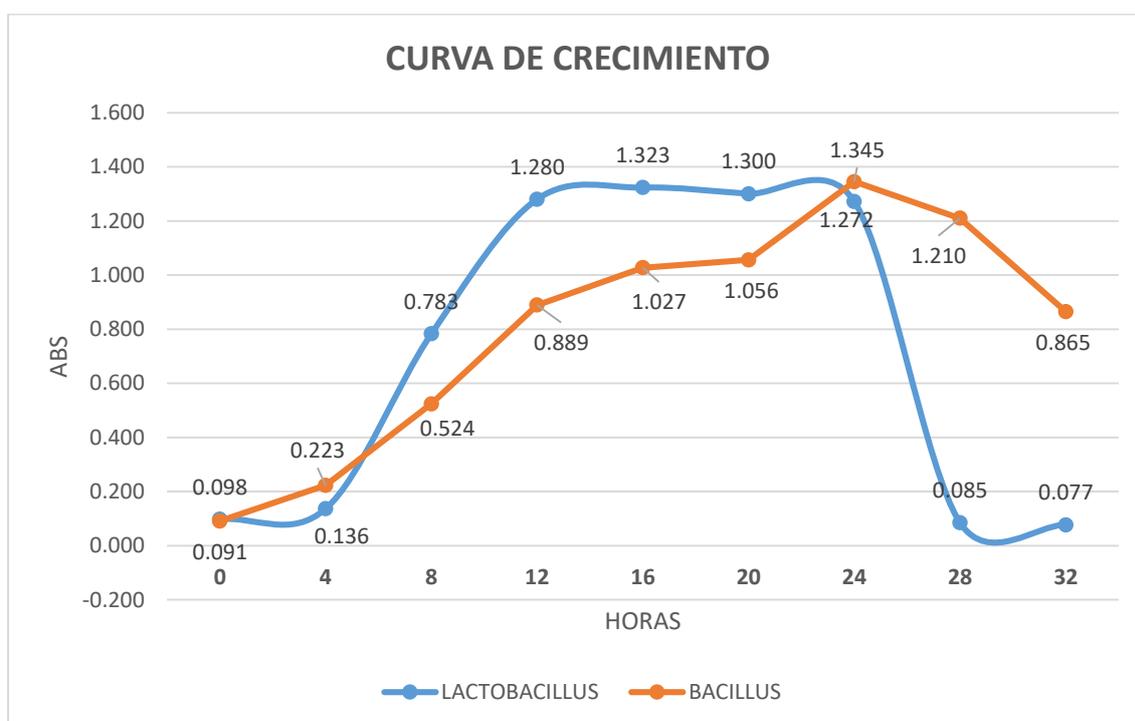


Gráfico 1. Tendencia de promedios de la medición de la curva de crecimiento de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* 0 a 32 horas mediante espectrofotometría UV.

Castañeda y Consuelo (2016) concuerdan con los datos obtenidos en esta investigación donde afirman que en cepas de *Bacillus* se evidencia el aumento en UFC/mL durante ésta fase de crecimiento en comparación con el resto de la curva de crecimiento, donde el *Bacillus subtilis* tiene una velocidad de crecimiento más elevada que las otras cepas de *Bacillus* y posterior a las 15 horas de evaluación disminuye su crecimiento debido a la disminución de

nutrientes, factores esenciales para la respiración; aumento de otros metabolitos que pueden ser sustancias tóxicas y variación del pH hacia la acidez.

Carezuela (2012) deduce que el crecimiento del *Bacillus subtilis* se ve influenciado por las fuentes de energía como el carbono, glucosa, entre otros, que puedan mantener en un estado óptimo al microorganismo para poder desarrollarse, proceso que comparte con cepas de *Lactobacillus*.

Zamudio (2005) expresa que las cepas de *Lactobacillus* tienen un crecimiento uniforme, a pesar de ello se pueden encontrar diferencias estadísticas ($P > 0,05$) en la curva de crecimiento, donde se puede observar que estas Bacterias Ácido Lácticas tienen un pico de crecimiento entre 16 a 48 horas post-incubación y obteniendo un mayor desarrollo el *Lactobacillus plantarum* a las 40 horas con 25 UFC/mL $\times 10^3$.

A pesar de que los *Lactobacillus* comparten características metabólicas se atribuye la variabilidad de resultados en la curva de crecimiento entre cepas al desconocimiento de diferentes perfiles de fermentación para galactosa, lactosa, maltosa y sorbitol, lo que indica que las características fenotípicas generalmente no se relacionan con las genotípicas (Zamudio, 2005).

Escobar *et al.* (2010) afirma que el resultado del crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bacillus* depende muchas veces del manejo y características físico-químicas a las cuales son sometidas las cepas, donde estas podrían ocasionar una variabilidad dentro del normal crecimiento de estos microorganismos.

Lo citado anteriormente corrobora con lo obtenido en esta investigación, ya que estas bacterias son microorganismos susceptibles a condiciones extremas, donde no se aporta con un control de factores de crecimiento normales, como el desarrollo anaerobio con CO₂.

