

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA DEL
ECUADOR SEDE QUITO**

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS A PARTIR DE
LECHE BOVINA DEL CANTÓN CAYAMBE CON POTENCIAL
PROBIÓTICO EN ANIMALES.**

AUTORES:

**ELIZABETH MARIANA COBOS CANDO
HÉCTOR FABIÁN PULLA TAPIA**

TUTORA:

NANCY FABIOLA BONIFAZ GARCÍA

Quito, enero del 2019

Cesión de derechos de autor

Nosotros Elizabeth Mariana Cobos Cando y Héctor Fabián Pulla Tapia, con documento de identificación N° 171500689-4 y N° 171913753-9 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE BOVINA DEL CANTÓN CAYAMBE CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN ANIMALES”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Firmas:



Nombre: Elizabeth Mariana Cobos Cando

Cédula: 171500689-4

Fecha: Quito, enero 2019



Nombre: Héctor Fabián Pulla Tapia

Cédula: 171913753-9

Fecha: Quito, enero 2019

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS A PARTIR DE
LECHE BOVINA DEL CANTÓN CAYAMBE CON POTENCIAL
PROBIÓTICO EN ANIMALES”** realizado por Elizabeth Mariana Cobos Cando y
Héctor Fabián Pulla Tapia, obteniendo un producto que cumple con todos los
requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados
como trabajo final de titulación.

Quito, enero 2019



Dra. Nancy Fabiola Bonifaz García

C.I: 060208511-0

Dedicatoria

Mariana Cobos

En mi vida será primero Dios, por darme fortaleza, guiarme en mi vida, pues sin él no sería posible; a mis padres Joel Cobos y Margoth Cando quienes me han dado todo su amor y apoyo al estar en cada tropiezo siendo mis pilares fundamentales, a mis hermanas Marielisa y Grace por ser mujeres valientes que cuidan siempre de mí, más allá de lo necesitado; a todas aquellas personas que me impulsaron a seguir avanzando principalmente mis cuñados Diego y Gabriel por su paciencia y colaboración única e irremplazable en los mejores momentos para poder culminar el presente proyecto; mis sobrinas Samantha y Sofía quienes llenan mi vida de alegría.

“El viaje no termina jamás. Sólo los viajeros terminan. Y también ellos pueden subsistir en memoria, en recuerdo, en narración... El objetivo de un viaje es sólo el inicio de otro viaje.”

José Saramago.

Héctor Pulla

Son pocas las líneas que tengo para expresar mi dedicatoria a todas las personas por lo cual fue posible culminar una etapa más de mi vida, sin embargo, son pocas las personas que se han ganado todo mi respeto, admiración y gratitud. A mi Dios quien nunca me abandona, a mi padre Héctor Pulla que con sabiduría supo darme los mejores consejos, a mi madre Mariana Tapia, que con su cariño y ternura supo inculcar los mejores valores a mi persona, a mis hermanas Jenny y Sandra que con su ejemplo de dedicación y perseverancia fueron mi modelo a seguir, de quienes siempre obtuve su apoyo incondicional.

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por habernos impartidos todos los conocimientos adecuados y necesarios para desempeñarnos como profesionales, con ayuda de los docentes que imparten la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Al grupo de investigación NUKUI WAKAN y al Laboratorio de Calidad de Leche UPS Cayambe por permitirnos hacer posible la ejecución y desarrollo del proyecto tanto en el uso de sus instalaciones como al brindarnos su confianza y apoyo.

A nuestra tutora, Dra. Nancy Bonifaz MSc., por su paciencia, tiempo y por habernos dado su confianza y la oportunidad de trabajar junto a ella impartiendo sus conocimientos.

A la Dra. María Elena Maldonado Ph.D., por avernos otorgado los recursos necesarios para poder culminar la presente investigación.

A nuestro co-tutor, Ing. Byron Fuertes por estar pendiente de nuestras necesidades, compartirnos su tiempo, paciencia y dedicación más allá de sus responsabilidades.

A nuestros amigos y compañeros que, con su apoyo a lo largo de nuestra carrera universitaria, contribuyeron a prepararnos primero como persona y luego como profesionales: Karen Castillo, Thaly Torres, Diego Guzmán, Luciana Vargas, Michell Tenorio.

A nuestros familiares, una vez más por estar siempre en el momento oportuno alentándonos en cada paso que dimos en toda nuestra vida.

“Las tres enfermedades del hombre actual son la incomunicación, la revolución tecnológica y su vida centrada en su triunfo personal.”

José Saramago.

Índice

Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Capítulo 1	5
Marco Conceptual	5
1.1. Problemática	5
1.2. Importancia de los probióticos	6
1.3. Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	7
1.4. Principales Probióticos por su género	8
1.4.1. Género: <i>Lactobacillus</i>	9
1.4.2. Género: <i>Lactococcus</i>	10
1.4.3. Género: <i>Bacillus</i>	10
1.5. Pruebas de Laboratorio.....	10
1.5.1. Pruebas de Lacto-fermentación	10
1.6. Métodos de identificación	11
1.6.1. Macroscópicas	11
1.6.2. Pruebas moleculares	13
Capítulo 2.....	17
Materiales y Métodos	17
2.1. Localización y descripción	17
2.2. Toma de muestras.....	17

2.3.	Análisis de Laboratorio	18
2.3.1.	Lacto-Fermentación	18
2.3.2.	Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	19
2.4.	Protocolo de Identificación mediante pruebas bioquímicas	20
2.4.1.	Métodos Moleculares.....	21
2.4.1.2.	Amplificación de la región 16S (PCR).....	22
2.4.2.	Análisis de secuencias	24
2.4.3.	Evaluación de la capacidad probiótica.....	24
2.4.4.	Análisis estadístico.	25
Capítulo 3.....		26
Resultados y Discusión		26
3.1.	Lacto-fermentación	26
3.2.	Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	28
3.3.	Métodos Moleculares.....	31
3.3.1.	Extracción de ADN y Amplificación de la región 16S	31
3.3.2.	Análisis de secuencias	32
3.4.	Pruebas como Probióticos.....	39
3.4.1.	Prueba de antagonismo	46
4.	Conclusiones	47
5.	Recomendaciones.....	49
6.	Bibliografía	50
7.	Anexos	59

Índice de tablas

Tabla 1. Interpretación y clasificación de leche lacto-fermentada.....	18
Tabla 2. Especificaciones para la preparación de medios.....	19
Tabla 3. Especificaciones para cada reacción de PCR.....	23
Tabla 4. Características de las 10 cepas aisladas recientemente	29
Tabla 5. Identificación molecular de las 10 cepas aisladas.....	33
Tabla 6. Análisis de varianza de las pruebas como probióticos.....	39
Tabla 7. Comparación de medias de los porcentajes de las pruebas*concentración hacia las bacterias.....	42
Tabla 8: Pruebas de antagonismo.....	46

Índice de figuras

Figura 1: Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios	11
Figura 2: Clasificación de las bacterias según su estructura bajo microscopio	12
Figura 3: Promedio CBT vs lacto-fermentación de 27 productores de leche.	27
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de PCR.....	31
Figura 5: Árbol de filogenia de las especies analizadas.....	38
Figura 6: Resistencia general probiótica en porcentaje de cada especie de BAL.	40
Figura 7: Resistencia por concentración de pH, sal biliar, temp. y NaCl.	41
Figura 8: Efecto de resistencia probiótica de cada prueba vs especie bacteriana.	45
Figura 9: Interacción del efecto que tiene el medio en cada bacteria.	45

Índice de anexos

Anexo 1. Toma de muestras de Leche, fase de Campo.	59
Anexo 2. Listado de nombres de los productores del centro de acopio “Cariacu”....	60
Anexo 3. Proceso de lacto-fermentación en laboratorio	61
Anexo 4. Datos de todos los muestreos CBT y Lacto-fermentación	62
Anexo 5. Datos CTB y Lacto-fermentación de las 27 muestras para inoculación. ...	64
Anexo 6. Identificación mediante pruebas bioquímicas	65
Anexo 7. Identificación Molecular (Electroforesis de ADN)	66
Anexo 8. Pruebas como Probiótico	67
Anexo 9. Datos estadísticos de las Pruebas como probióticos.....	68

Glosario de términos y siglas

CBT: Conteo Total de Bacterias

CCS: Conteo de Células Somática

MRS: Man, Rogosa y Sharpe

AN: Agar Nutriente

BAL: Bacterias Ácido-Lácticas

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

APPC: Asociación de Productores Agropecuarios el Progreso Cariacu

LCL: Laboratorio de Calidad de Leche

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

TBS: Tryptic Soy Broth

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PIB: Producto Interno Bruto

OMS: Organización Mundial de la Salud

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Resumen

La investigación de los probióticos en el Ecuador es un tema poco discutido, sin embargo, son conocidas las características de mejora para la salud. El desarrollo de la investigación se centra en la caracterización de los microorganismos benéficos de muestras de leche del Cantón Cayambe por medio de aislamiento en medios de cultivo MRS Y AN en anaerobiosis y pruebas de lacto-fermentación. Las especies fueron sometidas a pruebas bioquímicas (tinción gram, catalasa, oxidasa, hemólisis). Los géneros identificados como *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, se les realizó una extracción y purificación de ADN por el método de lisis alcalina y SDS, además de una amplificación molecular con primers específicos de la región 16S del ARN ribosomal. La secuenciación fue llevada a cabo con la ayuda de la agencia MACROGEN, y la identificación de las especies con ayuda de la base de datos NCBI, de la cual resultaron 10 especies bacterianas ácido lácticas con características probióticas. Las 6 especies bacterianas diferentes fueron evaluadas en medios de cultivo modificado para comprobar su resistencia como probióticos, del cual las bacterias *Bacillus cereus*, *Lactobacillus delbreukii*, *Lactobacillus casei* fueron las que mejor tolerancia a pH, temperatura, sales biliares y NaCl tuvieron, además de una clara competencia contra las especies *S. marcescens* y *E. coli*. Las características de tolerancia a medios de cultivo modificados permiten sugerir que los probióticos identificados podrían ser utilizados en la industria para mejorar la dieta de los animales por medio de balanceados.

Palabras clave: Probióticos, leche bovina, lacto-fermentación, PCR.

Abstract

The investigation of the probiotics in Ecuador is a little discussed topic, nevertheless, the characteristics of improvement for the health are known. The development of the research focuses on the characterization of the beneficial microorganisms of milk samples from the Cayambe Canton by means of their isolation in MRS and AN culture media in anaerobiosis and lacto-fermentation tests. The species were subjected to biochemical tests (gram stain, catalase, oxidase, hemolysis). The genera identified as *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* were subjected to an extraction and purification of DNA by the alkaline lysis and SDS method, as well as a molecular amplification with specific primers of the 16S region of the ribosomal RNA. The sequencing was carried out with the help of the MACROGEN agency, and the identification of the species with the help of the NCBI database, which resulted in 10 bacterial lactic acid species with probiotic characteristics. The 6 different bacterial species were evaluated in modified culture media to check their resistance as probiotics, of which bacteria *Bacillus cereus*, *Lactobacillus delbreukii*, *Lactobacillus casei* were the best tolerance to pH, temperature, bile salts and NaCl had, in addition to a clear competition against *S. marcescens* and *E. coli* species. The characteristics of tolerance to modified culture media suggest that the identified probiotics could be used in the industry to improve the diet of animals through balanced.

Key words: Probiotics, bovine milk, lacto-fermentation, PCR.

Introducción

En la actualidad la reciente preocupación mundial sobre asuntos de salud, el crecimiento acelerado de la población mundial y las exigencias de alimentación ha derivado en otras alternativas, entre ellos los probióticos, debido a sus múltiples aplicaciones como medicina preventiva en el campo agrícola (Rodríguez, 2012, pág. 7), ya que este tipo de microorganismos, según la FAO/OMS y ONU (2001) citado por Martínez & Peláez (2012): Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que suministrados en cantidades adecuadas son una alternativa al uso de los antibióticos y otorgan beneficios para la salud del huésped (pág. 1), por lo que se buscan sistemas mejorados de producción donde los alimentos sean más sanos y también permitan obtener altas producciones con una adecuada sostenibilidad económica, principalmente en la crianza de animales, haciendo viable la incorporación de estos microorganismos en una dieta alimentaria que estimulan el fortalecimiento de la flora intestinal, limitando el crecimiento de organismos patógenos y beneficiando al sistema inmune de los animales bajo crianza (Arteaga, 2015, pág. 1).

Es importante saber que en el Ecuador según indica El Universo (2015) “Las inclemencias del clima y las enfermedades son situaciones que por años han afectado al ganado en el país y que han contribuido con la tasa de morbilidad y mortalidad de la especie de los vacunos. Además, es difícil que los bovinos adultos alcancen un peso ideal de 1.000 a 1.200 lb, pues en época seca bajan a unas 700 u 800 lb, ya que en temperaturas muy altas el animal se fatiga y solo se alimenta de 4 y 6 horas (las primeras de la mañana y las últimas de la tarde). También, adquieren enfermedades que proliferan en invierno como diarreas, gastrointestinales, pulmonares o parasitosis” (pág. 1).

