



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

CARRERA DE PECUARIA

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

TEMA:

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc 41 Y Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH, TEMPERATURA Y SALES BILIARES

AUTORES:

EDISON STALIN VÉLEZ ARTEAGA

JOEL SMITH MENÉNDEZ AVEIGA

TUTOR:

DR. RONALD RENE VERA MEJIA, Mg. Sc.

CALCETA, NOVIEMBRE 2018

DERECHOS DE AUTORÍA

Edison Stalin Vélez Arteaga y Joel Smith Menéndez Aveiga, declaran bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos 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.

EDISON S. VÉLEZ ARTEAGA

172386250-2

JOEL S. MENÉNDEZ AVEIGA

131499471-4

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Ronald Rene Vera Mejía certifica haber tutelado la tesis **DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE CEPAS *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc Y 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH, TEMPERATURA Y SALES BILIARES**, que ha sido desarrollada por Edison Stalin Vélez Arteaga y Joel Smith Menéndez Aveiga, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

DR. RONALD R. VERA MEJÍA, Mg. Sc.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** la tesis **DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE CEPAS *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc Y 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH, TEMPERATURA Y SALES BILIARES**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Edison Stalin Vélez Arteaga y Joel Smith Menéndez Aveiga, previa la obtención del título de Médico Veterinario de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** 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

Esta historia, que no es mía a plenitud, no fue el resultado de la coincidencia o de suerte, cada peldaño vencido, fue construido sobre el cariño, la confianza, esfuerzo y el apoyo de muchos y muchas a los que amo, por esto agradezco a:

A Dios, mi creador y motor fundamental en mi vida por permitirme seguir adelante a pesar de todos los contratiempos que han llegado a mi vida y me han permitido hacerme más fuerte y menos vulnerable frente a las pruebas que la vida me pone día a día en el camino y darme cuenta de que no son pruebas sino bendiciones que hacen que mejore como ser humano.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” por ser el motor que brindó empuje a las turbinas que transformaron mi ímpetu y conocimiento en ciencia y poder, con la capacidad de mejorar la calidad de vida de nuestra tierra y haber podido conocer a excelentes personas y amigos como el Ing. Carlos Octavio Larrea Izurieta y Dr. Ronald Rene Vera Mejía que con su ayuda pude culminar uno de tantos sueños anhelados.

A mis padres Edison Vélez Vélez y Concepción Arteaga Vera, por la valentía, esfuerzo y amor desmedido al traerme al mundo, y por la sabiduría de romper los límites de la pobreza y enseñarme a no tener miedo a ser vencido sin dar una buena lucha. A mi abuela Filerma Vélez, por su rol de madre sacrificada conmigo mientras estuvo a mi lado, por su apoyo constante y su amor desmedido quien desde el cielo me acompaña en mí andar, en cada triunfo y cada derrota.

De manera especial a Mérelyn Bazurto Carraza, por su dedicación y amor en el día a día brindándome su paciencia y apoyo cada vez que lo necesitaba, ya que con su ejemplo de alegría desmedida y valores humanos, ha sabido caminar a mi lado y convertirse en mi compañera de mi vida.

EDISON S. VÉLEZ ARTEAGA

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Manabí “Manuel Félix López” que me dio a oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A Dios por darme el don de la vida, a mis padres por el apoyo incondicional que me brindaron durante la trayectoria estudiantil.

JOEL S. MENÉNDEZ AVEIGA

DEDICATORIA

Desde mi criterio personal, la elaboración de una tesis de grado es mucho más que una idea argumentada y llevada a la materialización mediante un proceso de trabajo; esta tesis es para mí el resultado de una inexplicable amalgama de esfuerzo, sacrificio, constancia y tolerancia, pero sobre todo es el despliegue de la maravillosa pasión de amar lo que se hace.

Y es justamente en el umbral del camino, rumbo a la meta anhelada en donde es preciso detener el paso y volver la vista atrás, no para interrumpir el objetivo, todo lo contrario, aquella mirada al pasado nos dará la oportunidad de esculpir nuestra alma y jamás olvidar a quienes confiaron y amaron mi vocación, por eso hoy dedico cada noche de desvelo, cada lágrima derramada, cada sonrisa satisfactoria, cada mirada visionaria a ustedes; quienes merecen laureles de gloria. Dedico esta tesis de grado, que es parte importante de mi vida:

A Dios, creador del cielo y las maravillas de la tierra y horrores como los errores ortográficos.

A mis padres Edison Vélez Vélez y Concepción Arteaga Vera, ambos mi mayor ejemplo de superación, quienes le demuestran al mundo que la pobreza no es el límite para los sueños. A mi abuela-madre Filerma Vélez, mi ángel protector.

De manera especial a Mérelyn Bazurto Carraza, por su dedicación y amor en el día a día brindándome su paciencia y apoyo cada vez que lo necesitaba, ya que con su ejemplo de alegría desmedida y valores humanos, ha sabido caminar a mi lado y convertirse en mi compañera de mi vida.

A mi Alma Mater, ESPAM M. F. L., cuna de ciencia, tecnología, y valores, donde me permitió conocer personas que me ayudaron a crecer como persona y profesional.

EDISON S. VÉLEZ ARTEAGA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado a vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Mi madre Narciza Aveiga por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

JOEL S. MENÉNDEZ AVEIGA

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
Carátula.....	i
Derecho de autoría.....	ii
Certificación del tutor.....	iii
Aprobación del tribunal.....	iv
Agradecimiento.....	v
Dedicatoria.....	vii
Contenido General.....	ix
Contenido de Cuadros y figuras.....	xii
Resumen.....	xiv
Palabras clave.....	xiv
Abstract.....	xv
Key words.....	xv
 CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	 1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS, PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER	5
 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	 6

	x
2.1. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS	6
2.1.1. LACTOBACILOS	7
2.1.2. CARACTERES MORFOLÓGICOS	7
2.2. PROBIÓTICOS	8
2.3. ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	10
2.4. PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS PROBIÓTICOS	10
2.5. MICROORGANISMOS EMPLEADOS COMO PROBIÓTICOS	11
2.6. MICROBIOTA INTESTINAL	11
2.6.1. CARACTERÍSTICA DE LA FLORA INTESTINAL	12
2.7. ESPECTROFOTOMETRÍA	12
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO	13
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	13
3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS	13
3.3. DURACIÓN	13
3.4. FACTORES EN ESTUDIO	13
3.5. TRATAMIENTOS	14
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
3.7. ADEVA	15
3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL	16
3.9. VARIABLES EN ESTUDIO	16
3.9.1. VARIABLE INDEPENDIENTE	16
3.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES	17
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
3.11. PROCEDIMIENTO	17
3.11.1. AMBIENTACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR	17

3.11.2. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc)	17
3.11.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS Y SIEMBRA DE BACTERIAS	17
3.11.4. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	18
3.11.5. EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH	18
3.11.6. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) EN SALES BILIARES	19
3.11.7. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO	19
3.12. TÉCNICA ESTADÍSTICA	19
3.12.1. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS	20
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 . EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	21
4.2 . EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH	23
4.3 . EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> (22 Lmc & 41 Lmc) EN SALES BILIARES	26
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
5.1. CONCLUSIONES	29
5.2. RECOMENDACIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	36

CONTENIDO DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 3.1.	Características climáticas.	13
Cuadro 3.2.	Tratamientos	14
Cuadro 3.3.	ADEVA del factor temperatura	15
Cuadro 3.4.	ADEVA del factor pH	16
Cuadro 3.5.	ADEVA del factor sales biliares	16
Cuadro 4.1.	Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura	22
Cuadro 4.2.	Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH	24
Cuadro 4.3.	Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 3 y 6 horas de cultivación con/sin la aplicación de sales biliares (Oxgall al 0,3%)	27

CONTENIDO DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 4.1.a.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 24 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura.	22
Gráfico 4.1.b.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura.	23
Gráfico 4.2.a.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 24 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH.	25

Gráfico 4.2.b.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH.	25
Gráfico 4.3.a.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 3 y 6 horas de cultivación con la aplicación de sales biliares (Oxgall al 0,3%).	27
Gráfico 4.3.b.	Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> a las 3 y 6 horas de cultivación sin la aplicación de sales biliares (Oxgall al 0,3%).	28

RESUMEN

Se determinó el crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) por medio de fórmulas de estadística no descriptiva, se utilizó un DCA con arreglo bifactorial, para la temperatura se utilizaron 6 tratamientos con 4 repeticiones; para pH se utilizaron 10 tratamientos con 4 repeticiones y para el efecto las sales biliares se utilizaron 4 tratamientos y 12 repeticiones; las cepas fueron medidas por Densidad Óptica (DO) mediante un espectrofotómetro UV de marca JENWAY 6305 a una longitud de onda de 560 nm y con un factor de 0,9; a 3 niveles de temperatura, donde ambas cepas tuvieron un crecimiento favorable entre 30°C a 45°C a las 24 y 48 horas siendo su pico más alto de desarrollo a 45°C. De la misma manera, en la determinación de crecimiento de las cepas a diferentes niveles de pH el punto más alto de crecimiento fue a 4,0 en ambas cepas, desarrollándose también de manera favorable en los niveles 7,5 – 6,7 – 3,4. Para el cálculo a la resistencia a sales biliares, a las 3 y 6 horas las cepas 41 Lmc y 22 Lmc obtuvieron un mayor desarrollo en presencia de sales biliares que en ausencia de la misma, destacándose más la cepa 41 Lmc. Se concluye que hubo una supervivencia y crecimiento favorable en los diferentes niveles de temperatura, pH y sales biliares establecidos, lo que indicaría que las cepas podrían ser utilizadas para la elaboración de biopreparados con potencial probiótico con fines en la producción animal.

PALABRAS CLAVES

Densidad Óptica (DO), espectrofotómetro, factor, probiótico, longitud de onda.

ABSTRACT

The growth of strains of *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc and 41 Lmc) was determined by non-descriptive statistical formulas, a DCA was used with a bifactorial arrangement, for the temperature 6 treatments with 4 repetitions were used; for pH, 10 treatments with 4 repetitions were used and for the effect the bile salts were used 4 treatments and 12 repetitions; the strains were measured by Optical Density (OD) by means of a JENWAY 6305 UV spectrophotometer at a wavelength of 560 nm and a factor of 0.9; at 3 temperature levels, where both strains had favorable growth between 30 ° C to 45 ° C at 24 and 48 hours, with their highest development peak at 45 ° C. In the same way, in the determination of the growth of the strains at different pH levels, the highest point of growth was 4.0 in both strains, also developing favorably in the levels 7.5 - 6.7 - 3.4. For the calculation of resistance to bile salts, at 3 and 6 o'clock the strains 41 Lmc and 22 Lmc obtained a greater development in the presence of bile salts than in the absence thereof, with the 41 Lmc strain being more prominent. It is concluded that there was a favorable survival and growth in the different levels of temperature, pH and established bile salts, which would indicate that the strains could be used for the preparation of biopreparations with probiotic potential for animal production purposes.