4.3 . EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis* EN SALES BILIARES

Como se puede observar en el cuadro 4.2., no presentan diferencias estadísticas en el minuto 0 ($P > 0,05$), sin embargo desde el momento de incubación hasta el

minuto 90 la cepa de *Lactobacillus brevis* (con ausencia de sales biliares) obtuvo un mejor desarrollo que el *Bacillus subtilis* con y sin aplicación de sales biliares y *Lactobacillus brevis* con presencia de sales biliares, donde esta última se destacó en el minuto 120 con un mayor desarrollo que las demás cepas, aprecian diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0,05$) desde el minuto 30 hasta el minuto 120.

Cuadro 4.2. Promedios de medición de supervivencia de cepas de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* en sales biliares de 0 a 120 minutos mediante conteo de UFC (Ver Anexo 9 – Anexo 14).

Microorganismos	Sales Biliares	Minutos				
		0	30	60	90	120
<i>Lactobacillus brevis</i>	Presencia	613,33 A	926,67 A	881,67 AB	659,00 AB	498,67 A
	Ausencia	664,33 A	971,00 A	983,67 A	693,00 AB	439,67 AB
<i>Bacillus subtilis</i>	Presencia	608,33 A	513,67 C	773,67 BC	513,00 B	379,33 AB
	Ausencia	626,67 A	801,00 B	764,33 C	617,33 AB	325,00 B
EE		±20,76	±23,46	±25,43	±36,41	±29,39
P-Valor		0,4541	0,008	0,0600	0,3624	0,9387

A, B y C letras iguales en la misma columna, no difieren estadísticamente según Tukey al 5% de probabilidad

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos por Milián *et al.* (2014) donde expresa que en estudios realizados en cepas de *Bacillus*, mostraron diferencias estadísticas ($P>0,05$) presentando una capacidad alta, media y nula para sobrevivir al efecto de las sales biliares, sin embargo a cepa de *Bacillus subtilis* tuvo un mayor crecimiento que las demás cepas por lo que deducen que es evidente que algunas cepas de *Bacillus spp.* puedan ser susceptibles, entre 20 y 25 %, a los fluidos biliares simulados.

Yegani (2010) y Aguavil (2012) citados por Arteaga *et al.* (2017) indican que las cepas de *Bacillus spp.* provenientes del tracto gastrointestinal de pollos Broiler Ross-308, tienen un buen potencial probiótico en aves con excelentes resultados. Además mencionan que una gran cantidad de las cepas estudiadas mostraron una mayor capacidad de resistencia a esta barrera gástrica, donde según Pérez *et al.* (2011) se debe a la ventaja que presentan estos

microorganismos de soportar pH ácidos y descargas biliares en su paso a través del tracto gastrointestinal de los animales.

Vera *et al.* (2018) concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación donde expone que la implementación de simulaciones de jugo gástrico artificial (sales biliares) a cepas evaluadas de *Lactobacillus plantarum* tuvieron un desarrollo y resistencia favorable hasta el minuto 90, donde se obtuvo un variabilidad de 4,20 - 5,17 log UFC/mL, debido a las condiciones extremas a las que fueron sometidas. Además afirman que la resistencia a sales biliares se debe a que son resistentes a estas condiciones de jugo gástrico artificial, pudiendo atravesar la barrera fisiológica del tracto digestivo donde sus condiciones presentan pH bajos y la acción de enzimas proteolíticas, en este caso la pepsina.

Song *et al.* (2015) afirma que la razón de la resistencia de sales biliares de los *Lactobacillus* se debe a que algunas cepas cuentan con proteínas de choque-ácido que promueven la sobrevivencia; estas son capaces de sobrevivir a ambientes ácidos extremos. Mientras que Vera *et al.* (2018) demostraron que las cepas de *Lactobacillus plantarum* pueden desconjugar a las sales biliares, ya que son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas en ácidos biliares, glicina y taurina.

De la misma manera Lara y Burgos (2012) encontraron resultados en cepas de *Lactobacillus* aislados de aves de corral donde afirman que estos microorganismos presentan diferencias estadísticas entre tratamientos ($P > 0,05$) y se obtuvo un elevado crecimiento a medida que incrementaban los niveles de sales biliares. A raíz de los resultados obtenidos de estos microorganismos nativos son capaces de sobrevivir a concentraciones de sales biliares desde 5% hasta 30%, donde pueden crecer de manera normal desarrollan sus características funcionales sin presencia de inhibición.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

En la presente investigación realizada se obtuvo que las cepas de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* y la mezcla de ambas presentaron diferencia en los halos inhibitorios frente a diferentes métodos de difusión mediante la técnica de Kirby-Bauer a las 24 horas post-incubación, donde tuvo un mayor desarrollo la combinación de *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* por lo que se puede deducir que ambos microorganismos tienen un buen potencial de antagonismo frente a la *Salmonella entérica*.

En la determinación de la curva de crecimiento de las bacterias estudiadas mediante UFC se pudo apreciar que ambas tuvieron un buen desarrollo, donde se destacó el *Lactobacillus brevis* durante las primeras 24 horas respectivamente.