Arteaga (2015) indica también que “los animales de granja son muy susceptibles a desbalances bacterianos en el tracto digestivo, lo que conduce a una insuficiente conversión de los nutrientes y al retardo del crecimiento. Para contrarrestar estas dificultades, ocurrió por años que las dietas se suplementaban con antibióticos que son efectivos en la disminución de diarreas, al igual que funcionaban como promotores del crecimiento. Sin embargo, su uso indiscriminado trae como consecuencia que cepas bacterianas patógenas desarrollen resistencia a los antibióticos que se usan para controlarlas” (pág. 1).

A pesar que en el Ecuador no existen estudios significativos vale recordar que otras de las aplicaciones que se les han dado a los probióticos a nivel mundial son: Las actividades antialérgicas contra la diarrea, infecciones urinarias, cáncer de colon, reducir el uso de promotores de crecimiento en animales (Rodríguez, 2012, pág. 8), mejorar la alimentación de los humanos o animales y también evitar enfermedades causadas por patógenos entéricos (Jurado, Calpa, & Chaspuengal, 2014, pág. 1).

Siendo el origen principal de su eficacia en tantas aplicaciones, al hábitat natural de los probióticos es el sistema gastro intestinal, razón por la que han sido aislados de intestinos y heces animales, aguas contaminadas, leche y otros alimentos fermentados (Guevara, y otros, 2017, pág. 1).

Otros estudios se ha realizado en Cuba, donde “son numerosos los resultados con el uso de probióticos; en este sentido, la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey desde el año 2012, desarrolla un programa de investigación para evaluar el efecto que ejercen los probióticos de la Firma Francesa Sorbial S.A.S. en el valor nutritivo de las dietas y en la respuesta animal, los cuales están formados por una

mezcla de cepas seleccionadas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*” (Sánchez, Lamela, & López, 2015, pág. 184).

Milián (2014) menciona que “se aislaron e identificaron cepas de *Bacillus* spp. tomadas de: heces de bovino, contenido del ciego de pollos, jugo de tomate alterado y mezcla de suelo con sangre bovina, para la elaboración de bio-preparados probióticos con posibilidades de uso en animales de interés zootécnico” (pág. 2).

Según Arteaga (2015) “Algunas experiencias prácticas en la provincia de Manabí evidencian un comportamiento productivo satisfactorio. Es el caso de la utilización de probióticos en gallinas ponedoras, en las que el porcentaje de postura, huevos alojados por ave por semana y conversión en huevos por kg de alimento consumido, fue superior al tradicional. Similar comportamiento se ha observado en cerdos lactantes cuando se incorporó el *Lactobacillus salivarius* C65, obteniéndose animales con mayor aumento de peso luego de 5 semanas” (pág. 1).

Los probióticos de mayor conocimiento comercial; pertenecen a las especies *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bífidum*, *breve* y *longum*) y *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *reuteri*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* y *salivarius*) (Simone, 2018, pág. 2).

Los productos probióticos pueden contener una o varias especies de los microorganismos identificados como tal, ello conjuntamente con la microflora intestinal conforman una barrera contra los microorganismos patógenos (Kerry, y otros, 2018, pág. 1).

Por lo antes mencionado, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar bacterias ácido-lácticas nativas de muestras de leche bovina del cantón Cayambe con potencial probiótico en animales; además se aislaron bacterias ácido-lácticas de muestras de leche lacto-fermentadas, aplicando técnicas microbiológicas convencionales y se identificaron los microorganismos aislados mediante caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y moleculares para finalmente ser evaluada la capacidad probiótica de las bacterias ácido lácticas aisladas mediante diferentes pruebas de laboratorio.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1. Problemática

Según lo que menciona Meza (2014) “En el Ecuador, se hace uso indiscriminado e irresponsable de antibióticos, principalmente en la ganadería, sea en su alimentación o contra enfermedades, originando resistencia bacteriana frente a los antibióticos; y a su vez problemas de riesgo, debido a que constituyen un reservorio de organismos resistentes, capaces de infectar al hombre, por otro lado, hay que considerar que la ingestión de alimentos que contienen residuos de antibióticos, consiguen originar en el hombre reacciones de alergia o hipersensibilidad, además de la transferencia indirecta de genes resistentes, mismos que pueden generar graves intoxicaciones alimentarias, que no se combaten fácilmente con medicamentos, así como enfermedades que suponen una amenaza para la vida” (pág. 3).

Siendo realmente una gran problemática para el Ecuador, considerando que la ganadería ha sido tradicionalmente un sector clave para la economía nacional aportado alrededor del 7,59 % del Producto Interno Bruto (PIB) del país (Más Leche-Centro de la Industria Láctea, 2017, pág. 1). Por lo tanto una buena alimentación según Cueva (2014) es uno de los factores que determinan el éxito de la explotación ganadera, mejor sanidad, mayor incidencia en la producción y de reproducción del ganado lechero (pág. 18).

1.2. Importancia de los probióticos

La crianza eficiente de las terneras como futuras productoras de leche, es uno de los principales objetivos de la ganadería, sin ello no será posible asegurar el sostenimiento de la producción ni el crecimiento del rebaño (Cueva, 2014, pág. 18).

Según Rosmini, *et. al* (2004) indica que “el ganado bovino a partir de su nacimiento entra en contacto con los microorganismos del medio ambiente que colonizan su cuerpo. El aparato digestivo se recubre de microorganismos que se desarrollan naturalmente en ese hábitat, además cada especie animal presenta una composición distinta y específica de microbiota intestinal. El uso de los microorganismos con capacidad probiótica es una alternativa terapéutica para el tratamiento y prevención de algunas patologías animales” (págs. 182,183,185).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016) la crianza de animales libres de promotores de crecimiento es el objetivo primordial debido a que microorganismos patógenos van cada vez adquiriendo mayor resistencia a los antibióticos (págs. 638-639).

En la Unión Europea desde el 2006 se exige la disminución de los antibióticos y cambiar a una alternativa más natural que permita el incremento de la proteína, que sustente un cuidado adecuado de los animales y al mismo tiempo garantice la seguridad alimentaria (Benoit & Catherine, 2013, págs. 284-292).

En los países desarrollados es muy común observar al ganado con un cuidado estricto en su dieta, sin embargo, en países menos desarrollados la crianza se lo realiza con residuos de cultivos, el pastoreo, entre otros productos agroindustriales muy ricos en

fibra, pero bajos en nitrógeno dando como resultado que se sintetice menos ácido graso y como consecuente la pérdida de productividad (Simone, 2018, págs. 1-9).

El rumen de los animales está poblado por cerca de 200 especies de bacterias con una población de 10^{10} a 10^{11} g/mL, sin embargo, los hongos se los puede encontrar con una población de 10^3 a 10^6 g/mL de 6 géneros anaerobios, mientras que los protozoos y ciliados se los encuentra de 10^7 y 10^6 g/mL aproximadamente. Las bacterias son las encargadas en degradar y transformar los alimentos por lo que se encuentran en una proporción del 50 % al 75 % (Muhammed, 2018, págs. 241-249).

Las investigaciones en el incremento de la cantidad de microorganismos benéficos han demostrado que no solo el sistema gástrico es el que mejora, sino también la digestión, el metabolismo, el sistema inmune y la comunicación del intestino con el cerebro además de la competencia contra otros microorganismos patógenos (Davis, 2014, págs. 9-17).

1.3. Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Se trata de microorganismos con capacidad probiótica, que crecen naturalmente en mayor cantidad en el intestino de animales por lo que, se los han identificado también de leche y se utilizan en la producción de alimentos fermentados (Nishino & Matsuda, 2017, pág. 2).

Su capacidad antagonista hacia otros patógenos se debe al cambio de pH por la producción de ácido-láctico, ácido propiónico y ácido cítrico que resulta del proceso de síntesis de carbohidratos, la producción de metabolitos de hidrogeno, bacteriocinas entre otras (Novillo, 2016, págs. 2,3).

Las características más importantes es que son un grupo heterogéneo de microorganismos que generan ácido láctico como resultado de la fermentación de azúcares mediante 2 vías (homofermentativa y heterofermentativa produciendo aquí CO₂, etanol y/o ácido acético). Pueden ser ubicadas en el grupo de las bacterias grampositivas con catalasa y oxidasa negativa, no esporuladas, no pigmentadas e incapaces de producir nitratos, generalmente inmóviles y su crecimiento en un medio anaerobio, aerotolerantes o microaerófilas (Díaz, 2012, pág. 17).

Las BAL son muy utilizadas en la industria, que con un tamaño de genoma de 2 a 3 Mpb han conferido un valor nutricional, sabor y textura de los lácteos consumidos hoy en día y productos como el pan, embutidos, encurtidos entre otros (Novillo, 2016, págs. 1-3).

Se han identificado también compuestos aldehídos 3 hidroxipropionico, también llamados retuina las cuales contienen capacidad antimicrobiana y que pueden ser producidos por las especies *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinides* y *Lactobacillus coryniformis* (Sánchez & Tromps, 2014, págs. 124-129).

1.4. Principales Probióticos por su género

Como microorganismos probióticos se utilizan principalmente de manera comercial, bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Pérez & Falco, 2012, págs. 29,30), sin embargo, según Rosmini, *et. al*, (2004) indica que del tubo digestivo de terneros criados en condiciones artificiales se han aislado en mayores cantidades *Pediococcus acidilactis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus casei*. con excepción de *L.*

farciminis, estos microorganismos han sido reportados en otras especies animales. Además, Rosmini, *et. al.*, (2004) menciona lo importante que es tomar en cuenta que el intestino de los terneros jóvenes es colonizado a partir del ambiente en el cual son criados (págs. 181-191).

1.4.1. Género: *Lactobacillus*

Lactobacillus es el agente probiótico más comúnmente usado; son bacterias grampositivas, no móviles, no forman esporas, catalasa negativa, con forma de bacilos y su principal característica es la formación de ácido láctico como producto prioritario de la fermentación, en animales de granja confieren buena salud intestinal estimulando el crecimiento de una microbiota saludable, previniendo la colonización intestinal de patógenos entéricos, reduciendo la contaminación fecal, nociva por la emisión de gases, producción de sustancias antimicrobianas, patrones de resistencia a antibióticos, mejora de la capacidad digestiva y respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, eficacia y seguridad demostrables (Dowarah, Verma, & Agarwal, 2017, págs. 1-6).

El género *Lactobacillus* es el más conocidas por los avicultores ya que su aumento de ácido láctico disminuye el pH y combate ferozmente contra *E.coli*, *Pseudomonas* sp, *Prpteus* sp, *Salmonella* sp y *Stafilococus* sp (Tomaló, 2007, pág. 4).

Se divide en tres grupos: a) homofermentativos obligados (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii subespecie bulgaricus*, etc) termobacterias que no fermentan pentosas; b) heterofermentativos facultativos (*L. casei*, *L. plantarum*, etc) que fermentan pentosas y c) heterofermentativos obligados (*L. brevis*, *L. reuterii*, etc) que producen CO₂ de glucosa (Jay & Loessner, 2005, págs. 149-173).

1.4.2. Género: *Lactococcus*

El género *Lactococcus* está conformada por bacterias ácido-lácticas, esféricas u ovaladas de catalasa negativa, oxidasa negativa, no móviles y son utilizadas como probióticos, en especial la especie *Lactococcus Lactis*, la cual tiene beneficios en animales frente a patógenos causantes de diarreas, es decir ayudan a mejorar la digestión e incrementan la capacidad inmunológica del animal (Sun, y otros, 2018, págs. 296-303).

1.4.3. Género: *Bacillus*

EL género *Bacillus* es muy reconocido en la industria acuícola por poseer especies productoras de antibióticos se han utilizado como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, entre otras aplicaciones que le confieren la capacidad probiótica. Dado que *Bacillus* es un género de especie esporulenta le confiere una ventaja sobre las bacterias *Lactobacillus*, entre ellas mayor tolerancia frente a otros patógenos, debido a que generan exoenzimas y su capacidad de resistencia a condiciones de temperatura y mayor vida útil (Ajay, y otros, 2016, págs. 62-70).