KEY WORDS

Optical Density (OD), spectrophotometer, factor, probiotic, wave.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El inadecuado uso y dosis de antibióticos frente a retos sanitarios con bacterias patógenas que atacan al tracto gastrointestinal ha conllevado a la resistencia de cepas, elevando su nivel de patogenicidad y trayendo implicaciones negativas en la salud animal (Jurado *et al.*, 2009).

El Consejo de la Unión Europea en el 2006 prohibió el uso de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en animales, por su capacidad de crear resistencias cruzadas con los antibióticos que se utilizan en la medicina humana, determinó además, que los APC pueden causar daños a consumidores a través de alteraciones de las características de los productos animales con residuos inaceptables de estos compuestos en carnes, leche o huevos (Cepero, 2006).

En busca de alternativas al uso de los APC se realizan investigaciones encaminadas a evaluar aditivos que, utilizados en determinadas dosis, contribuyan a mejorar los indicadores productivos (Santomá *et al.*, 2006).

Con el pasar de los años el desarrollo de los probióticos ha obedecido la necesidad de sustituir el uso de antibióticos en la alimentación animal, los cuales cumplen la función de mantener un buen balance en la microflora del tracto gastrointestinal y erradicar bacterias patógenas reduciendo en cantidades significativas de enfermedades gastrointestinales en animales. Sin embargo, los antibióticos no sólo contribuyen a veces a la destrucción de la microflora intestinal patógena, sino que también, producen efectos residuales o resistencias en los productos de origen animal (Ávila, 2010).

De acuerdo a la literatura reportada se considera que la importancia de los probióticos dentro de la alimentación animal contribuye a un balance nutricional y productivo del animal, elevando el mejoramiento de explotaciones pecuarias dando realce a empresas y/o entidades que la utilicen. Estas referencias permiten plantear la siguiente interrogante: ¿cuáles son las características que

hacen idóneos a las cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) para ser utilizados como probióticos en producción animal?.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Flores (2015) menciona que la necesidad de controlar las patologías digestivas en los sistemas de producción pecuaria conlleva a la utilización masiva de antibióticos como aditivos alimenticios. Sin embargo, el uso de antimicrobianos en dosis bajas en la alimentación de animales que se destinan al consumo humano, con el fin de mejorar el crecimiento y prevenir patologías, se relaciona con la resistencia a los antimicrobianos. A nivel mundial, varias jurisdicciones han respondido al restringir el uso de estos productos.

El emplear probióticos como aditivos microbianos vivos es una alternativa que beneficia a la salud del animal, ya que mejora el equilibrio microbiano intestinal. La mayor problemática que se presenta dentro de la aplicación de los probióticos es el costo, la viabilidad de los microorganismos y la variabilidad de los resultados en los animales (Flores, 2015).

Ávila (2010) señala que se ha demostrado que los probióticos tienen un buen potencial para reducir las enfermedades entéricas en animales. El estrés que se presenta en animales jóvenes en explotaciones pecuarias se debe principalmente a la presencia de bacterias, patógenas o no, que colonizan el intestino. Esta situación afecta el rendimiento animal, y a su vez motiva a la búsqueda de nuevas alternativas de control para enfrentar estos retos.

Sánchez (2011) deduce que el uso de los lactobacilos como probióticos en los últimos años cobra un interés creciente debido a sus propiedades benéficas en animales y humanos. Sin embargo, en explotaciones ecuatorianas no se usan ampliamente los aditivos microbianos. Al parecer comienzan a realizarse evaluaciones y trabajos donde se demuestran beneficios dentro del de probióticos (Flores, 2015).

Ante la realidad y tomando en consideración lo citado antes por autores mencionados, se puede percatar que la importancia de los *Lactobacillus* en la microflora intestinal es relativamente alta, y la determinación de crecimiento en diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares de estas cepas autóctonas se dará con fin productivo, ya que el uso de estos microorganismos como

probióticos ayudan a elevar y/o mantener en un nivel óptimo el tracto gastrointestinal beneficiando al animal y propietario elevando la producción.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el crecimiento de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) a diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares mediante espectrofotometría UV.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) a diferentes niveles temperaturas controladas.

Evaluar la supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) a diferentes niveles de pH controlados.

Evaluar el crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) en sales biliares.

1.4. HIPÓTESIS

La determinación de crecimiento de cepas *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) a diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares permitirá el conocimiento de las condiciones óptimas de estos factores, para la elaboración de biopreparado con potencial probiótico con fines en la producción animal.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microbios benéficos de forma bacilar o cocoide, Gram positivos heterogéneos, no patógenos, no toxigénicas, fermentadoras, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos. Además tienen rasgos muy comunes como el ser aerotolerantes, no forman esporas, no reducen el nitrato y no producen pigmentos (Sánchez y Tromps, 2014).

Grupo Aula Médica (2013) deduce que además son considerados probióticos ya que estimulan de una manera benéfica a un buen balance de tracto gastrointestinal previniendo alteraciones gastrointestinales. Bacterias del género *Lactobacillus* de interés particular por su larga historia de uso como probióticos (Fina *et al.*, 2017).

El uso de bacterias ácido lácticas se ha tomado gran importancia en los últimos años debido a la capacidad para controlar microorganismos patógenos (Ruiz *et al.*, 2017) y a su vez tiene capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias patógenas que alteren la materia prima de los alimentos, que podrían convertirse en la flora predominante de algunos productos (Agudelo *et al.*, 2015). Además han adquirido una serie de procesos que las hacen más combatientes con otros microorganismos que la denominan como una bacteria autóctona del tracto gastrointestinal (Selle y Klaenhammer, 2013 citado por Jurado *et al.*, 2016).

Piñero (2013) manifiesta que las investigaciones sobre bacterias ácido lácticas han ido evolucionando con el pasar de los años, llegando a utilizarla en campos como en la tecnología de campos alimenticios en: la formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos en alimentos, gelificación de la leche, formación de aromas, producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos, proteólisis requerida en la maduración de los quesos, y en salud humana y animal utilizados como aditivos microbianos (probióticos).

Dentro de las bacterias ácido lácticas, se encuentra un grupo de microbios fermentadores (aerobios o anaerobios facultativos) de azúcares como glucosa, y lactosa para a partir de éstos formar ácido láctico como: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* (anaerobios) y *Bifidobacterium*, (aerobio). Los ácidos orgánicos producidos por estas bacterias cumplen la función de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes en los alimentos fermentados (Del Campo *et al.*, 2008).

2.1.1. LACTOBACILOS

Los lactobacilos son uno de los grupos de bacterias más grande dentro de los laboratorios con especies que generalmente son muy ácido-tolerantes. El *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* se suelen encontrar en diferentes hábitats, mientras que otros lactobacilos solo se pueden encontrar en ambientes específicos tales como *Lactobacillus sanfransiscensis* y *Lactobacillus delbrueckii* (Pasanen, 2007).

Los *Lactobacillus plantarum* son bacterias que tienen un uso benéfico en el tracto gastrointestinal de los animales domésticos, fortaleciendo la actividad del tracto gastrointestinal sin cambiar o alterar las normales funciones del organismo. Estos microorganismos se denominan probióticos (Guevara, 2011 citado por Jurado *et al.*, 2014). Además ciertas bacterias ácido lácticas como los *L. plantarum* tienen beneficios dentro del huésped, como lo es la baja de los niveles de colesterol (Jurado *et al.*, 2015).

2.1.2. CARACTERES MORFOLÓGICOS

Los *Lactobacillus* son bacterias caracterizadas por ser células que tienen una morfología de bacilos largos y extendidos, aunque también se pueden encontrar de forma de coco bacilos, que se pueden presentar en formas de cadenas y sin movilidad por lo cual pueden llegar a ser confundidos con otras bacterias aisladas en materiales clínicos, al igual que pueden encontrarse con movilidad por la presencia de flagelos (Samaniego y Sosa, 2000).

Las bacterias de los *Lactobacillus* son parte de la familia de los *Lactobacillaceae*. Son bacilos de forma larga y fina, algunos pueden presentarse de forma curvada

o corta y morfología cocobacilar corniforme, encontradas en forma de cadenas. Su tamaño longitudinal de los bacilos y el grado de curvatura está en función de la edad del cultivo, composición y pH del medio. Por lo general no es común encontrar movilidad, aunque algunos de ellos suelen presentar flagelos peritricos (Amarocho, 2011).

Los lactobacilos son auxótrofos quimioorganotróficos, los cuales requieren de medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato. Generalmente la temperatura óptima de crecimiento de éstos está entre 30 – 40 °C. Su habitat natural es variado pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen dentro de ellos alimentos de origen vegetal y animal (Ramírez y Vélez, 2016).

2.2. PROBIÓTICOS

Cámpora (2016) deduce que los probióticos son bacterias y compuestos que agregados como aditivos en la alimentación intervienen en un perfeccionamiento funcional y un balance óptimo de la microflora del tracto gastrointestinal de la fermentación gástrica.

Cáceres y Gotteland (2010) mencionan que los probióticos son bacterias, no patógenas, que suelen ser utilizadas por lo general *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* que utilizados en dosis correctas como aditivos microbianos para la mejora de equilibrio bacteriano del tracto gastrointestinal en individuos que lo ingieran y que por lo general, han sido aisladas a partir de deposiciones de individuos sanos. Estos suplementos alimenticios causan en el organismo que los ingiere una asimilación positiva que causan beneficios sobre sus funciones fisiológicas (Manzano *et al.*, 2012).

Según Savadogo *et al.*, (2006) citado por Cueto *et al.*, (2010) comentan que la forma de la cuál actúan algunos probióticos es mediante la producción de sustancias bactericidas como ácidos láctico y acético, que por medio de la acidificación del intestino ayudan a inhibir la propagación de algunos microorganismos patógenos, así mismo son fuente de metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas.