Las cepas de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* estudiados tuvieron un buen desarrollo en presencia y ausencia de sales biliares, destacando las características de supervivencia que tienen estas frente a las barreras gástricas, debido a que estos microorganismos soportan pH ácidos y a proteínas de choque ácido que promueven la supervivencia.

5.2. RECOMENDACIONES

Llevar un control de manejo en el proceso de obtención de cepas y manipulación de las mismas, para evitar alteraciones en su normal funcionamiento y continuar los estudios *in vivo* de estas cepas y su aplicación en diferentes especies de producción y en distintas etapas.

Implementar técnicas de utilización de probióticos (*Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*) como aditivos en alimentación animal en explotaciones pecuarias.

Vincular las cepas específicas con los beneficios declarados, basado en los estudios realizados ya que algunos microorganismos tienen propiedades singulares que pueden explicar ciertas actividades neurológicas, inmunológicas y antimicrobianas, de la misma manera hay mecanismos de la actividad probiótica sean compartidos entre las diferentes cepas, especies, o incluso géneros. Muchos probióticos pueden funcionar de manera similar o distinta con respecto a su capacidad de promover antagonismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. 2013. Programa Nacional Sanitario Avícola. Dirección de Sanidad Animal. (En línea). EC. Consultado 06 de may. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec>
- Aguavil, J. 2012. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas. Tesis previa a la obtención del título de Ing. Agropecuario. Formato PDF. Consultado 22 de jun. 2018. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec>
- Alkhalif, A.; Alhaj, M.; Homidan, I. 2010. Influence of probiotic supplementation on immune response of broiler chicks. *Egyptian Poultry Science*. 30(1):271-80.
- Angel, M. 2013. Uso de probióticos en la nutrición de monogástricos como alternativa para mejorar un sistema de producción. Tesis previa a la obtención del título de Especialista en Nutrición Animal Sostenible. (En línea). Facatativá, CO. Consultado 22 de jun. 2018. Formato PDF. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/>
- Arteaga, F.; López, M.; Laurencio, M.; Rondon, A.; Milian, G.; Barrios, V.; Bocourt, R. 2017. Selección e identificación de aislados de *Bacillus spp.* del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Bolivar, EC. Pastos y Forrajes*. 40 (1): 55-64.
- Betancor, L. y Yim, L. 2012. Salmonella y salmonelosis. Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR. (En línea). Montevideo, UY. Consultado 20 de Jul. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://higiene1.higiene.edu.uy>
- Camelino, S.; Minchiotti, M.; Bariles, R.; Lopez, R.; Colazo, J. 2018. Optimización de un procedimiento para la determinación de oro mediante espectrofotometría UV/Vis. *Rio de Janeiro, BR. Materia*. 23 (2).
- Castañeda, E. y Consuelo, L. 2016. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Bogota, CO. NOVA*. 13 (26): 53-65.
- Capcarova, M.; Weiss, J.; Hrncar, C.; Kolesarova, A.; Pal, G. 2010. Effect of *Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 94(5): 215-224.
- Cerezuela, R. 2012. Nuevos probioticos y prebióticos para Dorada (*Sparus aurata L.*). (En línea). Formato PDF. Consultado 26 de Jun 2019. Disponible en: <https://digitum.um.es/>

- Chaucheyras, F. y Durand, H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. (En línea). Formato PDF. Consultado 22 de Jun 2018. Disponible en: <http://www.wageningen academic.com>
- Chavarrias, M. 2007. Probióticos contra patógenos. (En línea). Consultado 22 de Jun 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.consumer.es>
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. (En línea). Bogotá, CO. Formato PDF. Consultado 22 Jun. 2018. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/>
- Delgado, R. 2016. Probióticos y respuesta inmune. Ciego de Ávila, CU. Revista Acta Médica Del Centro. 10 (4).
- Enríquez, A. 2012. Evaluación Del Efecto De Un Probiótico Nativo Elaborado En Base A *Lactobacillus Acidophilus* Y *Bacillus Subtilis* Sobre El Sistema Gastrointestinal En Pollos Broiler Ross-308 En Santo Domingo De Los Tsáchilas. Tesis. Ing. Agropecuario. ESPE. Santo Domingo de los Tsáchilas EC. p 1.
- Escobar, L.; Rojas, A.; Giraldo, G.; Padilla, L. 2010. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. Armenia, CO. Rev. Invest. Univ. Quindío (20): 42 - 49.
- Ewaschuk, J. y Dieleman, L. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel Discascs. Wworl Journal of Gastroenterology. 12(37): 5941-5950.
- Fernández, K.; Chanci, I.; Wilches, L.; Cardona, J. 2014. Caracterización de los metabolitos de Bacterias Ácido Lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. Medellín, CO. Biosalud. 13 (1): 45- 61.
- Flores, R. 2016. Epizootiología de la Salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias S.A.R.H. Palo Alto, MX. (En línea). Consultado 20 de Jul. 2018. Formato pdf disponible en <http://www.fmvz.unam.mx>
- García, M.; López, Y.; Carcassés, A. 2012. Empleo de probióticos en los animales. (En línea). AR. Consultado 22 de Jun. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>
- García, Y.; García, Y.; Bocourt, R. 2014. Instituto de Ciencia Animal de la Habana. Departamento de Ciencias Biofísicas. Los probióticos como alimento funcional. (En línea). Consultado 22 de jun. 2018. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/>