1.5. Pruebas de Laboratorio.

1.5.1. Pruebas de Lacto-fermentación

Se trata de una prueba rápida de fermentación de la leche que dejando en reposo 24 horas y a 37 °C se produce la fermentación por parte de la flora bacteria existente en la leche, las características de la fermentación como coagulación, presencia de gas y de suero proporciona datos acerca de la calidad de la leche sin necesidad de un análisis exhaustivo. Otorgan resultados como grado de contaminación, conservación y condiciones sanitarias, desde el momento de la obtención u ordeño hasta la fabricación

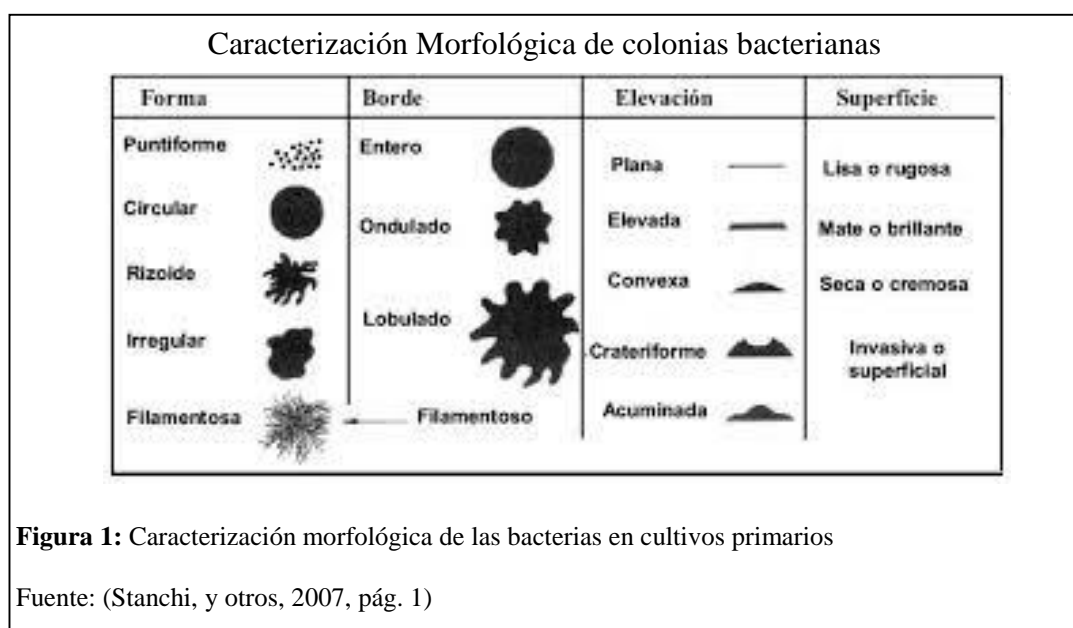
del producto. Para ello se considera la abundante producción gaseosa, escasa coagulación, descomposición pútrida entre otras alteraciones (Zamorán, 2003, pág. 25).

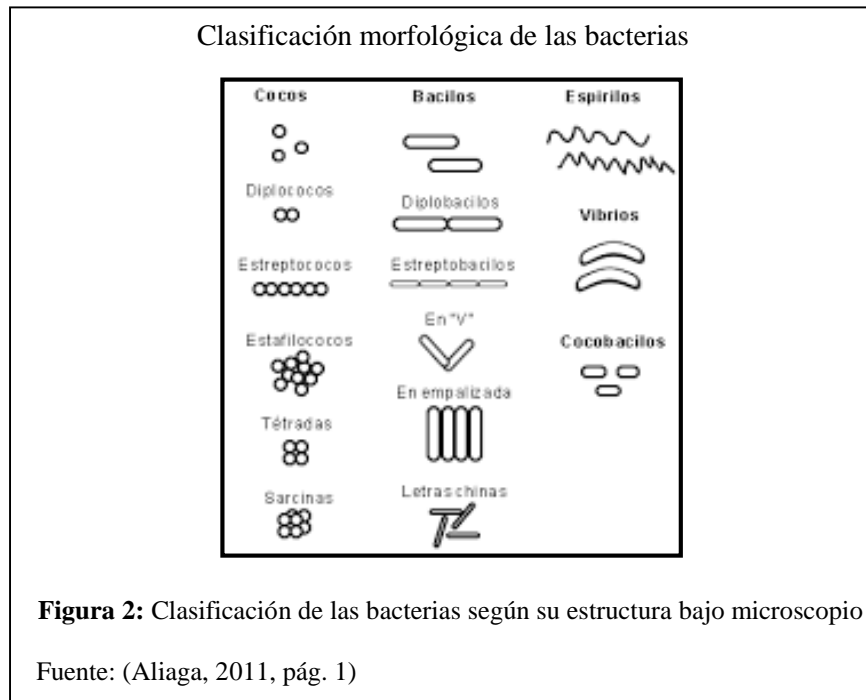
1.6. Métodos de identificación

1.6.1. Macroscópicas

1.6.1.1. Tinción de Gram y morfología

La identificación morfológica es el paso fundamental para el aislamiento de colonias bacterianas, mediante la observación de forma, consistencia, y color, (Figuras 1 y 2); En el caso de la tinción Gram permite obtener una clasificación generalizada en dos grandes grupos mediante su forma. Las Gram positivas (+) y las Gram negativas (-) proporcionan también un control de pureza de la colonia bacteriana, donde la gran mayoría de bacterias Gram (-) resultan ser patógenas, mientras que las Gram (+) no proporcionarían un peligro para el ser humano, en el que se encuentran las bacterias ácido-lácticas (Fernández & Garcia, 2010, págs. 25-26).





1.6.1.2. Catalasa

Se trata de una adaptación de los microorganismos al H₂O₂ (Peróxido de hidrogeno) que, aunque no es un radical libre es poco reactivo. La enzima catalasa es de vital importancia en los organismos, para la eliminación del H₂O₂ intracelular, protegiendo a las especies aeróbicas o reactivas del oxígeno por ser un residuo, de las especies anaeróbicas resultando negativo en una prueba ya que no se podrá evidenciar el burbujeo (Kraeva & Horáková, 2017, pág. 1).

1.6.1.3. Oxidasa positiva

La prueba de oxidasa permite la identificación de la enzima oxidasa, debido a la reacción con el citocromo oxidasa, que activa el citocromo por la presencia de oxígeno generado de la descomposición oxígeno-agua, dependiendo mucho de la especie bacteriana las especies aerobias serán las que por lo general darán positivo a esta prueba, mientras que la gran mayoría de bacterias anaerobias darán un resultado

negativo y las bacterias anaeróbicas estrictas que carecen de la enzima, por lo que generan oxidasa negativos (Kraeva & Horáková, 2017, pág. 2).

1.6.2. Pruebas moleculares

Las pruebas moleculares permiten un análisis mucho más confiable en la identificación de microorganismo, la técnica basada en el aislamiento de material genético permite un mayor porcentaje de confiabilidad de lo que se quiere obtener (López & Mejía, 2012, págs. 3169-3175).

1.6.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN es la técnica fundamental dentro de las practicas moleculares, el aislamiento y purificación permiten que pueda ser utilizada en el PCR y la secuenciación (Alejos, Aragón, & Corejo, 2013, págs. 24-29).

Debido a que la molécula de ADN se encuentra dentro de varias membranas conformadas por lípidos y proteínas se utilizan detergentes como el dodecilsulfato sódico (SDS). La solución de lisis permitirá que se degrade los diferentes organelos que conformaran la célula y una solución de proteasas permitirá degradar las proteínas mientras que el uso de fenol cloroformo-alcohol isoamílico las precipitará (González & González, 2011, págs. 875-883).

El uso de etanol a 4 °C o isopropanol y la centrifugación permite que se forme el pellet el cual es el ADN ya purificado. El uso de buffers Tris/EDTA permite almacenar el ADN aun pH 8 mientras que el ácido etildiaminotetraacético (EDTA) permitirá una estabilidad del ADN al unirse a la molécula (López & Mejía, 2012, págs. 3169-3175).

1.6.2.2. Electroforesis

La electroforesis se ha convertido en la principal técnica de análisis microbiológica y se basa en la separación de moléculas por su polaridad, permitiendo el uso de electricidad para la separación de moléculas como consecuencia de la diferenciación en pesos moleculares verificándose por la distancia que recorren dentro de un gel, el mismo que generalmente es de agarosa y en cuyo interior presenta micro orificios por donde circula la molécula de ADN (Flórez & Mayo, 2015, págs. 63-69).

También depende de la concentración del gel, considerando que a mayor concentración los orificios serán de menor tamaño y no permite una circulación amplia. La molécula de ADN deberá ser previamente aislada de todos los componentes que la rodean el cual se obtiene utilizando soluciones degradadora de lípidos, ARNasas, buffer amortiguador y solventes como alcohol y cloroformo (Kuhn, Böllmann, & Krahl, 2018, págs. 732-751).

1.6.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Permite la amplificación de ADN con el propósito de obtener mayor cantidad de muestra, la técnica utiliza enzimas que provocan una fuerte catálisis, en la reacción se utiliza como sustrato ADN genómico, los primers, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), el ion magnesio, solución amortiguadora (buffer) y H₂O; Todos estos elementos sometidos a tres etapas: La desnaturalización, hibridación y elongación permiten obtener copias de un fragmento de ADN en especial, los mismos que son analizados en geles de agarosa para confirmar su existencia (Tamay de Dios, 2013, págs. 70-78).

Los primers utilizados forman parte de la región 16S ARN de la región del 16S del ribosoma secuencia que se encuentra en todas las especies con un claro distintivo en bacterias que permite clasificar taxonómicamente por las diferencias que existen en su secuencia de ADN (Sánchez & Domínguez, 2017, págs. 730-736).

1.6.2.4. 16S rRNA

La secuenciación del segmento de restricción 16S es una herramienta ampliamente utilizada hoy en día en la investigación taxonómica, filogenia, o entornos de microorganismos los cuales se los puede analizar en los diferentes niveles evolutivos (reino, phylum, clase, orden, familia, género y especie) con un alto grado de confiabilidad debido a que la longitud y secuencia varía entre especies (Li & Ding, 2017, págs. 16-26).

1.6.2.5. Secuenciación Sanger

Se denomina a la técnica por la cual una vez amplificado un segmento específico de ADN se puede identificar cada uno de sus nucleótidos, utilizando equipos de secuenciación muy sensibles capaces de captar la fluorescencia emitida por los 2'-deoxinucleótidos (dNTP) y los dideoxinucleótidos (ddNTP) unidos a la cadena de ADN (Brownlee, 2018, págs. 2661-2669).

El método consiste en obtener una cadena complementaria de ADN a la cual se unen cada uno de los dNTP y ddNTP con la ayuda de la polimerasa la cual unirá nucleótidos a la cadena hasta encontrarse con una base modificada para que detenga la síntesis. La reacción se lleva a cabo en 4 diferentes tubos con la misma secuencia de ADN a analizar, los 4 nucleótidos que se unirán a la cadena guía, y el nucleótido modificado para emitir fluorescencia debido a que cada uno poseerá un color diferente. La

revelación se la realiza en gel de acrilamida con un láser que capta los colores de los diferentes nucleótidos modificados e identificando cada una de las bases que conforman la secuencia (Besser, y otros, 2018, págs. 235-241).

1.6.2.6. NCBI

También conocido como El Centro Nacional de Investigación Biotecnológica tiene como objetivo el almacenar y divulgar información científica de los procesos moleculares y genéticos con énfasis en la salud y enfermedades básicamente enfocado en la automatización de la información, el análisis por métodos computacionales de estructuras y moléculas para uso de la comunidad científica (Pepper, 2018, pág. 1).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Localización y descripción

La presente investigación se realizó en la “Asociación de Productores Agropecuarios el Progreso Cariacu” (APPC), constituido por 45 socios, localizada en la comunidad de Cariacu, Cantón Cayambe, provincia de Pichincha. Cuya ubicación geográfica tiene una Latitud de: 0°05'21.02"; Longitud: 78°06'06.33" y Altitud: 2850 a 3100 m.s.n.m. Las condiciones climáticas de la zona se mantienen a una temperatura entre 8 a 22°C, frío templado, con heladas de incidencia moderada. (Anexo 1)

2.2. Toma de muestras

La investigación se realizó previa visita y autorización de la directiva de la organización “APPC” para la obtención 45 muestras de leche, (Anexo 2) durante 5 ocasiones con un total de 225, con el fin de reducir errores estadísticos en el promedio de datos como es el Conteo Total Bacteriano (CBT) o factores externos que generen índices bajos ocasionales en los mismos datos (Wallace Ruiz, 2015).

Estas muestras fueron tomadas según el instructivo N°001 del Laboratorio de Calidad de Leche, el mismo que consiste en recolectar 50 mL de leche por cada productor en envases de plástico previamente desinfectados, estos deben ser previamente identificados y etiquetados con código de barras según el número de muestra, para luego ser transportadas en envases térmicos sellados hasta los laboratorios de la carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.3. Análisis de Laboratorio

2.3.1. Lacto-Fermentación

Para realizar el aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas como uso en probióticos, se controló la calidad de la leche mediante lacto-fermentación, el cual consiste en tomar 10 mL de muestra de leche en tubos de ensayo e incubar a baño maría por 24 horas (Universidad de Zuria, 2003, págs. 19-20). Para la selección se tomaron referencias visuales, las mismas que pasaron desde un estado líquido hasta uno gelatinoso tomado como referencia la Tabla 1.