La ingesta correcta de estos microorganismos (probióticos) por medio del alimento llegan a conformar la microflora del tracto gastrointestinal benéfica ejerciendo una actividad fisiológica beneficiosa para la salud del individuo así de esta manera el animal llegará a producir sustancias antibióticas desfavorable para los patógenos presentes en el tracto gastrointestinal (González *et al.*, 2008).

Las óptimas condiciones de bacterias ácidos lácticas (como los *Lactobacillus*) para que puedan resistir condiciones específicas del tracto gastrointestinal (sales biliares, jugos gástricos y pH extremos) y además proliferar en el aparato digestivo (Lasserrot, 2015) donde actuarán respectivamente deben de ser relativamente altas ya que si estas se vuelven inactivas la capacidad probiótica baja parcial o totalmente de éstas. También debe de tomarse en consideración que, la unión no es esencial dado que un rápido crecimiento del microorganismo puede lograr el mismo fin (Mejía *et al.*, 2007).

Desde el siglo XX, la ingesta de aditivos alimenticios para promover el mejor funcionamiento del cuerpo tanto en animales como en humanos se dio debido al beneficio que éstos presentaban para la salud, siendo considerados como ingredientes funcionales dentro de la dieta alimentaria (Villanueva, 2015) ya que reducen la incidencia en problemas de diarreas y estimulan el mejoramiento del sistema inmune (Sánchez *et al.*, 2015).

Según Frizzo *et al.*, (2006) citado por Villanueva (2015) deducen que la selectividad de los bacterias utilizadas como probióticos en animales, es un factor importante que suele detener en la colonización y en la adhesión de estos microorganismos.

Además es necesario la valoración de las bacterias frente a diferentes factores de selección (resistencia al ácido, sales, temperatura, entre otras), de forma tal que las bacterias puedan llegar al tracto digestivo en un normal y óptimo funcionamiento y que hayan traspasado las barreras ácida y biliar en el tracto digestivo (Tuomola *et al.*, 2001 citado por Villanueva, 2015).

2.3. ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por algunas bacterias ácido lácticas y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos relacionados o presentes en su ambiente ya que tienen un papel importante en la preservación y fermentación de alimentos (Grande *et al.*, 2006 citado por Mondragón *et al.*, 2013) esto hace que bacterias patógenas muestren diferentes niveles de sensibilidad ante la presencia de la bacteriocinas.

La benéfica función de inhibir numerosos microorganismos patógenos hace que las bacteriocinas de las bacterias ácidos lácticas influyan de una manera importante por su acción en amplios rangos de pH y termoestabilidad de la bacteria, proponiéndose diferentes aplicaciones en dietas alimentarias (Mondragón *et al.*, 2013).

2.4. PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS PROBIÓTICOS

Según Rondon *et al.*, (2015) las principales funciones de los probióticos son:

- Efecto hipocolesterolémico.
- Actividad antienzimática relacionada con los sistemas que producen o activan sustancias carcinógenas (efecto antitumoral) comprobándose en modelos animales (ratas) y en humanos que al suministrar cepas de *Lactobacillus* se pueden inhibir los procesos que desarrollan tumores malignos.
- Incrementan la utilización digestiva de los alimentos del hospedero a través de la producción enzimática de las cepas probióticas.
- Reducen la absorción de sustancias tóxicas como NH₃, animas, indol, mercaptanos, y sulfitos.
- Producen H₂O₂, previniendo la adhesión al epitelio intestinal de las bacterias patógenas.

- Protegen contra la biotransformación de las sales biliares en productos tóxicos y nocivos.
- Son detoxificadores de los metabolitos perjudiciales de la flora.
- Poseen una probada habilidad para promover el crecimiento y la productividad en la ganadería en forma perfectamente natural.
- Los probióticos son considerados como biorreguladores nutricionales e incrementan el desarrollo y la salud animal.
- Mejoran la actividad enzimática del hospedero por la persistencia de un pH ácido en el Tracto Gastrointestinal (TGI).
- Los ácidos orgánicos actúan como agentes quelantes, mejorando así la absorción de minerales.
- Los probióticos participan en la síntesis de vitaminas y en la predigestión de las proteínas.

2.5. MICROORGANISMOS EMPLEADOS COMO PROBIÓTICOS

Villanueva (2015) menciona que algunos de los microorganismos que han sido utilizados como aditivos alimenticios y que han dado efectos favorables en algunos hospedadores como la incrementación de producción, condición sanitaria y salud a nivel gastrointestinal son *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus facíminis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

2.6. MICROBIOTA INTESTINAL

Según Pedroso y Lee (2014) la microbiota es un ecosistema complejo donde se puede trabajar de manera factible y tranquila para que la relación de microorganismos-microorganismo pueda ser más directa y posible, ya que si un solo microorganismo decide colonizar un nicho intestinal o si solo uno decide

atacar la fibra, la acción tendrá menos oportunidad de éxito que una acción organizada y juntos pueden un objetivo común.

De esta manera la microbiota podría definirse como una organización de microorganismos responsables de funciones específicas que de manera benéfica cooperan con un individuo a mantener una vida con un nivel saludable y productivo alto con un control de patógenos moderadamente elevado (Pedroso y Lee, 2014).

2.6.1. CARACTERÍSTICA DE LA FLORA INTESTINAL

Quiles y Hevia (2006) menciona que en el siglo XX los estudios de la microbiota del tracto gastrointestinal por el científico ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) definió conocimientos de microorganismos benéficos y a su vez mencionó que los *Lactobacillus* pertenecientes a la flora intestinal eran indispensables para mantener un estado idóneo de salud. Cada especie animal tiene una flora intestinal característica, dependiendo de su manejo alimentario, pero existen una variedad de microorganismos no patógenos que beneficiarán al buen estado del animal, entre ellos encontramos a los *Lactobacillus*.

2.7. ESPECTROFOTOMETRÍA

El espectrofotómetro es un aparato de mucha importancia dentro del laboratorio. Aproximadamente más del 90% de los estudios que se realizan en Química Clínica laboratorio tienen como último paso la lectura de la Densidad Óptica (DO) o absorbancia y una transmitancia, convirtiéndose en un determinante dentro del análisis de resultados que emite el laboratorio (Pérez *et al.*, 2014).

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 (Google Earth, 2016).

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	953,4 mm
Temperatura media anual	26 °C
Humedad relativa	80,30%
Heliofanía anual	1118,5 (horas)
Viento	1,6 m/s
Evaporación Anual	1172,6

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

3.3. DURACIÓN

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

Cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc).

3.5. TRATAMIENTOS

Para la evaluación del crecimiento de las cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) en sales biliares y la supervivencia a diferentes niveles de temperaturas y pH controlados, se realizó de acuerdo los siguientes tratamientos, dando como resultado:

Cuadro 3.2. Tratamientos.

EFECTO TEMPERATURA		
Tratamiento 1	22 Lmc	30°C
Tratamiento 2	22 Lmc	37°C
Tratamiento 3	22 Lmc	45°C
Tratamiento 4	41 Lmc	30°C
Tratamiento 5	41 Lmc	37°C
Tratamiento 6	41 Lmc	45°C
EFECTO pH		
Tratamiento 7	22 Lmc	7,5 (pH)
Tratamiento 8	22 Lmc	6,7 (pH)
Tratamiento 9	22 Lmc	5,0 (pH)
Tratamiento 10	22 Lmc	4,0 (pH)
Tratamiento 11	22 Lmc	3,4 (pH)
Tratamiento 12	41 Lmc	7,5 (pH)
Tratamiento 13	41 Lmc	6,7 (pH)
Tratamiento 14	41 Lmc	5,0 (pH)
Tratamiento 15	41 Lmc	4,0 (pH)
Tratamiento 16	41 Lmc	3,4 (pH)

EFECTO SALES BILIARES		
Tratamiento 17	22 Lmc	Aplicación de Sales Biliares
Tratamiento 18	22 Lmc	Sin aplicación de Sales Biliares
Tratamiento 19	41 Lmc	Aplicación de Sales Biliares
Tratamiento 20	41 Lmc	Sin aplicación de Sales Biliares

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial, en el caso de la temperatura se utilizaron 6 tratamientos con 4 repeticiones; en el análisis de pH se utilizaron 10 tratamientos con 4 repeticiones y en el estudio del efecto de las sales biliares se utilizaron 4 tratamientos y 12 repeticiones, para los tres experimentos se utilizó el siguiente modelo estadístico:

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

y_{ijk} = Valor de parámetro en determinación

μ = Media general

A_i = Efecto del factor A (Cepa)

B_j = Efecto del factor B (Temperatura, pH y Sales biliares)

AB_{ij} = Efecto de la interacción de los factores A y B

ε_{ijk} = Efecto del error experimental

3.7. ADEVA

Cuadro 3.3. ADEVA para evaluar el factor temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	23
Factor (A)	1

Factor (B)	2
Error experimental	20

Cuadro 3.4. ADEVA para evaluar el factor pH.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	39
Factor (A)	1
Factor (B)	4
Error experimental	34

Cuadro 3.5. ADEVA para evaluar el factor Sales biliare.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	47
Factor (A)	1
Factor (B)	1
Error experimental	45

3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se consideró como unidad experimental a cada cepa de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) y cada uno de los factores considerados en evaluación, siendo así que para el factor temperatura se estudiaron 24 unidades experimentales, para el facto de pH se analizaron 40 unidades experimentales y para el factor sales biliare se trabajó con 48 unidades experimentales.

3.9. VARIABLES EN ESTUDIO

3.9.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Distintos niveles de pH, temperatura y sales biliare aplicados a las cepas *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc Y 41 Lmc).

3.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Supervivencia a diferentes niveles de temperaturas, pH y a sales biliares de las cepas de *Lactobacillus plantarum*.

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 (2015).

3.11. PROCEDIMIENTO

3.11.1. AMBIENTACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se limpió el laboratorio de Biología Molecular utilizando desinfectantes para suelo y mesas, luego se procedió a desinfectar otros materiales y lugar de trabajo, esterilizando con alcohol. Cabe recalcar que cada lugar de trabajo fue esterilizado cada vez que se iba a trabajar.

3.11.2. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc)

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* se cultivaron en Caldo MRS (MAN, ROGOSA and SHARPE) para cada uno de los tratamientos en estudio para verificar la supervivencia de ambas cepas a diferentes niveles de temperatura, pH y su crecimiento en sales biliares, utilizando 5,22 g de Caldo Lactobacilli MRS en 100 ml de agua destilada, según lo estipulado en estudios de *Lactobacillus* realizados por Sánchez *et al.*, (2011).