- González, F. 2011. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencia sobre efectos hipocolesterolemicos. (En línea). Consultado 22 de Jun 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://respyn.uanl.mx/>
- González, G. 2009. *Bacillus subtilis* se considera seguro para pollos de engorde, para el consumidor y para el medio ambiente. (En línea). Consultado 22 de Jun 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://albeitar.portal.veterinaria.com/>
- González, T.; González, A.; Guerrero, I.; Zamudio, M. 2016. Evaluación de la actividad probiótica *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas de sustratos nativos del estado de Yucatán. (En línea). Formato PDF. Disponible en: <https://smbb.mx/>
- Hansen, C. 2011. Probióticos: componentes claves de la producción animal moderna. MX. Revista Claridades Agropecuarias. (217): 29-36.
- Hernández, C.; Aguilera, M.; Castro, G. 2013. Situación de las enfermedades gastrointestinales. (En Línea). MX. Consultado, 6 de May. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/>
- Herrera, B. y Jabid, R. 2015. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. REDVET Rev. Electrónica Veterinaria. 16 (1).
- Higgins, S.; Higgins, A.; Wolfenden, S.; Henderson, A.; Torres, G.; Hargis. B. 2008. Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella Enteritidis* in neonatal broiler chicks. Poult. Sci. 87:27–31.
- John, L.; Ingraham, A. 2013. Lactobacilo. EC. Consultado el 20 de jun. de 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.salud180.com/>
- Jurado, H.; Aguirre, D.; Ramírez, C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. Cordova, CO. Revista MVZ. 14: 1723-1725.
- Jurado, H.; Romo S.; Benavides V. 2012. Evaluación del efecto probiótico de *Lactobacillus plantarum* en la alimentación de lechones en base de precebo como precebo como una alternativa del uso de antibióticos. CO. Revista Investigación Pecuaria. 2: 55-62.
- Kabir, S. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. Int J Mol Sci. 10(8):3531-46.
- Koneman, E. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Buenos Aires, AR. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Král, M.; Angelovicová, M.; Alfaig, E.; Walczycka, M. 2013. Meat quality of broiler chickens fed diets with bacillus subtilis and malic acid additives. Scientific Papers. Animal Science and Biotechnologies. 46(2):375-8.

- Lara, C. y Burgos, A. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Córdoba, CO. Revista Colombiana de Biotecnología. 14 (1) 31- 40.
- López, M. y Domingo, D. 2007. Antibioticoterapia con probióticos. ES. Rev Esp Quimioterap. 20 (2): 170-181.
- Milián, G.; Rondón, A.; Pérez, M.; Samaniego, L.; Riaño, J.; Bocourt, R.; Ranilla, M.; Carro, M.; Rodríguez, M.; Laurencio, M. 2014. Aislamiento e identificación de *Bacillus spp.* en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. Matanzas, CU. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48 (4): 347-351.
- Mookiah, C.; Sieo, K.; Ramasamy, N.; Abdullah, Y. 2014. Who Effects of dietary prebiotics, probiotic and symbiotic on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens J. Sci. Food Agric. pp. 341-348
- Oliveira J.; Van Der Hoeven-Hangoor E.; Van De Linde, I.; Montijn, R.; Van Der Vossen J. 2014. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. Poult Sci. 93 (4): 818-29.
- Ortiz, A. 2007. Tesis: Evolución de la capacidad prebiótica *in vitro* de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. (En línea). Bogota, CO. Consultado 22 de jun. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/>
- Pavlova, S.; Kilic, A.; Kilic, S.; Nader, M.; Simoes, J.; Tao, L. 2012. Diversidad genética de los lactobacilos vaginales de las mujeres en los diferentes países basada en el 16S rRNA secuencias de genes. Revista de Microbiología Aplicada. 92: 451-459.
- Pelicano, E.; De Souza, P.; De Souza, H.; Oba, A.; Norkus, E.; Kodawara, L.; De Lima, T. 2003. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. Rev Bras Cienc Avic.5 (3):207-14.
- Pérez, J.; Rocha, E.; Uzcategui, D.; Aranguren, J.; Machado, E. 2015. Aislamiento, selección y caracterización de cepas del género *Lactobacillus* aisladas de líquido ruminal vacuno en la zona sur del lago, Venezuela. (En Línea). CO. Revista Colombia Cienc Anim. 7: 165-170.
- Pérez, M.; Laurencio, M.; Rondón, A.; Milián, G.; Bocourt, R.; Arteaga, F. 2011. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. Matanzas, CU. Rev. Salud Anim. 33 (3): 147-153.
- Pidoux, M. 1989. "La flora microbiana de cereales azucarados kéfir (la planta gingerbeer): biosíntesis del grano de *Lactobacillus hilgardii* producir un gel polisacárido". MIRCEN. Revista de Microbiología Aplicada y Biotecnología. 5 (2): 223-238.