Tabla 1.

Interpretación y clasificación de leche lacto-fermentada

COD	ESTADO	DESCRIPCIÓN
1.	Estado Líquido	Sin formación de suero o alteración de la muestra, es normal que presente una capa de grasa de leche.
2.	Estado Gelatinoso	Formando un coágulo homogéneo de la muestra, en ocasiones poca cantidad de suero.
3.	Estado Líquido Separado	No homogéneo puesto que presenta una capa observable clara de suero de leche y una capa de grasa indicando tres capas.
4.	Estado Queso	formando coágulos a manera de quesillos no homogéneos con clara separación de suero de leche entre los coágulos y en ciertos casos pequeñas burbujas de aire atrapadas

Fuente: (Murillo, 2003, pág. 20).

Después de verificar si existe o no separación por suero en las muestras, fue necesario inclinar el tubo de un lado a otro para verificar correctamente el estado líquido o gelatinoso de cada muestra. (Anexo 3)

2.3.2. Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se realizaron aislamientos de cepas de bacterias ácido-lácticas a partir de muestras de leche lacto-fermentadas que presentaban estado 1 y 2 según la (Tabla 1), provenientes de los productores del Centro de Acopio. Para lo cual las muestras seleccionadas fueron comparadas con los datos CBT (descartando aquellas muestras con un CBT > 150 000 CBT/mL, o estado de lacto-fermentación 3 y 4) provenientes del LCL y así verificar una concordancia con las mismas (Anexo 4 y 5).

2.3.2.1. Preparación de Medios de Cultivo

Cada medio se realizó según las especificaciones establecidas por el fabricante, utilizando agua destilada y esterilización a 121 °C durante 15 min en autoclave.

Tabla 2.

Especificaciones para la preparación de medios.

Medio	Especificación g/L
MRS (Man, Rogosa y Sharpe)	Caldo: 52 Agar: 70
PEPTONA	15
AN (Agar Nutriente):	23
TBS: Tryptic Soy Broth	30
Agar bifásico sangre-chocolate	Adquirido de laboratorio
Agar Malta:	28
TSA: Tryptic Soy Agar	37

Elaborado por: Los autores, 2018.

2.3.2.2. Protocolo de Siembra

Estas muestras lacto-fermentadas se diluyeron en agua peptonada estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-2} e inoculadas por dispersión 100 μL de la dilución 10^{-2} en la superficie de los medios Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y Agar Nutritivo (AN) esparciendo uniformemente con un asa de vidrio. Posterior a ello, ambos medios fueron incubados en una atmósfera de anaerobiosis a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un intervalo de tiempo de 48 a 72 horas (Lara & Burgos, 2012, pág. 32) .

2.4. Protocolo de Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se seleccionaron las colonias a partir de sus características morfológicas, y en su posterior aislamiento, mediante la técnica de siembra por estrías o agotamiento en los medios MRS y AN (Milián, *et. al*, 2014, pág. 347). Cada cepa aislada fue sometida a cuatro pruebas preliminares de identificación: tinción de Gram, catalasa y oxidasa (Sánchez, y otros, 2011, pág. 155).

Las cepas puras se sembraron en medio bifásico (agar chocolate-agar sangre) y fueron caracterizadas según el grado de hemólisis producido: α -hemólisis, β -hemólisis, γ -hemólisis, de acuerdo con el comportamiento descrito en el (Anexo 6b) verificando así su familia correspondiente, además de evitar falsos positivos a causa del medio AN, principalmente en la prueba de catalasa. Las colonias aisladas se cultivaron por duplicado (Lara & Burgos, 2012, pág. 32) y las cepas puras de bacterias ácido-lácticas, se conservaron en tubos con agar MRS y AN en refrigeración - $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la adición del 30 % (v/v) de glicerol (Díaz M., Iglesias, & Valiño C, 2014, pág. 20).

2.4.1. Métodos Moleculares

La identificación molecular de las BAL se realizó mediante extracción de ADN de las muestras de cepas bacterianas puras, previamente masificadas en medios TBS y MRS, en condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 72 horas (Lara & Burgos, 2012, pág. 32); posterior a ello se analizó en gel de agarosa, para verificar la presencia de ADN, la misma que continuamente se amplificó partiendo de la región 16S mediante PCR convencional. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa corroborando así la amplificación, a su vez, se confirmó si el tamaño de banda corresponde al tamaño de la región 16S. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar y purificar en la empresa MACROGEN en Corea (Fuerte & Mallitasig, 2018).

2.4.1.1. Extracción de ADN

Una vez seleccionadas las cepas de mayor masificación se procedió a extraer el ADN mediante una adaptación de las técnicas descritas por Reader y Broda (2008) Paredes y Yugsi (2016) modificado por (Fuerte & Mallitasig, 2018): “Colectar el material celular en los tubos eppendorf añadiendo 1000 µL del medio que contiene la muestra y centrifugar por 5 min a 13000 rpm y retiramos el sobrenadante, este paso se repite hasta obtener una cantidad adecuada, se aumentó 500 µL de buffer de lisis (200 mM Tris HCl a pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) luego se homogenizó empleando vórtex por 1 min y se incubó en termo bloque por 20 min a 60 °C, aplicando vortex cada 10 min. Luego se agregó 500 µL de solución fenol-cloroformo a 4 °C en proporción 1:1 homogenizado en vórtex por 5 min. Posterior se centrifugó a 13000 rpm por 20 min separando el ADN suspendido en el cloroformo.

El sobrenadante fue transferido a un tubo de 1,5 mL, añadiendo 400 µL de cloroformo a - 20 °C, mezclado por 1 min mediante inversión y centrifugación a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante se incubó en un nuevo tubo junto con 4 µL de ARNasa (10 mg/mL) a 37 °C por 30 min. Se agregó 500 µL de isopropanol a 4 °C, inversión por 1 min e incubado a - 20 °C por 15 min. Posterior a ello centrifugar por 5 min a 13000 rpm. Se desechó el sobrenadante conservando el pellet formado, el cual fue lavado con 500 µL de etanol al 70 % a - 20 °C e inversión 1 min. Finalmente centrifugar por 5 min a 13000 rpm, el sobrenadante fue desechado. El pellet seco se resuspendió en 50 µL de buffer Tris EDTA y almacenado a - 20 °C. La presencia o ausencia de ADN fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, añadiendo 5 µL de Sybr safe por cada 50 mL de TBE 1X. Cada muestra fue preparada con 5 µL de ADN, 5 µL de tampón de carga Blue Juice 2X y fueron corridas a 90 V por 40 minutos en la cámara de electroforesis Labnet (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012). El gel fue revelado y fotografiado en un equipo foto documentador Bio-imaging systems” (págs. 25-26).

2.4.1.2. Amplificación de la región 16S (PCR)

La amplificación de la región 16S rRNA se realizó usando los primers 27F (5´TCCTACGGGAGGCAGCAGT3´) Y 1492R (5´GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT3´) mediante la técnica PCR: “En tubos de 0,2 mL se colocó 12,5 µL de Master Mix Go Taq *Promega*, 0,5 µL de primer 16S rRNA Forward, 0,5 µL de primer 16S rRNA Reverse, 10 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN resultando en un volumen final de 25 µL para cada tubo descrito en el manual.

La PCR se realizó en el termociclador marca Labnet Multigene bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, annealing a 60 °C por 2 minutos, extensión inicial por 1 minuto a 72 °C y extensión final de 7 minutos a 72 °C seguido de mantenimiento a 4 °C (Umesha, Manukumar, & Raghava, 2016). Los productos de PCR fueron observados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % bajo las mismas condiciones empleadas para detectar presencia de ADN” (Fuerte & Mallitasig, 2018, pág. 27).

Tabla 3.

Especificaciones para cada reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad µL
Agua	9,25
Disolución	1,25
Fower	0,50
Revers	0,50
Taq	12,50
Muestra	1,00

Elaborado por: Los autores, 2018

2.4.1.3. Secuenciación.

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar en la empresa MACROGEN en Corea, en tubos eppendorf de 1,5 mL con 20 µL de muestra a una concentración de 20 ng para ser analizados empleando la técnica Sanger y los resultados obtenidos fueron comparados con la base de datos del NCBI mediante el software BLAST.

2.4.2. Análisis de secuencias

Se analizaron la validez de las secuencias obtenidas mediante el programa FinchTV versión 1.4.0. Posteriormente las secuencias fueron alineadas en el software Muscle de Mega 6 para finalmente las muestras deseadas llevarlas a demás análisis como probióticos.

2.4.3. Evaluación de la capacidad probiótica

Para la evaluación de las propiedades probióticas, se inocularon 100 µL de cada microorganismo, a una concentración conocida de (1500 000 UFC/mL). Además las siguientes pruebas fueron modificadas según lo usado por Lara & Burgos (2012) con incubación a 35 °C durante 24 horas, medios MRS y AN en anaerobiosis, para comprobar que son microorganismos probióticos, la sobrevivencia y resistencia se comprobó al comparar el conteo de microorganismos viables del inóculo, con las células sobrevivientes después de la incubación a diferentes valores de pH el porcentaje de resistencia fue calculado por la siguiente ecuación:

Donde:

$$\% R_p = \frac{(UFC / \text{medio } p)}{(UFC / mL \text{ medio inocuo})} * 100$$

R_{pH} = Resistencia de prueba

UFC = Unidades formadoras de colonias

Medio p = Medio modificado para la prueba

Medio inocuo = Medio sin modificar, útil como control (pág. 33).

La tolerancia a cambio de pH se evaluó a diferentes valores de (3, 5 y 7); usando HCl 2 mol y NaCl 10 mol y un potenciómetro pH; mientras que la tolerancia a sales biliares fue realizado a diferentes concentraciones de (0,05; 0,15 y 0,3 % p/v) de Dehydrocholic acid sodium salt (pág. 36).

Para la tolerancia a cambios de temperatura aplicaron temperaturas de (25, 35 y 42 °C) y en la tolerancia a concentraciones de NaCl se aplicaron concentraciones de (2, 4, 7 % p/v). Mientras que en la prueba de antagonismo fue realizada contra *Salmonella* sp. y *E. coli* pertenecientes al banco de cepas de los laboratorios de la carrera de biotecnología, las cuales fueron inoculadas a igual concentración que las cepas de interés en las pruebas anteriores en agar TSA, en la superficie se colocaron 6 discos impregnados con los microorganismos de ensayo. La acción antagónica se evidenció por la presencia de halos de inhibición y crecimiento alrededor de los discos. (pág. 33).

2.4.4. Análisis estadístico.

El presente ensayo fue llevado a cabo bajo un diseño de bloques completos al azar, conducido con un arreglo trifactorial 13x2x6 (Pruebas * Medios de cultivo * Bacterias). El análisis estadístico se realizó en el programa Infostat, usando modelos lineales generales y mixtos; y las comparaciones de medias fueron discriminadas para los efectos simples de los factores mientras que para interacciones fueron de hasta dos factores, usando la prueba DGC (Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves).

Capítulo 3

Resultados y Discusión

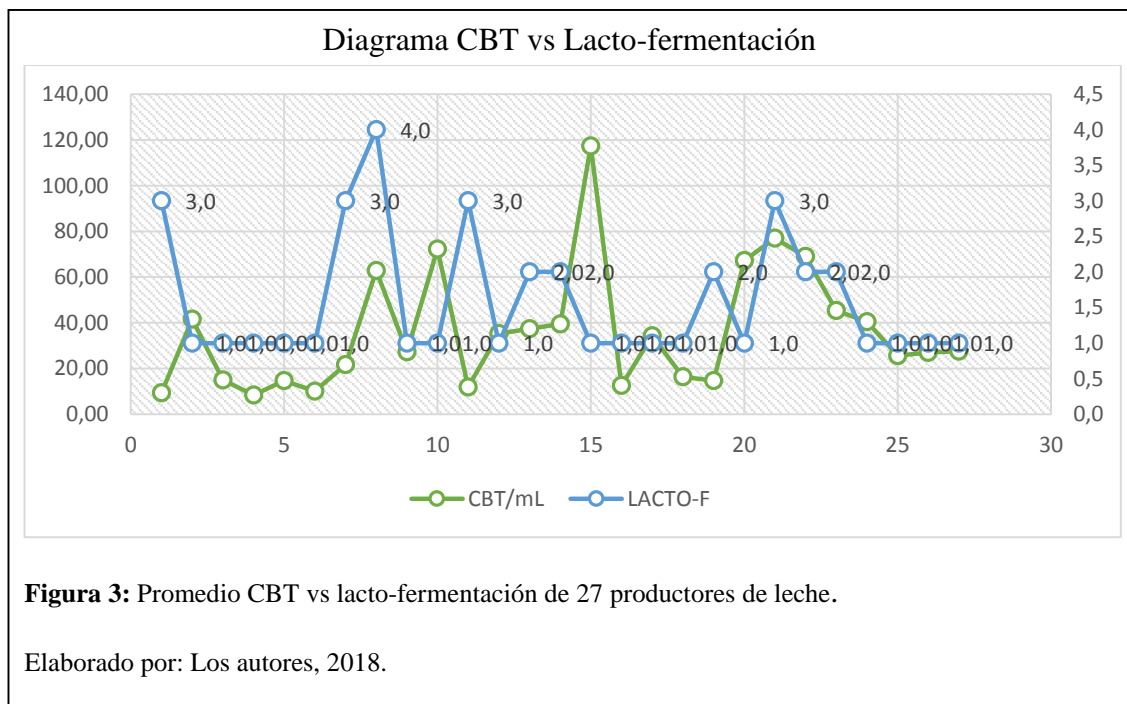
3.1. Lacto-fermentación

De los datos obtenidos para lacto-fermentación de 45 productores (225 muestras) se descartaron aquellos productores que no concordaban con un Conteo Total Bacteriano $< 150\,000$ CBT/mL, además de no presentar una constancia en la presentación de su leche en los días de muestreo; obteniendo así una muestra final de 27 productores, es decir (135 muestras) las cuales se presentan en los Anexos 4 y 5, incluyendo aquellas muestras con una lacto-fermentación no idónea (estado 3 y 4) que concuerdan con los autores Jay, Loessner, & Golden, (2005) mencionando a los bacilos coliformes como productores de gas a partir de lactosa (pág. 150).