3.11.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS Y SIEMBRA DE BACTERIAS

Para la preparación de los medios de cultivos se utilizó Lactobacilli MRS Agar, utilizando 4,3 g del mismo en 100 ml de agua destilada. Luego para la siembra de las cepas se tomó 200 µl del agar y se dejó desarrollar durante 48 horas post-activación las cepas aisladas obtenidas de los cerdos criollos que reposan en las

cajas de crioconservación del Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM “MFL”.

Para el medio de cultivo preparado con Lactobacilli MRS Agar, una vez homogenizado se colocó el agar en tubos de ensayo con las cepas aisladas y cada tubo se rotuló para ser debidamente identificado. Para cada tubo sembrado se le añadió 4,5 ml de medio Lactobacilli MRS Agar, los cuales fueron preparados en matraces de 100 ml.

3.11.4. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Para las pruebas de supervivencia se utilizó 3 tubos, uno por cada cepa de *Lactobacillus plantarum* con distintos niveles de temperatura (30°C, 37°C y 45°C); a los cuales se les realizó cuatro repeticiones a cada nivel, obteniendo un total de 12 unidades experimentales para cada cepa.

Para mantener los niveles de temperatura se utilizó el ambiente, autoclave y estufa y se introdujo en la incubadora de CO₂ cada una de las cepas con sus respectivos niveles de temperatura durante un lapso de 24 - 48 horas. Luego de esto se midió los resultados mediante el espectrofotómetro por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9.

3.11.5. EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH

Para las pruebas de supervivencia de pH se utilizó 5 tubos por cada cepa de *Lactobacillus plantarum* cada uno de los niveles de pH distintos (7,5 - 6,7 - 5,0 - 4,0 - 3,4), a los cuales se les realizó cuatro repeticiones a cada uno de los niveles, lo que dio un resultado de 20 unidades experimentales para cada cepa.

Para mantener y para medir los niveles de pH deseados se utilizó Hidróxido de Sodio (NaOH) para elevar al pH y para bajarlo se utilizó Ácido Clorhídrico (HCl), los cuales fueron medidos con el potenciómetro y se procedió a colocar en la autoclave para esterilizar el medio y se introdujo en la incubadora de CO₂ cada una de las cepas durante un lapso de 24- 48 horas. Luego de esto se midió los

resultados mediante el espectrofotómetro por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9.

3.11.6. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) EN SALES BILIARES

Se utilizó 135 ml del medio Lactobacilli MRS Agar al cual se agregó 0,4 g de sales biliares (Oxgall al 0,3%), donde se dejó reposar durante 48 horas. Seguido de esto se volvió a emplear 135 ml del medio Lactobacilli MRS Agar, esta vez sin agregar sales biliares y se envió a la autoclave durante 15 minutos a 121°C y después de realizado este procedimiento se sembró las cepas dentro del medio y se dejó refrescar con pase de 24 horas.

Después de las 24 horas post-sembrado se centrifugó a 6000 RPM, luego de esto se retiró el sobrenadante y se obtuvo el pelet. Una vez obtenido el pelet se llevó mediante azas a los tubos con sales biliares a una dilución de 1+9 que es igual a 0,1 de inóculo más 0,9 del medio Lactobacilli MRS Agar y se procedió a distribuir el diluido a cada tubo de ensayo. Luego de esto se midió los resultados mediante el espectrofotómetro por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9 a las 3 horas y 6 horas, para medir el crecimiento en sales biliares.

3.11.7. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO

Se midió mediante Densidad Óptica (DO) con el espectrofotómetro de marca JENWAY 6305. Se procedió a encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de sacar las cepas de la incubadora de CO₂ 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. TÉCNICA ESTADÍSTICA

Los datos analizados con el paquete estadístico Infostat (2015) se plasmaron en tablas y gráficos de barras y líneas de tendencia.

3.12.1. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS

El resultado del cálculo de una muestra debe considerarse como orientativo, ya que se fundamenta en supuestos que pueden ser incorrectos y que, en el momento de introducirlos numéricamente en las fórmulas, afectan la viabilidad del estudio, el costo y hasta los aspectos éticos. Por otro lado, un estudio con una muestra insuficiente, puede afectar la precisión y la sensibilidad para detectar diferencias entre los grupos y conducir a conclusiones falsas (Argimon, 2000 citado por Aguilar, 2005).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Como se puede observar en el cuadro 4.1. y gráficos 4.1.a. y 4.1.b., a las 24 horas post-incubación no existe diferencia significativa entre las cepas ($p > 0,05$). Con lo que se puede analizar un mismo patrón de tendencia en éstos resultados. Sin embargo, se puede apreciar que las bacterias de la cepa 22 Lmc presentaron una mayor densidad óptica de 1,77 a las 24 horas. Mientras que a las 48 post-incubación horas se observó que las cepas difieren estadísticamente ($p < 0,05$) y que la cepa 22 Lmc presenta mayor densidad óptica con 1,90 sobre la cepa 41 Lmc.

Lo anteriormente citado respalda lo mencionado por Sánchez *et al.*, (2015) donde explica que las cepas de *Lactobacillus* obtenidas del tracto intestinal de terneros neonatos tienen características fenotípicas que distinguen las bacterias ácido lácticas de otros microorganismos como bacilos Gram-positivos, catalasa negativa y anaerobios facultativos. Al someterse a las temperaturas de 30°C, 37°C y 45°C, se observó un desarrollo bacteriano favorable a la investigación además de demostrar una capacidad de mayor rendimiento en células viables entre 9,3-10 log UFC/ml a una temperatura de 37°C.

El calentamiento previo a la utilización de *Lactobacillus plantarum* no interviene negativamente en el normal funcionamiento de éste como un aditivo, al contrario se puede observar como la actividad del probiótico como tal, aumenta al ser calentado previamente. Algunas de las bacterias ácido lácticas, debido a su bajo peso molecular, hace que la estabilidad térmica sea una propiedad común e importante en las bacteriocinas de las BAL ya que los compuestos utilizados como bioconservantes en alimentos suele requerir calentamiento previo y preservación a bajas temperaturas (Zapata *et al.*, 2009).

Jurado *et al.*, (2014) menciona en un estudio de determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*

aislada de *Cavia porcellus* muestra termotolerancia de las cepas de *L. plantarum* a temperaturas de entre 38 y 45°C, sin afectar en lo particular su crecimiento.

Cuadro 4.1. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura (ver anexo 8-A y 8-B).

CEPAS	DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE 560 (nm)		
	TEMPERATURA	24 HORAS	48 HORAS
22 Lmc	30° C	1,40 A	1,82 A
	37° C	1,75 CD	1,89 A
	45° C	1,77 CD	1,90 A
41 Lmc	30° C	1,48 AB	1,72 A
	37° C	1,58 BC	1,72 A
	45° C	1,72 CD	1,75 A
Error Estándar:		0,04	0,06
Valor de Probabilidad:		0,009	0,844

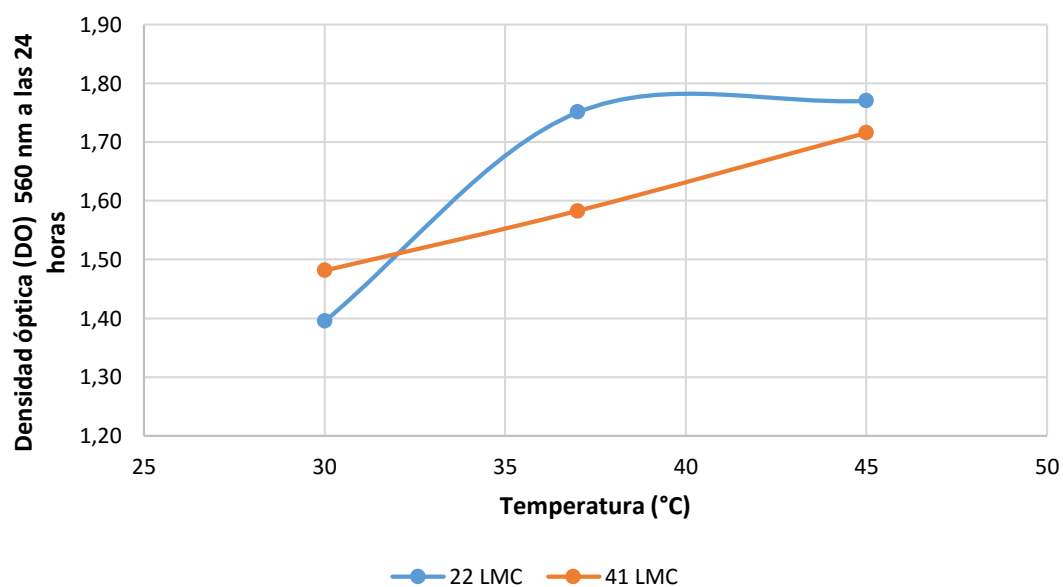


Gráfico 4.1.a. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura.

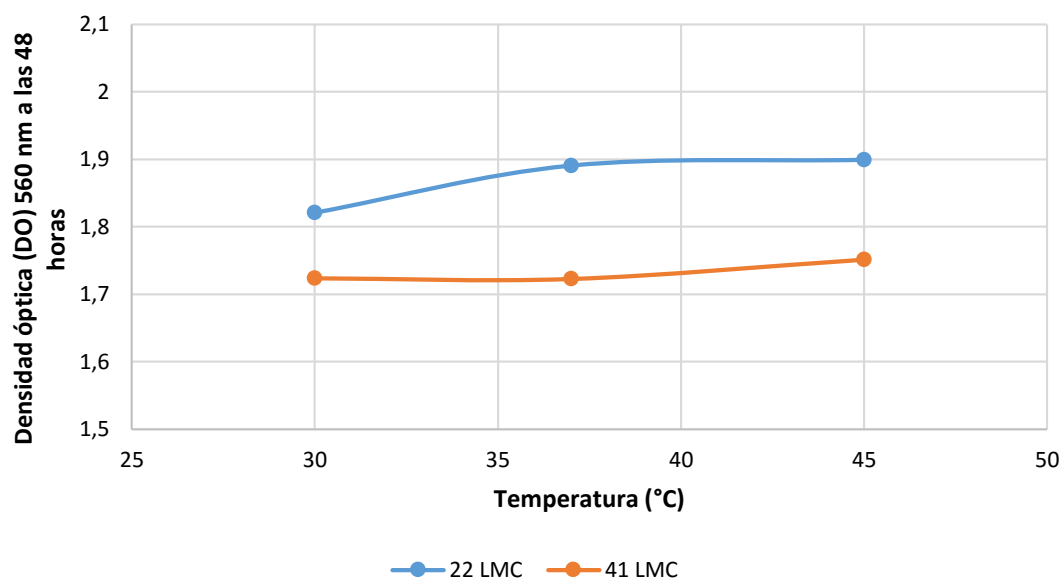


Gráfico 4.1.b. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura.