- Ramírez, F. 2010. Aislamiento de bacterias *Lactobacillus s.p* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*. (En línea). Bogotá, CO. Consultado, 2 de jun. 2019. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/>
- Rebolledo, M.; Rojas, E.; Salgado, F. 2013. Efecto de Dos Probióticos que Contienen Cepas de *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* y *Lactobacillus johnsonii* sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*. Concepción, CL. Revista Int. J. Odontostomat. 7 (3): 415 -419.
- Rincón, D.; Ramírez, R.; Vargas, J. 2011. Transmisión de *Salmonella entérica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. Tunja, CO. Revista Salud UIS. 43 (2): 167 -177.
- Rodríguez, V. y Guerrero, J. 2010. Probióticos resistencia gastrointestinal y microencapsulación. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 4 (2): 48-57.
- Rondón, A.; Florido, G.; Samaniego, L.; Bocourt, R.; Laurencio, M.; Socorro, M.; Pérez, M. 2009. Efecto de lactobacilos probióticos en la reducción de bacterias patógenas en el tracto digestivo de pollos. Universidad de Matanzas, La Habana, Cuba.
- Rosmini, M.; Sequeira, G.; Legarreta, I.; Martí, L.; Santina, R.; Frizzo, L. & Bonazza, J. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. MX. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Revista FAVE- Ciencias Veterinarias. 5: 1-2.
- Sánchez, L.; Vichi, J.; Llanes, M.; Castro, E.; Soler, D.; Espinoza, I.; Kociubinski, G.; Ferreira, C. 2011. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidato a probióticas. La Habana, CU. Rev. Salud Anim. 33 (3): 154-160.
- Segura, J.; Olivares, A.; López, B. 2013. Probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición porcina. Avances Tecnología Porcina. (9): 33 - 39.
- Song, M.; Yun, B.; Moon, J. Park, D.; Lim, K. & Oh, S. 2015. Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. Korea, JP. Korean J Food Sci An. 35 (4):551.
- Toledo, I. 2015. Comportamiento postdestete de cabritos estabulados expuestos a la infección por *Eimeria spp.* y suplementados con probióticos en la dieta. Tesis previa a la obtención del título de Ing. en producción animal. (En línea). MX. Formato PDF. Consultado 22 de jun. 2018. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/>
- Vázquez, J. 2013. Uso de probióticos en la alimentación con suero de leche en cerdos al destete. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo Zootecnista. (En línea). MX. Consultado 22 de jun. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://ninive.uaslp.mx/>

- Vélez, J.; Gutiérrez, L.; Montoya, O. 2015. Evaluación de la actividad bactericida de Bacterias Ácido Lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. Medellín, CO. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 68 (1): 7481- 7486.
- Vera, R.; Ormaza, J.; Muñoz, J.; Arteaga, F.; Sánchez, L. 2018. Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. Bolívar, EC. Revista de Salud Animal. 40 (2): 1 -12.
- Wirz, M. 2017. Uso de probióticos en animales. (En línea). Consultado 22 de jun. 2018. Disponible en: <http://www.microorganismos-efectivos.com/>
- Yamawaki, R.; Milbradt, E.; Coppola, M.; Rodríguez, J.; Andreatti, R.; Padovani, C.; Okamoto, A. 2013. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus spp.* in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella enteritidis* after hatch. Poult Sci. 92(6):1560-3.
- Yirga, H. 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. School of Animal and Range Science. (En línea). Consultado 22 de jun. 2018. Formato PDF. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/>
- Zamudio, K. 2005. Lactobacilos nativos productores de Exopolisacáridos de interés biotecnológico. (En línea). Lima, PE. Consultado, 26 de jun. 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe>

ANEXOS

Anexo 1. Adecuación del Laboratorio de Biología Molecular**Anexo 2. Preparación de Caldo Nutriente para para la activación de las cepas *Bacillus***