Por ello en la figura 3, se observa que el CBT no tiene una correlación potencial con la calidad de la leche implicada en el proceso de lacto-fermentación debido a que pueden ser o no patógenas, sin embargo, la característica fundamental son los rasgos de textura, color y aroma claramente visible en los estados físicos 1 y 2 de 110 muestras que pertenecerían a los géneros de bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, las cuales están implicadas en la textura, gelificación de la leche, sabor, estabilidad y aroma en alimentos fermentados que ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos (Parra H., 2010, pág. 94).

También se sabe que por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos, mientras que en la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento; y algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina) que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (Gerónimo, 2007, pág. 13).

Por lo tanto, se tomaron en cuenta aquellas bacterias que mostraban características altas de coagulación homogénea sin que exista un estándar de rango específico en los datos CBT que concuerde con este protocolo de lacto-fermentación útil para probióticos, resultando del anterior discernimiento 22 productores (110 muestras) de óptima calidad, obtenidas de las 135 iniciales, de las que se logró aislar durante el proceso 10 cepas distintas.



3.2. Identificación mediante pruebas bioquímicas

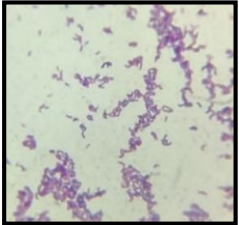
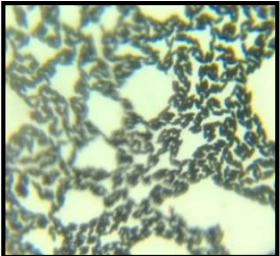
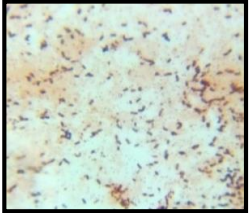


Todas las especies de bacterias fueron identificadas morfológicamente como BAL puesto que cumplían con los requisitos buscados, concordando con resultados mencionados por estudios realizados por Vélez Zea, Gutiérrez, & Campuzano (2015) indicando que deben tener borde entero, forma circular, una ligera elevación, convexas, cremosas; además de ser Gram positivas, catalasa y oxidasa negativa (págs. 141-149).

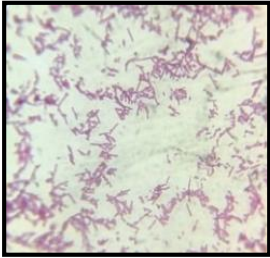
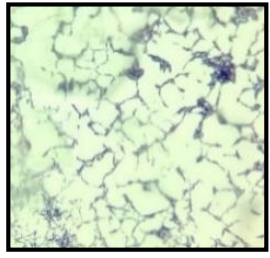
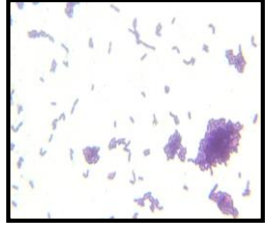
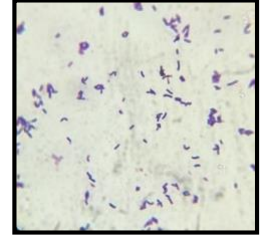
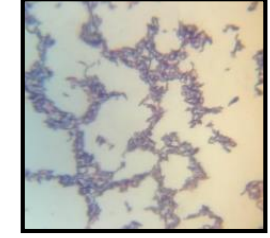
Todas las bacterias fueron observadas con un aumento de 100X y aceite de inmersión para ser catalogadas correctamente (Tabla 5). Adicionalmente las pruebas de hemólisis indicaron que las bacterias pertenecen a tres géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bacillus*. Respaldándose con la investigación de Fan WuWu (2016) que menciona 13 géneros de las BAL como “bacterias gram positivas no esporuladas productoras de ácido láctico y ácido tolerantes, anaerobias y catalasa negativa generalmente no motiles” (págs. 8-13).

Pese a existir pocos estudios sobre presencia de probióticos en leche bovina, se conoce que las bacterias de estos géneros son una alternativa al uso de los antibióticos que pueden equilibrar la microbiota del intestino (Jurado, Calpa, & Chaspuengal, 2014, pág. 242).

Tabla 4.

Características de las 10 cepas aisladas inicialmente.

Cód.	Morfología/ Hemólisis/ Presunto Género	Foto microscópico
4M	<p>Bacilos irregulares pequeños / γ – Hemólisis / <i>Bacillus</i> spp</p> <p><i>Bacillus</i> spp: Se usan comúnmente como especies probióticas en la industria de los piensos (Larse, y otros, 2013, pág. 119)</p>	 <p>100X</p>
8	<p>Bacilo uniformes grandes y gruesos / γ - Hemólisis / <i>Lactobacillus</i> spp</p> <p><i>Lactobacillus</i> spp: Ampliamente distribuido en productos de origen vegetal y en el tracto gastrointestinal humano y animal, desde el punto de vista como probióticos comerciales tienen especial interés 26 especies. (Moreno, 2013, pág. 17)</p>	 <p>100X</p>
18 M	<p>Bacilos segmentados cortos / γ - Hemólisis / <i>Lactobacillus</i> spp</p>	 <p>100X</p>
23 A	<p>Cocos / γ - Hemólisis / <i>Lactococcus</i> spp, <i>Pediococcus</i> spp</p> <p><i>Lactococcus</i> spp: En ningún caso son patógenos. <i>Pediococcus</i> spp: Oportunista, en algunos casos. (Rodríguez, 2016, pág. 11)</p>	 <p>100X</p>
27	<p>Bacilos irregulares pequeños / γ - Hemólisis / <i>Bacillus</i> spp</p>	 <p>100X</p>

31 M	Bacilos irregulares largos/ γ - Hemólisis / <i>Bacillus</i> spp	 <p>100X</p>
34 M	Bacilos uniformes largos / γ - Hemólisis / <i>Lactobacillus</i> spp	 <p>100X</p>
35M	Bacilos uniformes largos / γ - Hemólisis / <i>Lactobacillus</i> spp	 <p>100X</p>
38 M	Bacilos irregulares pequeños / γ - Hemólisis / <i>Bacillus</i> spp	 <p>100X</p>
39 M	Bacilos irregulares pequeños y gordos/ Hemólisis: γ / <i>Bacillus</i> spp	 <p>100X</p>

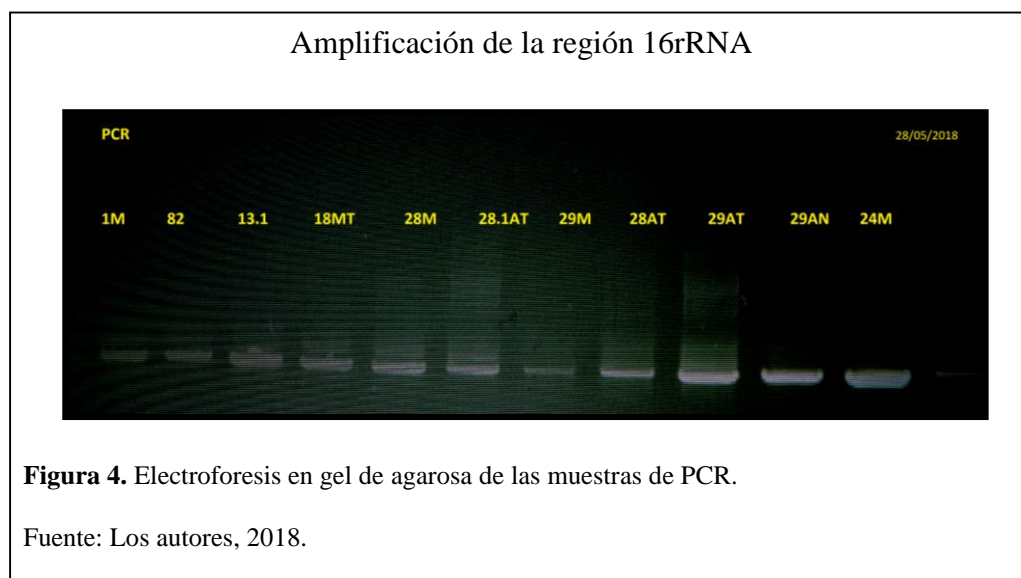
Elaborado por: Los autores, 2018

3.3. Métodos Moleculares

3.3.1. Extracción de ADN y Amplificación de la región 16S

La extracción de ADN se realizó con el método de fenol-cloroformo modificado por Fuertes (2018) de Reader y Broda (2008); Paredes y Yugsi (2016) permitiendo obtener ADN con un tamaño de aproximadamente 13000 pb como se pudo observar en el gel de electroforesis.

El ADN obtenido fue utilizado para amplificar la región 16S rRNA mediante la técnica PCR convencional y se obtuvieron bandas con una media de 1300 pb, que corresponde al tamaño normal a la región 16S rRNA, siendo su tamaño aproximadamente de 1 550 pb de longitud y está compuesta de regiones tanto variables como conservadas (Clarridge, 2004, pág. 840) (Figura 4).



3.3.2. Análisis de secuencias

En la mayoría de las especies se ha obtenido una identidad y cobertura superior al 96 %. Se identificaron 4 cepas del género *Lactobacillus*, 4 cepas del género *Bacillus*, 1 bacteria del género *Lactococcus* y 1 bacteria que no pudo ser clasificada usando la base de datos del NCBI, por lo que fue nombrado *Lactobacillus* luego de la clasificación en el árbol filogenético.

En el género *Lactobacillus* se encontró 1 especie *L.casei*, 2 especies *L.sp* y una especie *L.paracasei*; del género *Lactococcus* se encontró que era *L. lactis sub. Lactis*; mientras que en el género *Bacillus* se encontraron 3 especies *B. cereus* y 1 especie *B. subtilis*. Estas especies son consideradas como probióticas, lo cual se puede comprobar con lo mencionado por las investigaciones de (Tallapragada, *et al*, 2018, págs. 32-36) en el cual identifican especies del genero *Lactobacillus* con un 99 % de similitud, asi como tambien en estudios de metagenomica en los cuales se identifican los generos *Bacillus* y *Lactococcus* como probioticos (Gueimonde & Collado, 2012, págs. 32-34).

Tabla 5.

Identificación Molecular de las 10 cepas aisladas.