4.2. EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) A DIFERENTES NIVELES DE pH

En el cuadro 4.2. y gráfico 4.2.a. y 4.2.b., se puede observar que los tratamientos aplicados a la cepa 22 Lmc y 41 Lmc con pH correspondientes a 3,4 - 4,0 - 6,7 - 7,5 no difieren estadísticamente entre sí a las 24 y 48 horas post-incubación, es decir, no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que el tratamiento aplicado con un pH de 5,0 a la cepa 22 Lmc a las 24 horas post-incubación si difiere estadísticamente con los otros niveles con excepción del tratamiento de pH de 3,4; mientras que en la cepa 41 Lmc además del pH 3,4 interfiere también con el pH de 7,5 ($p < 0,05$).

A las 48 horas después de incubar se observó que los tratamientos aplicados a la cepa 22 Lmc si difieren estadísticamente con el tratamiento aplicado con pH correspondiente a 5,0 de los demás tratamientos ($p < 0,05$), mientras que el tratamiento con el mismo nivel de pH aplicado a la cepa 41 Lmc si difieren estadísticamente con el pH 4,0 y 6,7 ($p < 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que las bacterias de la cepa 22 Lmc a la cual se le aplicó el tratamiento de pH de 4,0 presentaron mayor densidad óptica de 2,30 a las 24 horas y 3,23 a las 48 horas sobre los otros tratamientos de la misma cepa y de la cepa 41 Lmc.

Este resultado es opuesto a los arrojados por Zapata *et al.*, (2009), donde alegan que la actividad antimicrobiana del *Lactobacillus plantarum* tiene un mayor desarrollo y funcionamiento de su actividad frente a microorganismos patógenos a pH de entre 3,6-5,4 con una máxima actividad a un pH de 4,2 y se reduce su actividad antimicrobiana a pH mayores a 6,0.

Además el autor citado anteriormente deduce que estos resultados concuerdan con los obtenidos por González *et al.*, (1994) quienes reportaron que la plantaricina C producida por cepas de *Lactobacillus plantarum* pierde su actividad a pH alcalino. Resultados parecidos se han encontrado en algunas sustancias antimicrobianas producidas por otras cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

Cuadro 4.2. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH (ver anexo 9-A y 9 B).

CEPAS	DENSIDAD ÓPTICA DE 560 (nm)		
	pH	24 HORAS	48 HORAS
22 LMC	7,5	2,10 C	3,48 E
	6,7	2,15 C	3,20 CDE
	5,0	1,30 AB	2,45 AB
	4,0	2,30 C	3,23 CDE
	3,4	2,00 BC	3,33 DE
41 LMC	7,5	1,68 ABC	2,38 AB
	6,7	2,00 BC	2,75 BC
	5,0	1,20 A	2,20 A
	4,0	2,20 C	2,85 BCD
	3,4	1,85 ABC	2,73 ABC
Error Estándar:		0,16	0,11
Valor de Probabilidad:		0,002	0,007

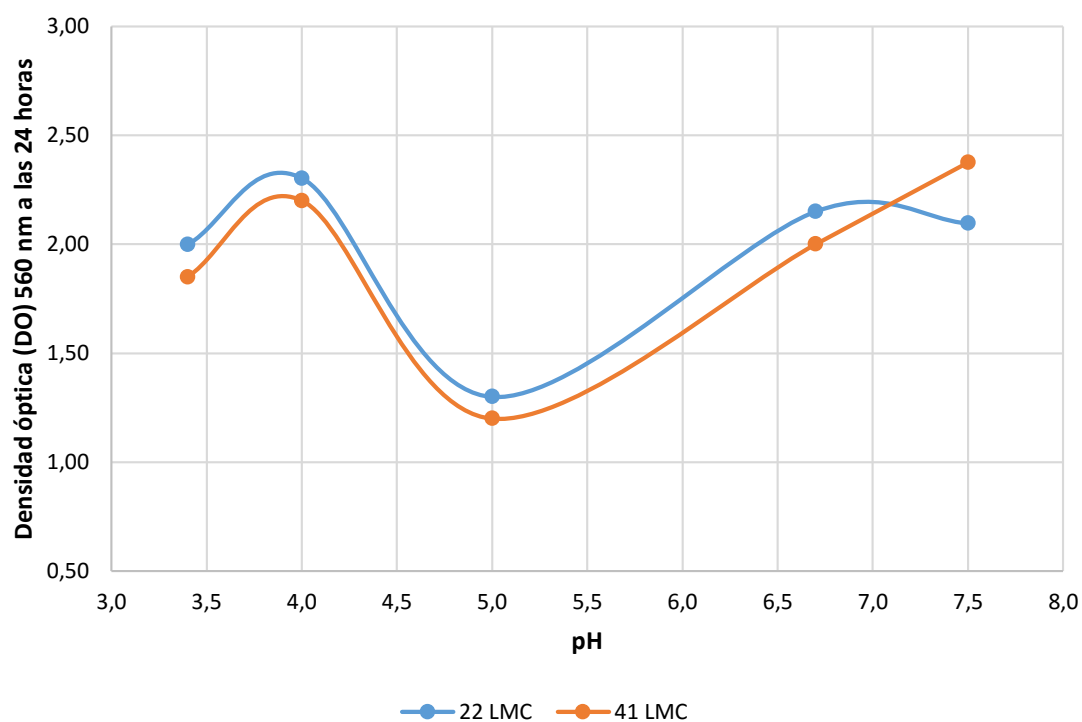


Gráfico 4.2.a. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH.

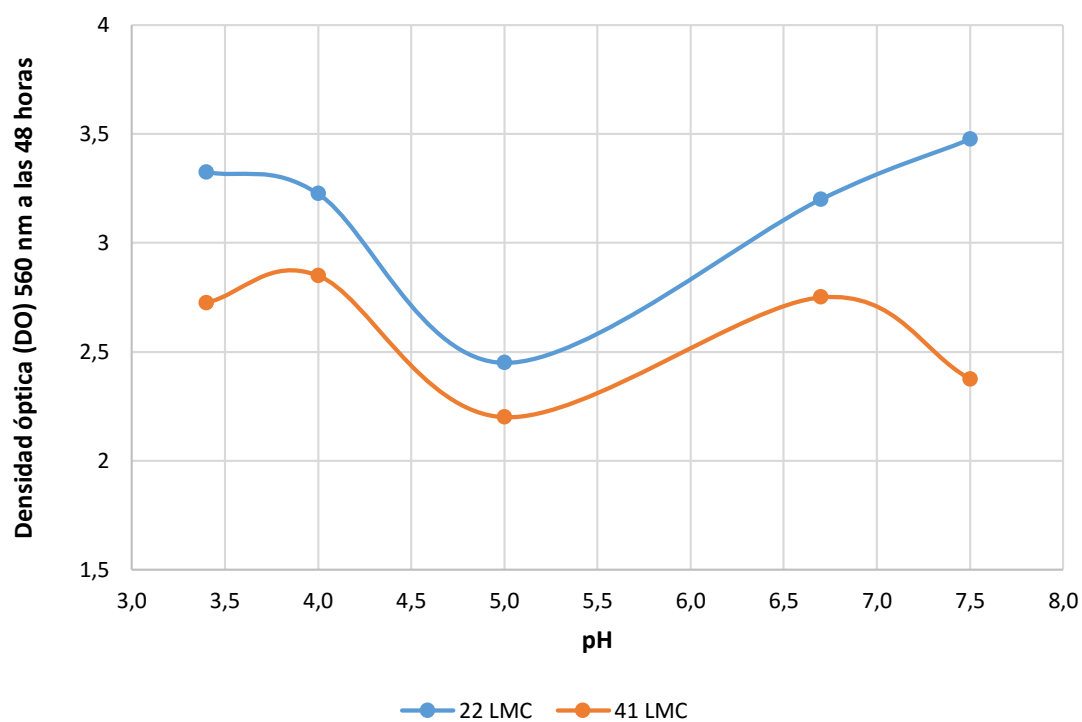


Gráfico 4.2.b. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH.

4.3 . EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) EN SALES BILIARES

Como se puede observar en el cuadro 4.3. y gráficos 4.3.a. – 4.3.b., a las 3 y 6 horas post-incubación no existe diferencia significativa entre la cepa 22 Lmc y las cepas de control (22 Lmc y 41 Lmc sin presencia de sales biliares), mientras que la cepa 41 Lmc con presencia de sales biliares si interfieren estadísticamente, mostrando una diferencia altamente significativa ($p < 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que las bacterias de la cepa 41 Lmc con presencia de sales biliares presentaron mayor densidad óptica de 0,72 a las 3 horas y de 0,83 a las 6 horas post-incubación lo que podría indicar que hubo crecimiento en sales biliares.

Las sales biliares representan moléculas que poseen un extremo hidrofílico, es decir, que es soluble en agua y otro que es hidrófobo, lo cual significa que rechaza el agua (anfipáticas) las cuales actúan a nivel de membrana celular y en la estructura del ADN de los microorganismos. La concentración estimada de sales biliares en el ser humano es de aproximadamente 0,3%, mientras que en el tracto intestinal de los terneros y otros monogástricos se desconocen las concentraciones. Se reporta que la resistencia a las sales varía entre bacterias ácido lácticas y cepas de la misma especie (Sánchez *et al.*, 2015).

El resultado obtenido en la caracterización de las cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) es opuesto a los arrojados por Sánchez *et al.*, (2015), donde alegan que las cepas sometidas a concentraciones de 0,3% de Oxgall, resistieron este tratamiento; además aseveran que se obtuvieron resultados mayores al ser medidos por densidad óptica a las 6 horas de tratamiento y, mientras se extendió el tiempo por un lapso de 24 horas resultaron resistentes a esta concentración en las pruebas *in vitro* realizadas, donde se obtuvo valores 0,9-2 DO al ser medidas en el espectrofotómetro.

Además el mismo autor deduce que un factor benéfico que actuó de manera favorable en la sobrevivencia de estos microorganismos *in vivo* en el tracto gastrointestinal es la presencia de alimentos, ya que estos microorganismos

pueden no estar expuestas a las sales biliares y de esta forma la toxicidad sobre las membranas se podría evitar.