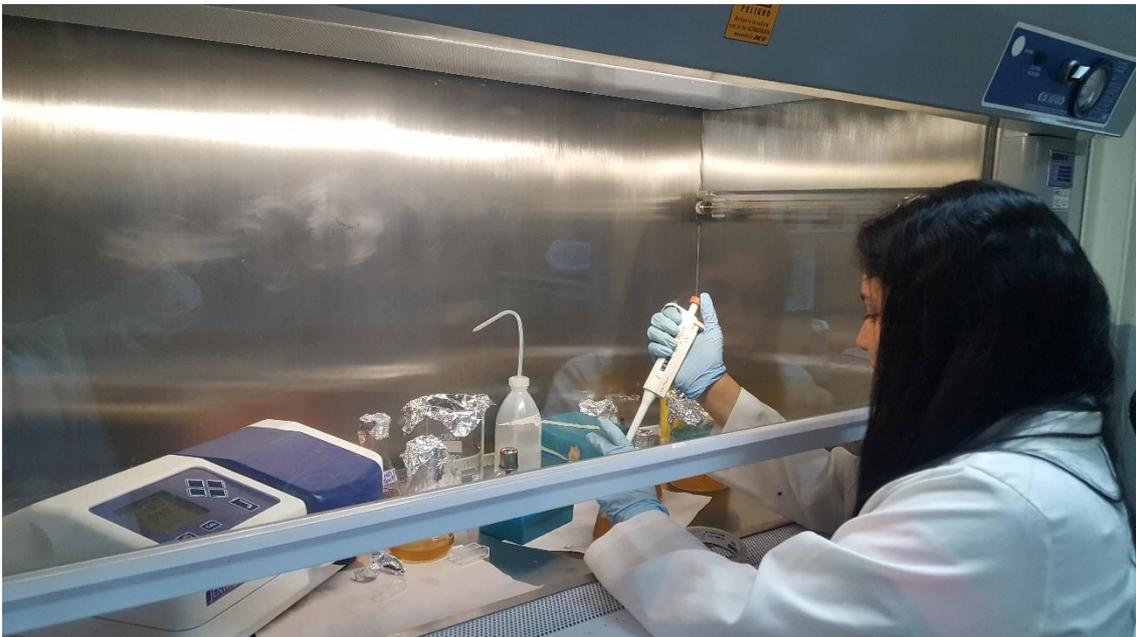
Anexo 2-B. Preparación de Caldo Lactobacilli MRS para para la activación de las cepas *Lactobacillus*



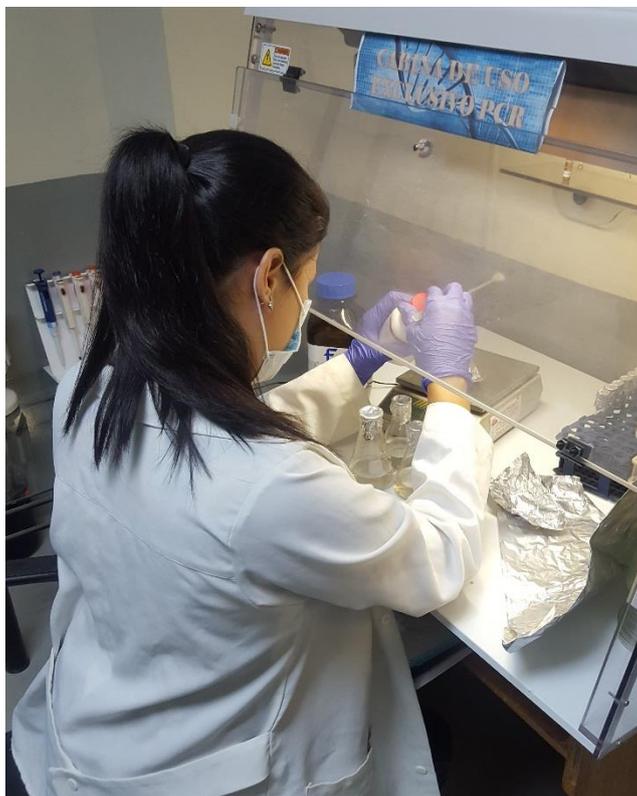
Anexo 3. Aplicación del tratamiento inhibición en el enfrentamiento de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* frente a *Salmonella* entérica.



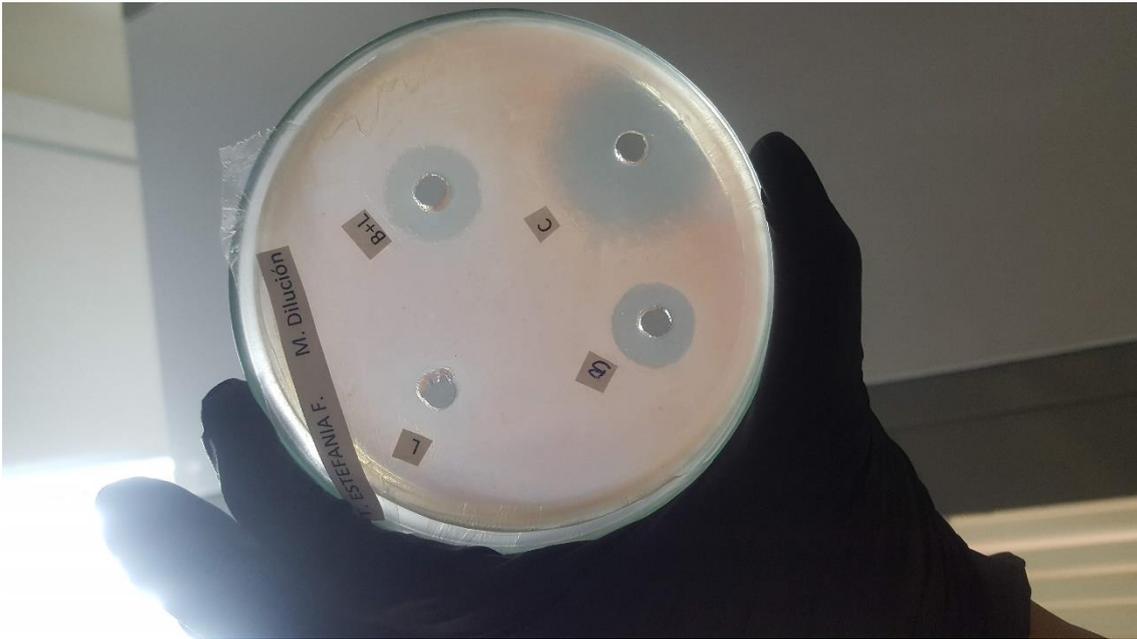
Anexo 4. Aplicación del tratamiento de curva de crecimiento de microorganismos beneficios (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*).