COD	ESPECIE	ACCESO	COB.	ID.	SECUECIA
4M	<i>Bacillus cereus</i> strain TERI SID5	gi 1063189077 KX822159.1	99	98	GCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCAC TTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTCTGACAA CCCTAGAGATAGGGGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGAATTGACAAGGGGTTGCATGGGTTGTCGTCCACCTCCTGGTCTGAAATGTTTGGGGTTAAGTTCCCCGCAACCGAGCGGCAACCCCTTGGATCTTTAATT
8	Uncultured bacterium clone	gi 295983650 HM021368.1	95	99	CGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAGCTGAATTC AAAGATCCCTTCGGGGTGATTTGTTGGA CGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGA AACAGGTGCTAATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCAC TTTAGGATGAGCCC GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACA CGGCCCAA ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA ACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGCGCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTCTCAGTGCCGCAGCAAACGCGTTAAGCG

					CTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCCAAGGTTGAAACTCAAAGGGAATTGACGGGGGGCCC GCCACAAGCGGTGGAAGCATGTGGGTTTAATTCGAAAGCAACGCGGAAAAACCTTTACCA AGGTCTTGGACATCCCTGCCGCTACACCC
18M	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain	gi 1279336 906 MG55 1250.1	45	99	CTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGG AACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACAT TTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATG GCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT CACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC ACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGCCTG ATGGAGGAACGCCCCCGAGTTAAAAAAGATTTTTTTTTGGGGAAAAACAATTTTTTTTTG AAAAAAAAAACCCCCAACAAAATAATTTTTCTTTTCGGGGGGTTATCACAAAAAACCGG GGCGTTATTTGTGTAGGCCCCGGGTTTTCTCTTTTGGGGGGGGTGTGCGCATATTTTTG CGGTATAAGAACACACGGGGTTTTTTCTCATAGCAAAAAAACCCCTTATAAAAAA AAAAACCTAAAAGGGAATTTTTTTTTAAAAAAGGGGAACCCCTTTTATTGGGGG AAAACCCCTATTTGAAAAACCAAGGGGAAGAGGCGTTTTTGTTTTTAAAAATCGA GGAGCGCCAACAATGGGGGGGAAAGAATAAAAAACCCCGAGGGCCTTCCCCTAAAAAA AATCAAAGGCTTTGGGGGGGGTTGGCC
23A	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> strain	gi 9371072 89 KR2651 48.1	57	89	CGAAGTGGCCGGCTGCCTAAACTGCAAGTTGAGCGCTGAAAGTAGGAACTTGCTCCA GAATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACA TTTTGAAACGAATGCTAATACCGCATAACAACCTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGA GCAATTGCATCACTCATAGATGATCCCGGTTGTATTATCTAGTTGGTGAGGTGAAGGCTCT CCCAGGGGATAATACATATCCACATGAGAGGGGATCGGCCACATTGGGGCTGAGACAC GGCCAAACTCCACAGGAGGCAGCACTAGGGAATCTTCGGCAATGGGCGAAAGTCTGAC CGAGCAACGCCCGGAGTGAAAAAGTTTTTTGATCGTAAACTCTGTTGGTATAGAAAA AAGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCCTCATGTGGACGGTACTACCCCGAAAAGGGACGGCTA AATTCCTGGCCACAACCCCGGAATACCTAAGTCCCAACGTTGTTCCGGAATTATTGGGG GTTAAACGAGCGCAAGTGGGTTATTAAGTCTGGAGTTAAAAGCCCTGGCTCCACCCTTGTA TGCATTGTAAACTGGTAGACTTGAGTGCACGAAAGGAGAGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTG AAATGCGTACATATATGGAGGAACACCCGTGGCGAAAACGGCTCTCTGGGCTGTGACTGAC ACTGAGGCTCGAAAACGTGGGGAGCAAACAAGAATATATACCCCGGGGGTCCCCCCTAA ACAATAATGCTAGATGTATGGGGGCTTTTTCTCTTTTTTTGCCACCTAAACCACTAAAAC CTCCCCCGGGGGGACAACCCCCCGGGTGTAAATCCCAAGAAATTTATAGGGGGCCCC CAACCGGGGAGCAAGGGGGTTTTTTTTTTTTAAAAACCCGCGGAAAATAACCACGGCTG GAAAATTCCTTTTTTTTTTCAAAAAAATAATTTTTTTCTGAAAAGGAAAAAAGGTG CCCGGGGGTTTTTCCCCCCCCCCCCGGAAAATTTGGGTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCC CCCCCTTTTTTTTTTTTTCCCCCAAAATTTGGGGCCTTAAAAAATAATCCGGGGGTTA AACCCCAAAAAAAGGGGGGGGGGGGTTTCAAAAAAATCCCGCCGGCCCTTAAATT GGGGGGGCACCCCGCCCCCCCCGGGGGGGAAGAAAAAGGTCCGGCCACCCAAAG GTGGGTTTGAAATATCTTAAACCAAACCTTGGT

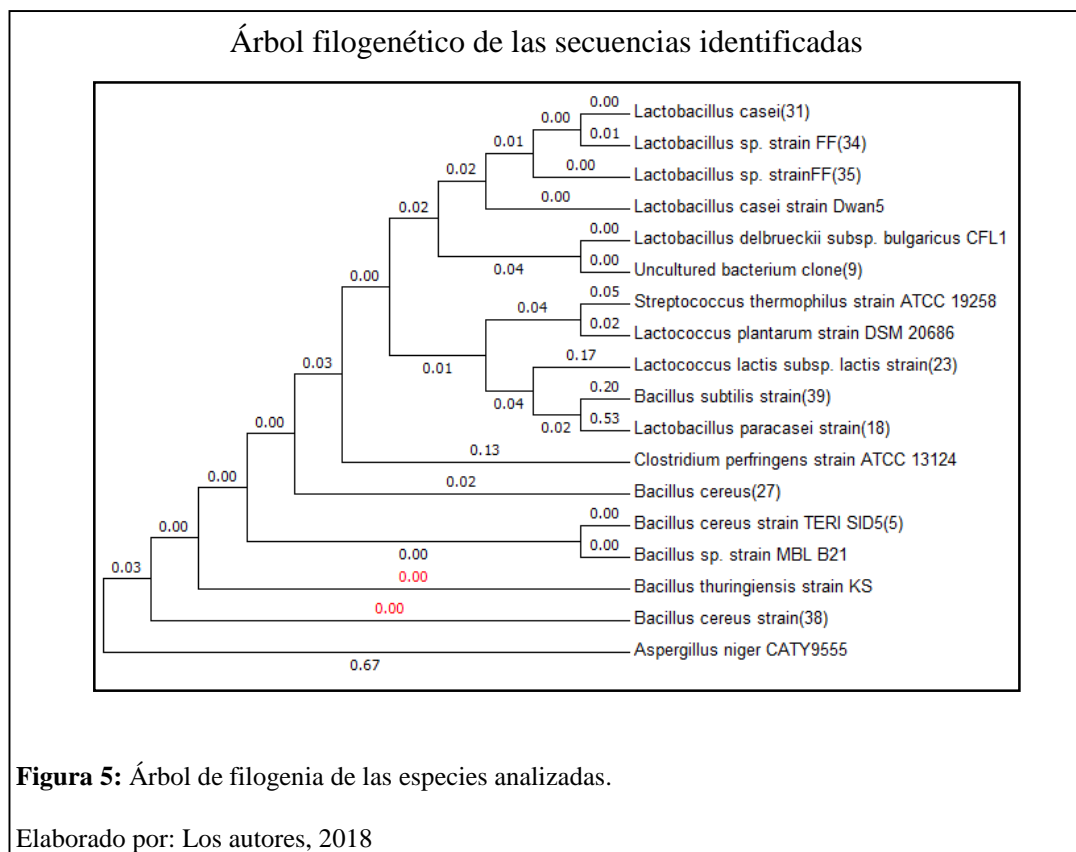
27	<i>Bacillus cereus</i>	gi 927820541 KP980626.1	99	98	TGCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACG GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT AATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCCT TATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC GTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCCGGAAATATTGGGGGGTAAAGCGCGCGCA AGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAACCCACGGCTCAACCGTGGAAAGGTCATTGGAAACT GGGAGACTTGAGTGCAGAAAAAGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCG AAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT GCTAAGTGTT
31M	<i>Lactobacillus casei</i>	gi 762210021 LN623594.1	84	96	TGGAATTGCGGCTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCG AGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGT GGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTT GGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGACACCCGCGGCGTATTAGCTGTTGGT GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG ACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTG TTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGTGGCAAGCGTTATCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTA ACCGAAGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAAGTCCA TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTG GTCTGTAAGTACGCTTAGGCTCCAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATAGATACCCTGGTAG TCCATGCCGTAAACGATGATGCTAGGTGTTTGAAGGTTTCCCCCTTCAATGCCGCACCTA AAGCATTAAAGCATTGCCCCGGGGGGTACAACCCCAAGGTTGAACTCCAAGGAATTGACG GGGGGCCCCACAAACGGTGGAAACATGTTGGTTTATTTTTAACAACCCCAAAAACTACCA GGTCTGGAATTCTTTTGTCCCTGAAAAAAAAGGTTTCCCCTTCCGGGGCAAAAAAAG GGGGGGCAAGGTTTTTCTTCCCCCCCCGTCGGGAAATTTTGGGTTAAATCCCCCCCCCA AAGCCAAACCTTTTTAACAATTTTGGCGCAATTTTTTTTTGGGGCCCCCTTAAAAAAGG CCGGGGGAAAACCCCAAAAAAATGGGGGGA
34M	<i>Lactobacillus sp. strain FF</i>	gi 1070574245 KX898555.1	99	99	CTGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACA TGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA CATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAG ATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG GCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAG

					ACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCT GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGA AGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACCGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG CGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGATATATGGGAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTG ACGCTTAGGCTCCAAAGCATGGGTAGCGAACAAGGATTAGATAACCCTGGGTAGTCCATGCC CCTAAACGATGAATGCTAGGTGTTTGGAAAGGGTTTCCCC
35M	<i>Lactobacillus</i> sp. strain FF	gi 1070574 245 KX89 8555.1	58	98	TGGCTTGCGGGCGTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACC GAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTC TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT GGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCT CTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGTAAGTGGGAAGCGGTTATCCG GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGC TTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCT CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGT CTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCT GGGTAGTCCATGCCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTTGGAAAGGGGTTTCCGCCCTTCA GTGGCCCCACCTAACGCAATTAAGCATTCCGCCCTGGGGGAGTACGACCGCCAAGGGTTGA AACTCCAAAGGGAATTTGACCGGGGGGGCCCGCACCAAGCGGGTGAAGCATGGTGGGTTT TAATTTTTAAGCAACCCCGGAAAAAACCTTTACCCAGGGTCTTGGACAATCCTTTTTTGGTT CCCCCTGAAAAAGAATAAAGGGTTTTCCCCCTTTCCTGGGGGGCAAAAATAAAAAAAGGG GGGGTGGCAAGGGGGTGTTCGTTCCAACCTCCCCGTGTCCCGGGGAAAAGAATTTTGGG GGTTTTAAAATTTCCCCCCCCAACAAAAAGGGGGAAACCCCTTCTTTTAGAAAACAGTT TTTTCCCGCCCCCTTTTTTTTTTTTTGGGGGGGGCCCCCTTCTTTAAAAAATAAAAAAATC CGGGCGGGGGCCAAAAACCCCGCCGAAGAAAAAAGGAATTTTGGGGGGGGGGGGGAGA GGAATCCCCTCAAATTCAAAATACAATAATGGAGGCGCCCCCTCCCTATAAAAAATAAAA GACGGGGGGGGGGGTGACACACACCACACCCGGGTTTTCTCCAAAACCTCCCGGGGGGG AAGGGGGTGGGGGGTAACCAAAACCCCAAAAAATATTTTTTTGTCTTTGGGAAAACCCCA CCCC
38M	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> strain	gi 1227426 422 MF59 2436.1	99	99	CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA ATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTT ATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG

					CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT GAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGA ATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTG GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA GACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA TGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA AGTGTTAGAAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGGTTTAAT
39M	<i>Bacillus subtilis</i> strain	gi 3349809 63 JF9389 68.1	74	89	CTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCGTGATGTTAGCGGCGGAC GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGC TAATACCGGATGGTTCCTTGAACCGCAGGTTCAAGGATGAAAGATGGTTTTCGGCTACCACT TACAGATGGACCCGCGGCGCATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGGAC TAACTGCTTGGACCTTTCGGGACCTTACCCGAAAGCCCCCGTAAATTCCTGGCCACCACC CCGGGAATTCCTAAGTGGGCAGCGTTTGCCCGAATTATTGGGCGTTAAGGGGTTCCAAGGC GGTTCCTTAATCTGAAGTTAAAACCCCCGGTTCACCGGGGAAGGGCATTGGAAACTGGGG AGACTTGAATGGAAAAAAGAGAAGTGAATTTCCCGTGTTACGGGTAAATGGCTAGAGAT GTGGGAAGAAAACCAATGGGCCAAAGGGCACTCTCTTGGTCTGTTAACTGGAGCCTTAAG GAACCAAAAAGCCTGGGGGAACCGAACAGGGATTAATAACCCCTGGGTAAAGTCCCCCGC CCGTAAAACGAATGAAATGGCTAAAATGGTTAAGGGGGGTTTTCCGCCCCCTTTAATGGC TTGCAGCCTTAACGCCAATTAAAGCCACTTCCCGCCCTGGGGGGAAGTTAC

Elaborado por: Los autores, 2018. Fuente: (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2018)

Para respaldar los resultados idóneos del árbol filogenético (Figura 5) se tomaron como referencias a las especies *Lactobacillus casei* strain Dwan5, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus CFL1, *Streptococcus thermophilus* strain ATCC 19258, *Lactococcus plantarum* strain DSM 20686, *Clostridium perfringens* strain ATCC 13124, *Bacillus* sp. strain MBL B21, *Bacillus thuringiensis* strain KS, *Aspergillus niger* CATY9555, que fueron obtenidas de la base de NCBI. Todas estas especies se alinearon junto con los grupos formados por las bacterias estudiadas en base a su género, especie y subespecie, presentando soportes de rama altos, lo cual confirma que la identificación molecular fue correcta. La especie antes no identificada formó un grupo de soporte de rama alto con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus CFL1, lo que significa que esta especie posiblemente pertenece al mismo género y especie, como lo demuestra el árbol filogenético.