Cuadro 4.3. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 3 y 6 horas de cultivación con/sin la aplicación de sales biliares (ver anexo 10-A y 10-B).

CEPAS	DENSIDAD ÓPTICA DE 560 (nm)		
	SALES BILIARES	3 HORAS	6 HORAS
22 Lmc	Presencia	0,42 A	0,56 A
22 Lmc	Ausencia	0,38 A	0,53 A
41 Lmc	Presencia	0,72 B	0,83 B
41 Lmc	Ausencia	0,45 A	0,55 A
Error Estándar:		0,02	0,02
Valor de Probabilidad:		<0,001	<0,001

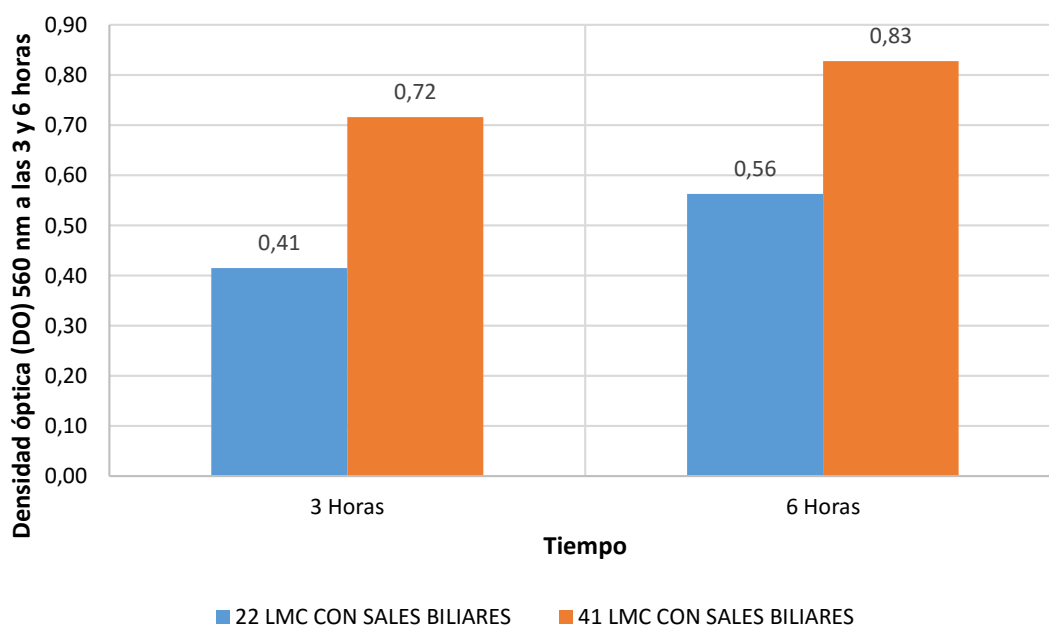


Gráfico 4.3.a. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 3 y 6 horas de cultivación con la aplicación de sales biliares.

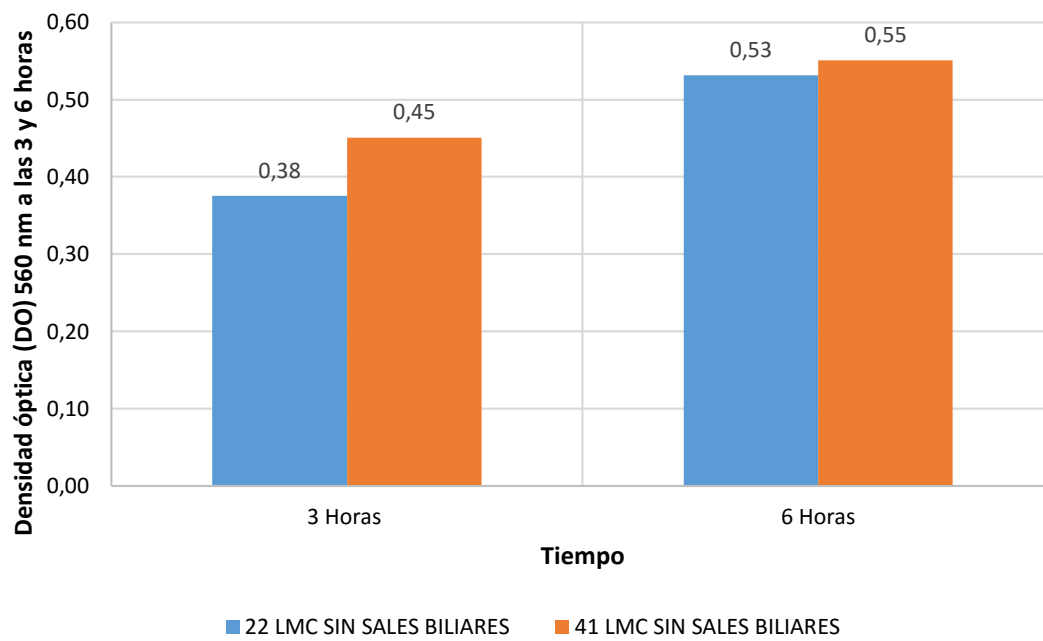


Gráfico 4.3.b. Tendencia de Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 3 y 6 horas de cultivación sin la aplicación de sales biliars (Oxgall al 0,3%).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

En la investigación realizada se obtuvo que las cepas de *Lactobacillus plantarum* presentan similitud en crecimiento frente a diferentes niveles de temperatura controlados de las cepas medido por densidad óptica a las 24 y 48 horas donde las cepas 22 Lmc y 41 Lmc tuvieron un mayor desarrollo en temperaturas de 45°C. Pero por los índices calculados y las frecuencias que se obtuvieron en la población de crecimiento de ambas cepas de *Lactobacillus plantarum*, se puede manifestar que son bacterias que toleran temperaturas de entre 30°C a 45 °C sin alterar su proliferación.

En la supervivencia a pH de las dos cepas estudiadas, se encuentra que ambas cepas tienen un buen desarrollo en pH de 3,4 - 4,0 - 6,7 - 7,5 donde su crecimiento fue mayor tanto a las 24 como a las 48 horas, teniendo un pico más elevado en un pH de 4,0; mientras que en un pH de 5,0 hubo escaso desarrollo comparado con los otros niveles según lo medido mediante el espectrofotómetro.

Las cepas estudiadas al ser observadas por Densidad Óptica se pudo divisar que tuvieron aparentemente un buen desarrollo en la presencia de sales biliares, destacándose más el tratamiento 19 de la cepa 41 Lmc en los tratamientos sobre la cepa 22 Lmc a las 3 y 6 horas respectivamente, lo que podría indicar que hubo un óptimo crecimiento en sales biliares e inclusive un mayor desarrollo con la presencia de dichas sales.

5.2. RECOMENDACIONES

Comparar con diferentes trabajos de investigación, las variables y diferentes niveles aplicados en diferentes cepas de *Lactobacillus* de cerdos criollos en diferentes condiciones de manejo y medio ambientales, con el fin de caracterizar y obtener un buen uso de éstas y otras bacterias como aditivos en suplementación animal.

Llevar un control de manejo sanitario en el aislamiento de bacterias que son utilizadas como probióticos en la producción animal, ya que podrían desencadenar desórdenes en el normal funcionamiento de organismo animal.

Fomentar la formación de una asociación de productores de animales de producción para la elaboración e investigación de nuevo aditivos y/o probióticos para el consumo de los operarios de productos derivados de animales domésticos de campo.

Realizar comparaciones de estudios y extender los mismos sobre las caracterizaciones de cepas con potenciales probióticos presentes en Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, N; Torres, M; Alvarez, C; Vélez, L. 2015. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. (En línea). Medellín, CO. Consultado, 20 de ene. 2017. Formato PDF. Disponible en: <http://alimentos hoy.acta.org>
- Aguilar, S. 2005. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigación de salud. Tabasco. MX. Redalyc. Salud en Tabasco. Vol. 11, nun. 1-2. p. 333-338.
- Amorocho, C. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de la leche de oveja Guirra. (En línea). Valencia, ES. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <https://riunet.upv.es>
- Ávila, J. 2010. Capacidad probiótica de cepas de Lactobacillus extraídas de tracto gastrointestinal de animals de granja. Maracaibo, VE. SCielo. Vol. 20. (En línea). Consultado, 25 de oct. 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org>
- Cáceres, P y Gotteland, M. 2010. Alimentos probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables?. (En línea). Coquimbo, CL. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.scielo.cl>
- Cámpora, C. 2016. Competitividad Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. Ante una creciente demanda de alimentos saludables, los funcionales son una oportunidad para el sector agroalimentario. Con un mercado local en formación, el INTA acompaña la tendencia a través de la generación de conocimiento y de tecnologías orientadas al desarrollo, diferenciación y valorización de estos productos. (En línea). Buenos Aires, AR. Consultado, 25 de oct. 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar>
- Cepero, R. 2006. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. (En línea). ES. Consultado, 24 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.wpsa-aeca.es>
- Cueto, M; Acuña, Y; Valenzuela, J. 2010. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Cundinamarca, CO. (En línea). Consultado, 20 de feb. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.scielo.org.co>
- Del Campo, M; Cástulo, I; Gómez, H; Héctor, E; Alaníz de la O., R. 2008. Bacterias Ácido Lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. (En línea). Guadalajara, MX. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>


- ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López). 2015. Manual del Sistema de Investigación Institucional. 2ed. Calceta-Manabí, EC
- Estación Meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López". ESPAM MFL. (2018).
- Fina, J; Palomino, M; Sánchez, C; Ruzal, S; Allievi, M. 2017. Transferibilidad de DNA en *Lactobacillus*: ¿hay riesgo de transferencia horizontal desde la microbiota a probióticos y viceversa?. (En línea). Buenos Aires, AR. Consultado, 25 de oct. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Flores, L. 2015. Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en postdestete. (En línea). CO. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://revistas.uptc.edu.co>
- González B; Arca P; Mayo B; Suárez J. 1994. Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. Oviedo, ES. *Applied Environ Microbiol.* Vol. 60. (En línea). Consultado, 18 de feb. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://pubmedcentralcanada.ca>
- González, B; Domínguez, R; Alcocer, B. 2008. Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. (En línea). Yucatán, MX. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Google Earth. 2016. Campus ESPAM MFL. Programa. Consultado, 28 de oct. 2016.
- Grupo Aula Médica. 2013. IV Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica. (En línea). Madrid, ES. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Jurado, H; Aguirre, D; Ramirez, C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. (En línea). CO. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co>
- Jurado, H; Calpa, F; Chaspuengal, A. 2014. Determinación in-vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. (En línea). Pasto, CO. Consultado, 22 de ene. 2017. Formato PDF. Disponible en: <http://www.scielo.org.co>
- Jurado, H; Fajardo, I; Rodriguez, A. 2016. Evaluación in-vitro de *Lactobacillus gasseri* con características probióticas sobre *Staphylococcus aureus*. (En línea). Pasto, CO. Consultado, 20 de ene. 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.co>