Anexo 5. Aplicación del tratamiento de supervivencia de microorganismos beneficios (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares.



Anexo 6. Medición del diámetro de los halos de inhibición mediante técnica de Kirby-Bauer



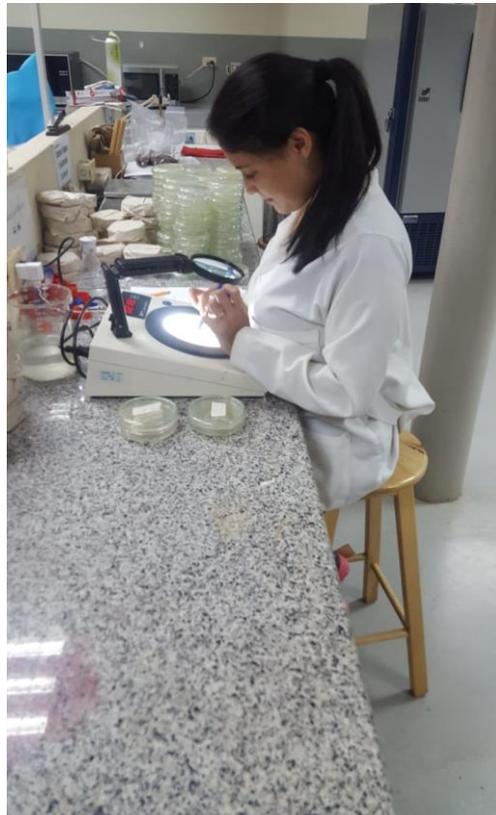
Anexo 7. Medición de la Absorbancia de la curva de crecimiento mediante espectrofotometría UV



Anexo 8-A. Medición de UFC para la determinación de supervivencia de microorganismos benéficos en sales biliares



Anexo 8-B. Medición de UFC para la determinación de supervivencia de microorganismos benéficos en sales biliares



Anexo 9. Análisis de varianza de la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* y la mezcla *Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*) frente a *Salmonella* entérica

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro	27	0,76	0,66	14,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	460,00	8	57,50	7,25	0,0003
Microorganismo	74,89	2	37,44	4,72	0,0224
Metodo	32,00	2	16,00	2,02	0,1618
Microorganismo*Metodo	353,11	4	88,28	11,14	0,0001
Error	142,67	18	7,93		
Total	602,67	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,38709

Error: 7,9259 gl: 18

Microorganismo	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis + Bac..	21,44	9	0,94 A
Bacillus subtilis vs Salmo..	18,22	9	0,94 A B
Lactobacillus brevis vs Sa..	17,67	9	0,94 B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,38709

Error: 7,9259 gl: 18

Metodo	Medias	n	E.E.
Filtracion	20,44	9	0,94 A
Directo	19,11	9	0,94 A
Dilucion	17,78	9	0,94 A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,05427

Error: 7,9259 gl: 18

Microorganismo	Metodo	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis + Bac..	Filtracion	29,33	3	1,63 A
Lactobacillus brevis vs Sa..	Directo	22,00	3	1,63 A B
Bacillus subtilis vs Salmo..	Dilucion	18,33	3	1,63 B C
Bacillus subtilis vs Salmo..	Filtracion	18,33	3	1,63 B C
Bacillus subtilis vs Salmo..	Directo	18,00	3	1,63 B C
Lactobacillus brevis + Bac..	Dilucion	17,67	3	1,63 B C
Lactobacillus brevis vs Sa..	Dilucion	17,33	3	1,63 B C
Lactobacillus brevis + Bac..	Directo	17,33	3	1,63 B C
Lactobacillus brevis vs Sa..	Filtracion	13,67	3	1,63 C

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

Anexo 10. Análisis de varianza de la supervivencia de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares al minuto 0

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	12	0,36	0,12	5,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5771,00	3	1923,67	1,49	0,2898
SB	3605,33	1	3605,33	2,79	0,1335
BACTERIA	1365,33	1	1365,33	1,06	0,3342
SB*BACTERIA	800,33	1	800,33	0,62	0,4541
Error	10342,67	8	1292,83		
Total	16113,67	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=47,87080

Error: 1292,8333 gl: 8

SB	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	645,50	6	14,68 A
Sales Biliares	610,83	6	14,68 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=47,87080

Error: 1292,8333 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis	638,83	6	14,68 A
Bacillus subtilis	617,50	6	14,68 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=94,01447