3.4. Pruebas como Probióticos.

En el análisis de varianza del ensayo para las pruebas de resistencia como probiótico se obtuvo evidencia de diferencias significativas ($p=0,05$) para los efectos de: Bacteria, Pruebas y todas las interacciones dobles entre (medios, bacterias y pruebas) (Tabla 6). Esto implica que los medios de cultivo no afectan significativamente la habilidad como probiótico de los microorganismos (Anexos 9a, 9b) sin embargo existe diferencias entre las cepas y el efecto causado por las concentraciones. También resalta la necesidad de ajustar la combinación de los 3 factores para afinar el desempeño probiótico.

Tabla 6.

Análisis de varianza de las pruebas como probióticos

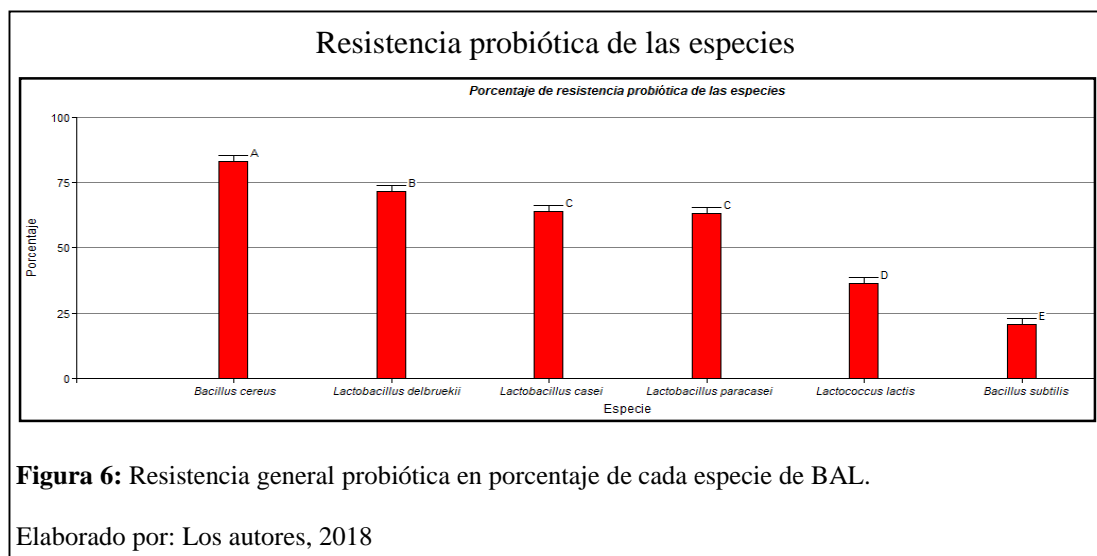
	Num DF	F-value	p-value
Interrelación	1	3588,4	<0,0001
Medios	1	0,06	0,8118
Bacteria	5	102,67	<0,0001
Pruebas*Concentración	12	57,87	<0,0001
Bacteria*Pruebas*Concentración	60	7,89	<0,0001
Medios*Bacteria	5	15,73	<0,0001
Medios*Pruebas*Concentración	12	10,51	<0,0001

Num DF: Número de Factores en cada interrelación; F-value: Valor de Fisher; Medias con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0,05$.

Elaborado por: Los autores, 2018

En la Figura 6 se observa el desempeño general en porcentaje de las especies sometidas a prueba, donde la bacteria con mejor porcentaje de resistencia es *Bacillus cereus* (83,07 %), seguida por la bacteria *Lactobacillus delbrueki* (71,50 %), las demás bacterias muestran porcentajes menores al 67 % aún cuando pertenecen al mismo género.

Esto tiene similitud a los resultados presentados por Milián, *et. al.* (2014) que obtuvo 48 cepas del género *Bacillus* spp., y solo tres mostraron resistencia como probiótico (pág. 347), además Lara & Burgos (2012) muestran porcentajes altos de crecimiento en especies de *Lactobacillus* sp. y *Bacillus* sp. entre 70 y 90 % (pág. 39).



En la Figura 7 se observa el efecto positivo en porcentaje de las pruebas según las concentraciones (C1, C2, C3) correspondientes a pH (3, 5 y 7); temperaturas (25, 37 y 42 °C); Sales Biliares (0.05; 0.15 y 0.3 % p/v) y Cloruro de Sodio (2, 4, 7 % p/v). La prueba que mejor efecto positivo logró en las bacterias corresponde al parámetro pH/C1 equivalente a un valor de pH 3.

Esto demuestra que las bacterias tienen capacidad de adaptarse al tracto digestivo tolerando la barrera ácida, concordando con Milian, *et. al* (2014) que menciona que la acidez del estómago puede alcanzar valores de pH 2 (pág. 348).

La segunda mejor prueba fue T°/C2 (37 °C) con datos similares de Sánchez, *et. al*, (2015) reportando en su investigación que, en todas las temperaturas que evaluaron se observó crecimiento bacteriano de los 17 aislados y de 11 cepas, mostraron mayores rendimientos a temperaturas de 37 °C (pág. 97).

En las sales biliares no existen diferencias significativas o influencia en los porcentajes de resistencia de las bacterias en relación con el control, no obstante, se puede decir que S.B./C3 (0,3 % p/v) es el de mejores resultados, además el NaCl en altas concentraciones tiene un efecto negativo sobre las bacterias; sin embargo, los mejores resultados fueron con NaCl/C1 (2 % p/v) (Tabla 7). Donde Lara & Burgos, (2012) menciona que las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal también pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros bacterianos (pág. 35).

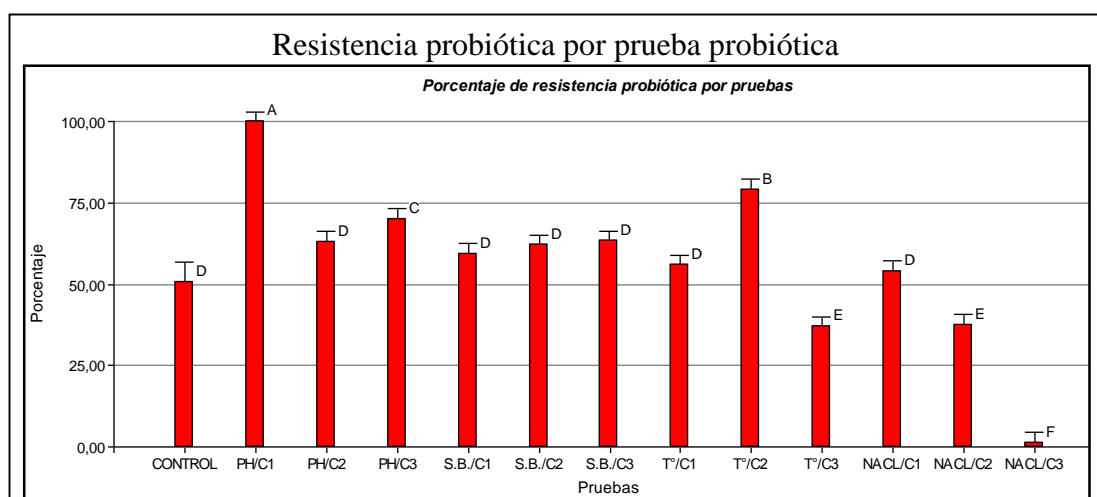


Figura 7: Resistencia por concentración de pH, sal biliar, temp. y NaCl.

Elaborado por: Los autores, 2018.

Tabla 7.

Comparación de medias de los porcentajes de las pruebas*concentración hacia las bacterias.

Pruebas/Concentración	Medias	E.E.			
PH/C1	100,00	3,06	A		
T°/C2	79,17	3,06		B	
PH/C3	70,03	3,06			C
S.B./C3	63,36	3,06			D
PH/C2	62,99	3,06			D
S.B./C2	62,15	3,06			D
S.B./C1	59,29	3,06			D
T°/C1	55,99	3,06			D
NACL/C1	54,02	3,06			D
CONTROL	50,50	6,12			D
NACL/C2	37,62	3,06			E
T°/C3	36,99	3,06			E
NACL/C3	1,38	3,06			F

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

Elaborado por: Los autores, 2018

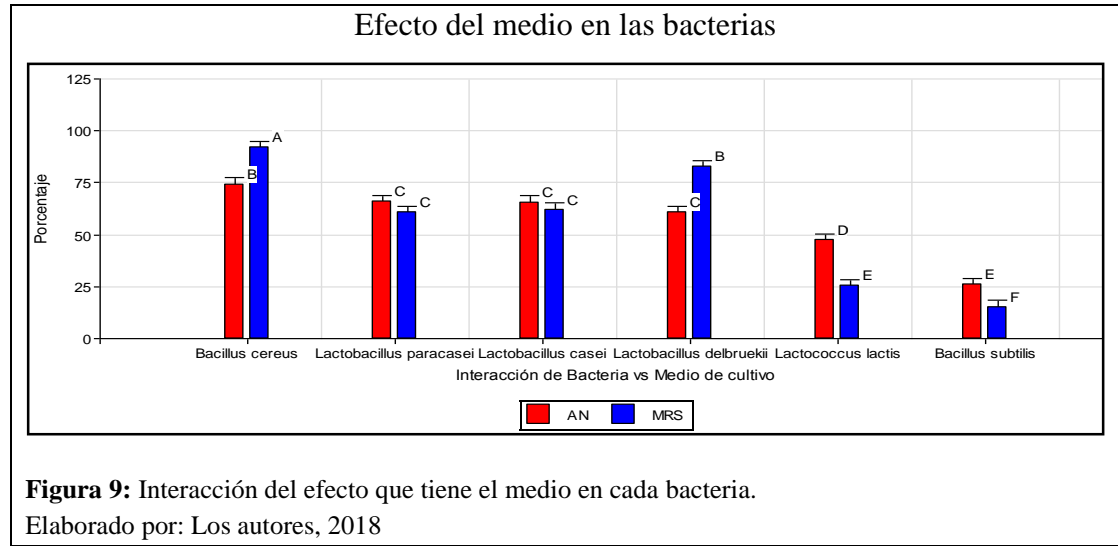
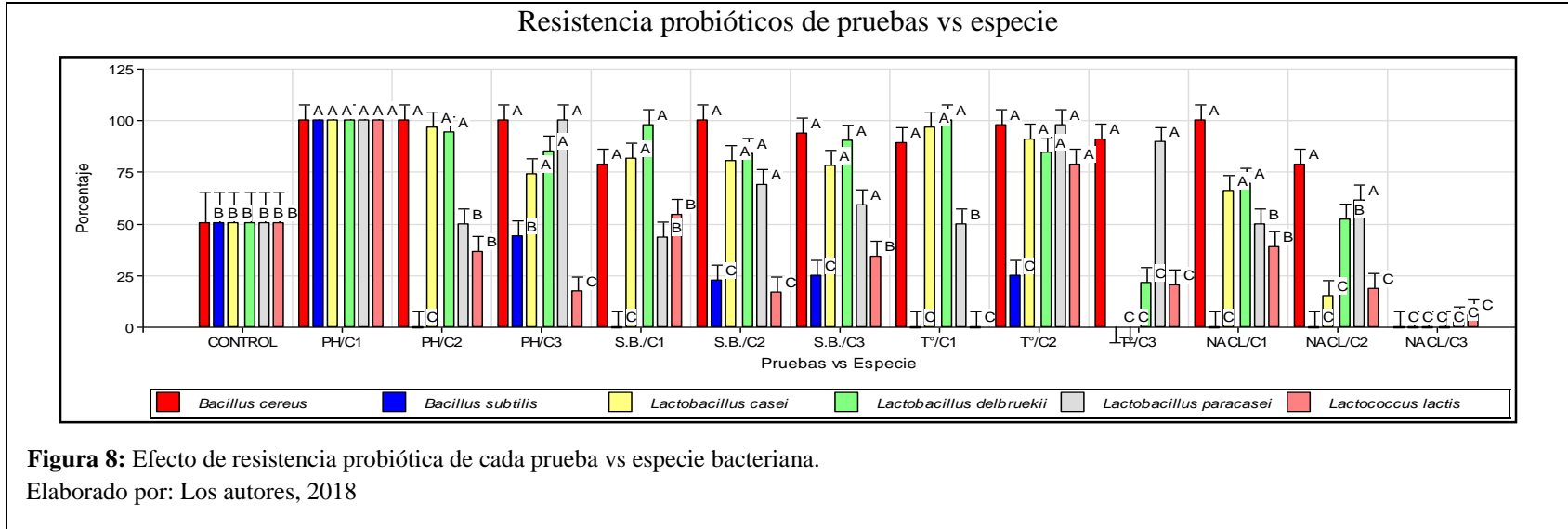
En la figura 8 se verifica claramente las interacciones de las diferentes pruebas: pH, Sales biliares (S.B.), Temperatura (T°), Cloruro de Sodio (NaCl) con cada especie de bacteria, para las que se tomaron como referencias los controles, los mismos que se muestran en las gráficas de manera estándar y neutral con potencial del 50 %, observando que para las condiciones del parámetro pH/C1 (pH 3 = 100 %) todas las bacterias actúan de manera similar sin verse afectadas, en comparación a las demás concentraciones o parámetros (pH 5 y 7) existiendo mayor variabilidad según la bacteria y concentración que interactúen primordialmente como se observa en las bacterias *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*, siendo positivo, puesto que según Jurado & Fajardo (2017) indican que la mayoría de microorganismos tienen una limitada capacidad de desarrollo en $pH < 3$, siendo un pH moderado para los

Lactobacillus y relativamente bueno a pH 4, además que la tolerancia a un medio ácido es reconocida como una de las propiedades deseables utilizados para seleccionar potencialmente cepas probióticas (págs. 64,65).