- Jurado, H; Jarrín, V; Parreño, J. 2015. Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*. (En línea). Pasto, CO. Consultado, 22 de ene. 2017. Disponible en: <http://www.scielo.org.co>
- Lasserrot, A. 2015. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico. (En línea). Granada, ES. Consultado, 22 de ene. 2017. Formato PDF. Disponible en: <http://digibug.ugr.es>
- Manzano, C; Estupiñan, D; Poveda, E. 2012. Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia. (En línea). Santiago, CL. Consultado, 20 de ene. 2018. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl>
- Mejía, J; Chacón, Z; Guerrero, B; Otoniel, J; López, G. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. (En línea). Mérida, VE. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Mondragón, G; Escalante, P; Osuna, J; Ibarra, V; Morlett, J. Aguilar, C; Rodríguez, R. 2013. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. (En línea). Aguascalientes, MX. Consultado, 21 de feb. 2018. Disponible en: <http://www.uaa.mx>
- Pasanen, P. 2007. *Lactobacillus plantarum*. (En línea). Kuopi, FI. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://epublications.uef.fi>
- Pedroso, A. y Lee, M. 2014. Modulación de la microbiota intestinal para mejorar la productividad de los animales monogástricos. (En línea). US. Consultado, 26 de oct. 2016. Disponible en: <http://www.adiveter.com>
- Pérez, M; Rodríguez, Y; Suárez, Y. 2014. Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de ciprofloxacina en tabletas Ciprecu. (En línea). La Habana, CU. Consultado, 25 de oct. 2016. Disponible en: <http://www.scielo.sld.cu>
- Piñero, J. 2013. Importancia biotecnológica de la biodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios. (En línea). Carabobo, VE. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <https://www.academia.edu>
- Quiles, A. y Hevia, M. 2006. Características de la flora intestinal del lechón: Efecto de los probióticos. (En línea). Murcia, ES. Consultado el 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.adiveter.com>
- Ramírez, C. y Vélez, J. 2016. Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. (En línea). México, MX. Consultado, 25 de oct. 2016. Disponible en: <https://www.scielo.conicyt.cl>

- Rondon, L; Añez, M; Salvatierra, A; Meneses, R; Heredia, M. 2015. Probióticos: generalidades. (En línea). Caracas, VE. Consultado, 25 de oct. 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve>
- Ruiz, M; Colello, R; Padola, N; Etcheverría, A. 2016. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. (En línea). AR. Consultado, 25 de oct. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Samaniego, L. y Sosa, M. 2000. Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. (En línea). Matanzas, CU. Consultado, 26 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu>
- Sánchez, L. y Tromps, J. 2014. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. (En línea). La Habana, CU. Consultado, 20 de feb. 2018. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
- Sánchez, L; Omura, M; Lucas, A; Pérez, T; Llanes, M; De Luce, C. 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. Con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. (En línea). La Habana, CU. Consultado, 17 de feb. 2018. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
- 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. (En línea). La Habana, CU. Consultado, 26 de oct. 2016. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
- Sánchez, T; Lamela, L; López, O; Benítez, M. 2015. Influencia del probiótico Sorbifauna en la producción y calidad de la leche de vacas mestizas en pastoreo. (En línea). Matanzas, CU. Consultado, 20 de feb. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Santomá, G; Ayala, P; Guitierrez, A. 2006. Estrategias Alimentarias en la Producción de Pollos sin Antibióticos Promotores del crecimiento. Conferencia impartida por Tecna-Trouw Nutrition, 2 Nutreco Poultry and Rabbit Research Centre
- Vásquez, J. 2013. Uso de probióticos en la alimentación con suero de leche en cerdos al destete. (En línea). México, MX. Consultado, 20 de ene 2018. Formato PDF. <http://ninive.uaslp.mx/>
- Vásquez, S; Suárez, H; Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. (En línea). Santiago de Chile, CH. Consultado, 22 de ene. 2017. Disponible en: <http://www.scielo.cl>
- Villanueva, R. 2015. Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. (En línea). Lima, PE. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.redalyc.org>

Zapata, S; Muñoz, J; Ruiz, O; Montoya, O; Gutiérrez, P. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. (En línea). Medellín, CO. Consultado, 25 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.scielo.org>


ANEXOS



ESPAMMFL

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



GUÍA DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO/TALLERES

1. DATOS INFORMATIVOS

No. de Práctica: _____ Lugar de Práctica: Laboratorio de Biología Molecular

Asignatura: Proyecto de Tesis

Docente: Ing. Hernesto Hurtado Fecha: 18 de julio del 2017.

Periodo Semestral: _____ Semestre/ Nivel: 10^{mo} - Veterinaria.

Tema de la Unidad:	Subtema:	Logro de aprendizaje:
Caracterización de lactobacilos plantarum (22 y 41 lmc)		a



2. OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

- Evaluar la supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 lmc y 41 lmc) a distintos niveles de pH y temperatura.

3. MATERIALES/EQUIPOS/OTROS

EQUIPOS		MATERIALES		OTROS	
CANT./ UNID.	DESCRIPCIÓN	CANT./ UNID.	DESCRIPCIÓN	CANT./ UNID.	DESCRIPCIÓN
1	Gramera	20	Tubos.	8,6g	MRS Barth.
1	Agitador.	1	Matraz.	200ml	Agua destilada.
1	Autoclave.	1	NaOH de precipita.		
1	Camara Flujo laminar	1	Papel Aluminio		
		1	Pala.		
			Alcohol.		

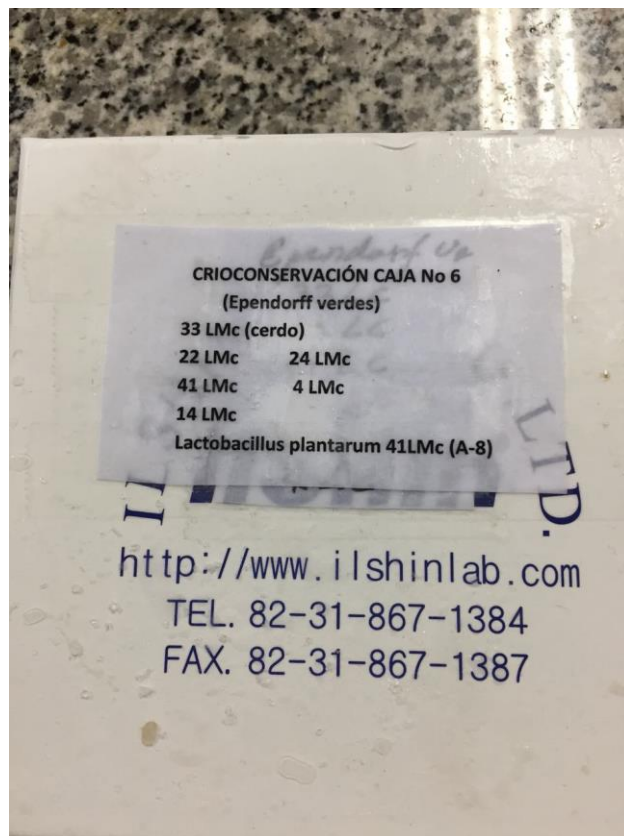
4. PARTICIPANTES DE LA PRÁCTICA

Nº	NOMBRES	CÉDULA	FIRMAS
1	Mencéndez Aveiga Joel Smith.	1314994714	
2	Vélez Arteaga Edison Stalin.	1703762507	

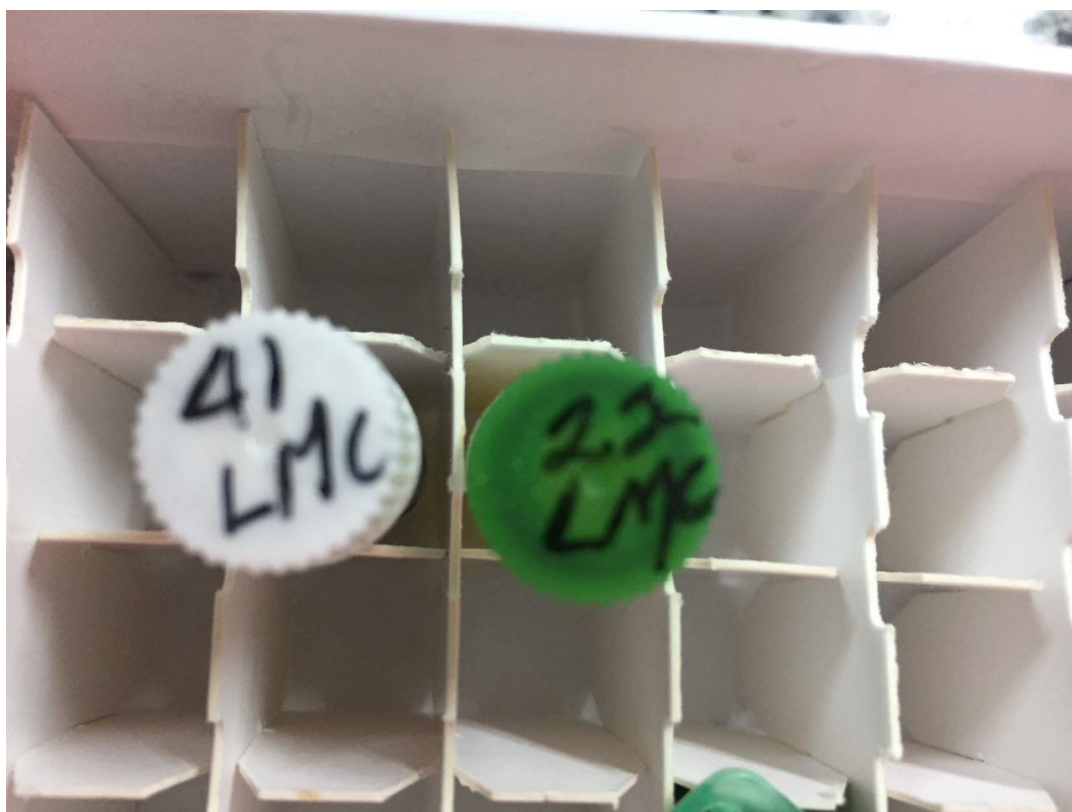
Docente

Técnico Responsable

Anexo 1. Formato de Guía de prácticas en Laboratorio de Biología Molecular



Anexo 2-A. Caja de Crioconservación de Cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc)