Error: 1292,8333 gl: 8

SB	BACTERIA	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	Lactobacillus brevis	664,33	3	20,76 A
Sin Sales B	Bacillus subtilis	626,67	3	20,76 A
Sales Biliares	Lactobacillus brevis	613,33	3	20,76 A
Sales Biliares	Bacillus subtilis	608,33	3	20,76 A

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

Anexo 11. Análisis de varianza de la supervivencia de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares al minuto 30

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	12	0,97	0,95	5,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	381705,58	3	127235,19	77,07	<0,0001
SB	82502,08	1	82502,08	49,97	0,0001
BACTERIA	254916,75	1	254916,75	154,41	<0,0001
SB*BACTERIA	44286,75	1	44286,75	26,83	0,0008
Error	13207,33	8	1650,92		
Total	394912,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=54,09561

Error: 1650,9167 gl: 8

SB	Medias	n	E.E.	
Sin Sales B	886,00	6	16,59	A
Sales Biliares	720,17	6	16,59	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=54,09561

Error: 1650,9167 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.	
Lactobacillus brevis	948,83	6	16,59	A
Bacillus subtilis	657,33	6	16,59	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=106,23950

Error: 1650,9167 gl: 8

SB	BACTERIA	Medias	n	E.E.	
Sin Sales B	Lactobacillus brevis	971,00	3	23,46	A
Sales Biliares	Lactobacillus brevis	926,67	3	23,46	A
Sin Sales B	Bacillus subtilis	801,00	3	23,46	B
Sales Biliares	Bacillus subtilis	513,67	3	23,46	C

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

Anexo 12. Análisis de varianza de la supervivencia de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares al minuto 60

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	12	0,86	0,81	5,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	96097,00	3	32032,33	16,51	0,0009
SB	6440,33	1	6440,33	3,32	0,1060
BACTERIA	80360,33	1	80360,33	41,41	0,0002
SB*BACTERIA	9296,33	1	9296,33	4,79	0,0600
Error	15524,67	8	1940,58		
Total	111621,67	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=58,64967

Error: 1940,5833 gl: 8

SB	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	874,00	6	17,98 A
Sales Biliares	827,67	6	17,98 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=58,64967

Error: 1940,5833 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis	932,67	6	17,98 A
Bacillus subtilis	769,00	6	17,98 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=115,18332

Error: 1940,5833 gl: 8

SB	BACTERIA	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	Lactobacillus brevis	983,67	3	25,43 A
Sales Biliares	Lactobacillus brevis	881,67	3	25,43 A B
Sales Biliares	Bacillus subtilis	773,67	3	25,43 B C
Sin Sales B	Bacillus subtilis	764,33	3	25,43 C

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

Anexo 13. Análisis de varianza de la supervivencia de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares al minuto 90

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	12	0,63	0,50	10,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54914,25	3	18304,75	4,60	0,0374
SB	14352,08	1	14352,08	3,61	0,0940
BACTERIA	36852,08	1	36852,08	9,27	0,0160
SB*BACTERIA	3710,08	1	3710,08	0,93	0,3624
Error	31812,67	8	3976,58		
Total	86726,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=83,95653

Error: 3976,5833 gl: 8

SB	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	655,17	6	25,74 A
Sales Biliares	586,00	6	25,74 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=83,95653

Error: 3976,5833 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis	676,00	6	25,74 A
Bacillus subtilis	565,17	6	25,74 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=164,88399

Error: 3976,5833 gl: 8

SB	BACTERIA	Medias	n	E.E.
Sin Sales B	Lactobacillus brevis	693,00	3	36,41 A
Sales Biliares	Lactobacillus brevis	659,00	3	36,41 A B
Sin Sales B	Bacillus subtilis	617,33	3	36,41 A B
Sales Biliares	Bacillus subtilis	513,00	3	36,41 B

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

Anexo 14. Análisis de varianza de la supervivencia de microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) en sales biliares al minuto 120

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	12	0,71	0,60	12,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	50716,67	3	16905,56	6,52	0,0153
SB	9633,33	1	9633,33	3,72	0,0900
BACTERIA	41067,00	1	41067,00	15,85	0,0041
SB*BACTERIA	16,33	1	16,33	0,01	0,9387
Error	20734,00	8	2591,75		
Total	71450,67	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=67,77913

Error: 2591,7500 gl: 8

SB	Medias	n	E.E.
Sales Biliares	439,00	6	20,78 A
Sin Sales B	382,33	6	20,78 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=67,77913

Error: 2591,7500 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
Lactobacillus brevis	469,17	6	20,78 A
Bacillus subtilis	352,17	6	20,78 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=133,11285

Error: 2591,7500 gl: 8

SB	BACTERIA	Medias	n	E.E.
Sales Biliares	Lactobacillus brevis	498,67	3	29,39 A
Sin Sales B	Lactobacillus brevis	439,67	3	29,39 A B
Sales Biliares	Bacillus subtilis	379,33	3	29,39 A B
Sin Sales B	Bacillus subtilis	325,00	3	29,39 B

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