Anexo 2-B. Caja de Crioconservación de Cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc)



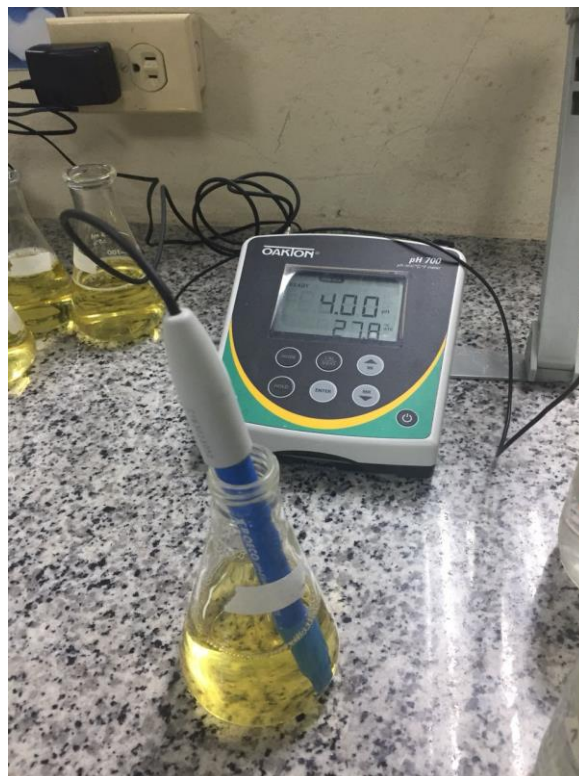
Anexo 3-A. Preparación de Lactobacilli MRS Agar para la activación de las cepas



Anexo 3-B. Preparación de Lactobacilli MRS Agar para la activación de las cepas



Anexo 4-A. Aplicación de los niveles de pH establecidos



Anexo 4-B. Aplicación de los niveles de pH establecidos



Anexo 4-C. Aplicación de los niveles de pH establecidos



Anexo 5. Esterilización del medio de cultivo Lactobacill MRS Agar



Anexo 6. Incubación de las bacterias en CO₂



Anexo 7. Observación mediante Densidad Óptica (DO) a 560 (nm)

Densidad Optica a 24 Horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Densidad Optica a 24 Horas..	24	0,83	0,78	4,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,48	5	0,10	17,73	<0,0001
Cepa	0,01	1	0,01	2,26	0,1502
Temperatura	0,40	2	0,20	37,24	<0,0001
Cepa*Temperatura	0,06	2	0,03	5,94	0,0104
Error	0,10	18	0,01		
Total	0,57	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06290

Error: 0,0054 gl: 18

Cepa	Medias	n	E.E.
41LMC	1,60	12	0,02 A
22 LMC	1,64	12	0,02 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09358

Error: 0,0054 gl: 18

Temperatura	Medias	n	E.E.
30°	1,44	8	0,03 A
37°	1,67	8	0,03 B
45°	1,74	8	0,03 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16480

Error: 0,0054 gl: 18

Cepa	Temperatura	Medias	n	E.E.
22 LMC	30°	1,40	4	0,04 A
41LMC	30°	1,48	4	0,04 A B
41LMC	37°	1,59	4	0,04 B C
41LMC	45°	1,72	4	0,04 C D
22 LMC	37°	1,75	4	0,04 D
22 LMC	45°	1,77	4	0,04 D

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

Densidad Optica a 48 Horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Densidad Optica a 48 Horas..	24	0,32	0,13	6,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	5	0,03	1,66	0,1956
Cepa	0,11	1	0,11	7,20	0,0152
Temparatura	0,01	2	0,01	0,35	0,7071
Cepa*Temparatura	0,01	2	2,9E-03	0,19	0,8281
Error	0,28	18	0,02		
Total	0,40	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10632

Error: 0,0154 gl: 18

Cepa	Medias	n	E.E.	
41LMC	1,73	12	0,04	A
22 LMC	1,87	12	0,04	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,15818

Error: 0,0154 gl: 18

Temparatura	Medias	n	E.E.	
30°	1,77	8	0,04	A
37°	1,81	8	0,04	A
45°	1,83	8	0,04	A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,27856

Error: 0,0154 gl: 18

Cepa	Temparatura	Medias	n	E.E.	
41LMC	37°	1,73	4	0,06	A
41LMC	30°	1,73	4	0,06	A
41LMC	45°	1,75	4	0,06	A
22 LMC	30°	1,82	4	0,06	A
22 LMC	37°	1,89	4	0,06	A
22 LMC	45°	1,90	4	0,06	A

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

Análisis de la varianza

Densidad Optica a 24 Horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Densidad Optica a 24 Horas..	40	0,62	0,51	16,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,08	9	0,56	5,55	0,0002
Cepa	0,34	1	0,34	3,33	0,0779
pH	4,60	4	1,15	11,31	<0,0001
Cepa*pH	0,14	4	0,04	0,35	0,8394
Error	3,05	30	0,10		
Total	8,13	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20587

Error: 0,1016 gl: 30

Cepa	Medias	n	E.E.
41 LMC	1,79	20	0,07 A
22 LMC	1,97	20	0,07 A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46231

Error: 0,1016 gl: 30

pH	Medias	n	E.E.
5,00	1,25	8	0,11 A
7,50	1,89	8	0,11 B
3,40	1,92	8	0,11 B
6,70	2,08	8	0,11 B
4,00	2,25	8	0,11 B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,76889

Error: 0,1016 gl: 30

Cepa	pH	Medias	n	E.E.
41 LMC	5,00	1,20	4	0,16 A
22 LMC	5,00	1,30	4	0,16 A B
41 LMC	7,50	1,68	4	0,16 A B C
41 LMC	3,40	1,85	4	0,16 A B C
22 LMC	3,40	2,00	4	0,16 B C
41 LMC	6,70	2,00	4	0,16 B C
22 LMC	7,50	2,10	4	0,16 C
22 LMC	6,70	2,15	4	0,16 C
41 LMC	4,00	2,20	4	0,16 C
22 LMC	4,00	2,30	4	0,16 C

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

Densidad Optica a 48 Horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Densidad Optica a 48 Horas..	40	0,82	0,76	7,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,85	9	0,76	14,95	<0,0001
Cepa	3,08	1	3,08	60,50	<0,0001
pH	2,90	4	0,72	14,23	<0,0001
Cepa*pH	0,87	4	0,22	4,28	0,0074
Error	1,53	30	0,05		
Total	8,38	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14573

Error: 0,0509 gl: 30

Cepa	Medias	n	E.E.
41 LMC	2,58	20	0,05 A
22 LMC	3,14	20	0,05 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32726

Error: 0,0509 gl: 30

pH	Medias	n	E.E.
5,00	2,33	8	0,08 A
7,50	2,93	8	0,08 B
6,70	2,98	8	0,08 B
3,40	3,03	8	0,08 B
4,00	3,04	8	0,08 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32726

Error: 0,0509 gl: 30

pH	Medias	n	E.E.
5,00	2,33	8	0,08 A
7,50	2,93	8	0,08 B
6,70	2,98	8	0,08 B
3,40	3,03	8	0,08 B
4,00	3,04	8	0,08 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,54428

Error: 0,0509 gl: 30

Cepa	pH	Medias	n	E.E.
41 LMC	5,00	2,20	4	0,11 A
41 LMC	7,50	2,38	4	0,11 A B
22 LMC	5,00	2,45	4	0,11 A B
41 LMC	3,40	2,73	4	0,11 A B C
41 LMC	6,70	2,75	4	0,11 B C
41 LMC	4,00	2,85	4	0,11 B C D
22 LMC	6,70	3,20	4	0,11 C D E
22 LMC	4,00	3,23	4	0,11 C D E
22 LMC	3,40	3,33	4	0,11 D E
22 LMC	7,50	3,48	4	0,11 E

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

Tratamiento a 3 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamiento a 3 horas	48	0,76	0,75	15,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,86	3	0,29	46,81	<0,0001
Cepa	0,42	1	0,42	69,59	<0,0001
Sales biliares	0,28	1	0,28	46,08	<0,0001
Cepa*Sales biliares	0,15	1	0,15	24,76	<0,0001
Error	0,27	44	0,01		
Total	1,12	47			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04540

Error: 0,0061 gl: 44

Cepa	Medias	n	E.E.	
22 LMC	0,40	24	0,02	A
41 LMC	0,59	24	0,02	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04540

Error: 0,0061 gl: 44

Sales biliares	Medias	n	E.E.	
Sin sales biliares	0,41	24	0,02	A
Con sales biliares	0,57	24	0,02	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08506

Error: 0,0061 gl: 44

Cepa	Sales biliares	Medias	n	E.E.	
22 LMC	Sin sales biliares	0,38	12	0,02	A
22 LMC	Con sales biliares	0,42	12	0,02	A
41 LMC	Sin sales biliares	0,45	12	0,02	A
41 LMC	Con sales biliares	0,72	12	0,02	B

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

Tratamiento a 6 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamiento a 6 horas	48	0,69	0,67	13,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,71	3	0,24	32,63	<0,0001
Cepa	0,24	1	0,24	33,41	<0,0001
Sales biliares	0,28	1	0,28	39,13	<0,0001
Cepa*Sales biliares	0,18	1	0,18	25,35	<0,0001
Error	0,32	44	0,01		
Total	1,03	47			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04954

Error: 0,0072 gl: 44

Cepa	Medias	n	E.E.	
22 LMC	0,55	24	0,02	A
41 LMC	0,69	24	0,02	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04954

Error: 0,0072 gl: 44

Sales biliares	Medias	n	E.E.	
Sin sales biliares	0,54	24	0,02	A
Con sales biliares	0,70	24	0,02	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09281

Error: 0,0072 gl: 44

Cepa	Sales biliares	Medias	n	E.E.	
22 LMC	Sin sales biliares	0,53	12	0,02	A
41 LMC	Sin sales biliares	0,55	12	0,02	A
22 LMC	Con sales biliares	0,56	12	0,02	A
41 LMC	Con sales biliares	0,83	12	0,02	B

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