Las pruebas de sales biliares y temperatura muestran estabilidad en categoría A y resistencia superior al 50 % únicamente en las especies *Lactobacillus delbreukii*, *Lactobacillus casei* y *Bacillus cereus*, teniendo así que la especie con mayor sensibilidad a los cambios de concentración en estos dos parámetros y con resistencia del 50 % es la bacteria *Lactobacillus paracasei*. esto puede ser por que las sales biliares representan moléculas anfipáticas con actividad antimicrobiana que actúan como detergentes, producen daño a nivel de la membrana celular y en la estructura del ADN bacteriano. Además de la madurez del ganado del que proceda la cepa, indicando mayor resistencia aquellas que se origine de terneros (Sánchez & Domínguez, 2017, págs. 99-101).

En cambio, para la prueba del NaCl, influye significativamente la concentración y la bacteria que se encuentre en interacción sin mostrar un estándar definido (Anexos 9c a 9f), por lo cual podemos descartar claramente que en este estudio las bacterias *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis* no son viables como probióticos ya que muestran mayor sensibilidad y resistencia probiótica, al actuar de manera solitaria, ya que Lara & Burgos (2012) menciona que la mayoría de las bacterias son relativamente insensibles a las variaciones de la presión osmótica, y se adaptan a cambios fuertes en la concentración de solutos del medio, porque poseen una pared celular mecánicamente rígida, deduciendo que las cepas nativas tienen cierta capacidad de acondicionarse ante determinadas concentraciones de sales, siendo 7 % la máxima condición de salinidad tolerada hipertónicamente (pág. 37).

En la figura 9 observamos que el mejor medio para las bacterias *Bacillus cereus* y *Lactobacillus delbreukii* es MRS, mientras que para las especies *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*, el medio optimo es AN, sin mostrar entre ambos medios una diferencia significativa, concordando por lo mencionado por Jurado & Fajardo (2017) “El valor obtenido durante la fase exponencial muestra que la cepa láctica posee características adecuadas de crecimiento en el medio MRS” (pág. 65)



3.4.1. Prueba de antagonismo

En la tabla 8 se observa el rendimiento antagónico de las especies como probióticos donde el mejor tratamiento se da en condiciones de anaerobiosis, la mejor especie con acción antagónica fue la bacteria *Lactobacillus casei* seguida por la bacteria *Lactococcus lactis*, además se demuestra una mejor acción antagónica de todas las cepas seleccionadas ante *E. coli* que para *S. marceses*, concordando con los resultados mencionados por Sánchez, *et. al.* (2011) al parecer debido a la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético en la fermentación desciende a un pH a 3-4 en los cultivos de las cepas evaluadas (pág. 159) (Anexo 8b).

Tabla 8:

Prueba de antagonismo.

BACTERIAS	ANAEROBIO		AEROBIO		Promedio
	<i>E. coli</i>	<i>S. marceses</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marceses</i>	
	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	5	3	4	0	3
<i>Bacillus subtilis</i>	5	1	0	4	2,5
<i>Lactococcus Lactis</i>	3	4	2	4	3,25
<i>Lactobacillus casei</i>	6	3	4	0	3,75
<i>Lactobacillus delbreukii</i>	3	0	0	0	0,75
<i>Lactobacillus paracasei</i>	4	2	0	0	1,5
Promedio	4,33	2,17	1,67	1,33	

Elaborado por: Los autores, 2018

4. Conclusiones

De las 225 muestras de leche analizadas, solo se utilizaron 135 muestras con un valor < 150 000 CBT/mL de los cuales, los estados de la lacto-fermentación 1 y 2 dieron como resultado final 110 muestras, sin embargo, no se obtuvo una correlación específica con el rango de CBT.

De las 110 muestras de leche obtenidas de la lacto-fermentación se aislaron bacterias de colonias con características de tinción Gram (+), oxidasa (-) y catalasa (-), además de pruebas moleculares para el segmento 16S, las cuales dieron como resultado la identificación de 10 especies de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

Las pruebas que se utilizaron para verificar la capacidad probiótica de las bacterias como pH, temperatura, sal biliar, y cloruro de sodio, indicaron que las especies *Bacillus cereus*, *Lactobacillus delbreukii*, *Lactobacillus casei* fueron las más tolerantes a las condiciones sometidas, mientras que el resto de las especies de bacterias aun cuando son consideradas como probióticas no resistieron las concentraciones a las cuales fueron evaluadas.

La capacidad antagonista fue efectiva para la especie *Lactococcus lactis* tanto en una atmosfera aeróbica como anaeróbica lo cual se observó mediante la aparición de un halo de inhibición, indicando que las especies *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei* son idóneas para enfrentarse a bacterias patógenas dentro del sistema gastrointestinal, descartando a la especie *Lactobacillus delbrueckii* por no presentar buena capacidad antagónica ya que su halo fue evidente solo frente a *E. coli* en anaerobiosis.

En las pruebas de tolerancia, los probióticos con mayor utilidad en esta investigación son las bacterias *Bacillus cereus* y *Lactobacillus casei* mismos que pueden ser masificados con las condiciones adecuadas.

5. Recomendaciones

Investigar cada una de las bacterias identificadas como potenciales probióticos (*Bacillus cereus* y *Lactobacillus casei*) para adaptarlos en diferentes balanceados animales, seleccionando aquellas con mejores resultados de crecimiento y resistencia, según los requerimientos del ganado bovino.

Realizar más estudios en las demás bacterias aisladas (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*) para verificar si pueden potenciarse como probióticos, al ser combinadas o usadas en diferentes concentraciones y así aprovechar al máximo los recursos biológicos que se encuentran al momento.

Complementar la investigación con un estudio sobre metagenómica con la mayor cantidad de muestras de leche bovina, si es posible a nivel nacional para obtener un cepario de bacterias probióticas útiles para una comparación genes activos que caracterice la capacidad probiótica.

6. Bibliografía

- Ajay, M., Yasir, B., Devabrata, S., Dhruvajyoti, N., Kuldeep, G., Bolin, K., Manabendra, M. (2016). Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research*, 62-70.
- Alejos, L. P., Aragón, M. d., & Corejo, A. (2013). Extracción y purificación de ADN. Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México., 24-29.
- Aliaga, M. E. (2011). *Morfología y Estructura de las bacterias. I Parte.*
- Arteaga, F. (29 de Noviembre de 2015). El uso de probióticos hace más rentable la producción pecuaria y camaronera. *El telégrafo*, pág. 1.
- Benoit, F., & Catherine, D. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 284-292.
- Besser, J., Carleton, H., P., G.-S., R.L., Lindsey, & E., T. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 235-241.
- Brownlee, G. (2018). The Legacy of Fred Sanger—100 Years on from 1918. *Journal of Molecular Biology*, 2661-2669.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 840-862.

- Cueva, D. F. (2014). Efecto de dos aditivos prebióticos y probióticos en el crecimiento y condición corporal en terneras Holstein friesian, Tumbaco-Pichincha. Quito: Universidad Central del Ecuador: Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Davis, C. (2014). Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 9-17.
- Díaz M., B. L., Iglesias, A. E., & Valiño C, E. (2014). Consorcios Microbianos con capacidad ácido láctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos aditivos para ensilajes. *Ciencia y Agricultura* Vol. 11, 17-25.
- Díaz, M. (2012). Aislamiento, Identificación y Caracterización de bacterias productoras de histaminas en queso. Universidad de Oviedo. Universidad de Oviedo., 17.
- Dowarah, R., Verma, A., & Agarwal, N. (2017). The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*, 1-6.
- El Universo. (24 de Mayo de 2015). Los bovinos en Ecuador, con menos población durante los últimos años. *El Universo*, pág. 1.
- FAO/OMS y ONU. (2001). Probióticos en los alimentos-Propiedades saludables y nutricionales. Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico, (págs. 2-5). Córdova.

- Fan Wu Wu, J. W. (2016). Caracterización de bacterias lácticas en subproductos Industriales de piña (*Anana cosmosus L mer.*) y determinación de su capacidad de potencial probiotico en jugo de piña. Costa Rica: Universidad de Costa Rica; Escuela de Técologia de Alimentos.
- Fernández, A., & Garcia, C. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. EIMC, 25-26.
- Flórez, A., & Mayo, B. (2015). Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 63-69.
- Fuerte, B., & Mallitasig, D. (2018). Identificación Morfológica y Molecular de Hongos Micorrizicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (*Orchidaceae*). Quito: Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador.
- Gerónimo, E. H. (2007). Microbiología de la Leche Cruda: Fundamentos de Microbiología de la Leche. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL.
- González, U., & González, D. (2011). Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus L.* *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 875-883.
- Google Earth. (2018). Cayambe.
- Gueimonde, M., & Collado, M. (2012). Metagenomics and probiotics. *Microbiología Clínica e Infección*, 32-34.
- Guevara, D., N. de Paulis, A., Bertona, E., Gutiérrez, M. Á., A. Vay, C., P. Suárez, J., & C. Predari, S. (2017). *Bifidobacterium scardovii* aislado de 2 muestras consecutivas de orina. *Revista Argentina de Microiología*, 328-331.

- Gutierrez, L. A. (2016). Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Jay, J., & Loessner, M. (2005). Milk, Fermentation, and Fermented and Nonfermented Dairy Products. En *Modern Food Microbiology* (págs. 149-173). New: Springer.
- Jurado, H., & Fajardo, C. (2017). Determinación del efecto probiótico in vitro de *Lactobacillus gasseri* sobre una cepa de *Staphylococcus epidermidis*. *Revista Biosalud*, 53-69.
- Jurado, H., Calpa, F., & Chaspuengal, A. (2014). Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. *Fac Med Vet Zoot*, 241-257.
- Kerry, G., Kumar, J., Shushanto, G., Yooheon, P., Hanseung, S., & Gitishre, D. (2018). Benefaction of probiotics for human health. *Jorurnal of Food and Drug Aalysis*, 1-13.
- Kraeva, N., & Horáková, E. (2017). Catalase in Leishmaniinae: With me or against me? *Rusia: Infection, Genetics and Evolution*.
- Kuhn, R., Böllmann, J., & Krahl, K. (2018). Datos sobre la muestra de ADN en gel, electroforesis en gel, PCR y análisis de costos. *Datos en breve*, 732-751.
- Lara, C., & Burgos, Á. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos. *Revista de Colombia de Biotecología*, 31-40.

- Larse, N., Thorsen, L., Nyra, E., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, & M., Nielsen, B., . . . Jespersen, L. (2013). Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Biotechnological products and process engineering*, 1105-1118.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.
- Li, Y., & Ding, J. (2017). 16S rDNA sequencing analysis of upper respiratory tract flora in patients with influenza H1N1 virus infection. *Frontiers in laboratory medicine*, 16-26.
- López, L., & Mejía, C. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*, 3169-3175.
- Martinez, C., Peláez, C., & Requena, T. (2012). *Probióticos en la Salud Humana*. Madrid: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM).
- Más Leche-Centro de la Industria Láctea. (17 de Julio de 2017). Acerca de nosotros: Más leche. Obtenido de <http://masleche.ec>
- Meza, F. (2014). “Propuesta para producción y comercialización de un probiótico liofilizado a base de *Lactobacillus casei* como minimizador del alto uso de antibióticos en ganado vacuno en el cantón Chone, provincia de Manabí”. Guayaquil: Universidad de Guayaquil-Facultad de Ciencias Químicas.
- Milián, G., Rondón, A., Pérez, M., Samaniego, L., Riaño, J., Bocourt, R., Carro, (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes

ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales . Revista Cubana de Ciencia Agrícola (Redalcy), 347-351.

Moreno, L. J. (2013). Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Muhammed, A. (2018). Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant. *Animal Nutrition*, 241-249.

Murillo, D. J. (2003). Manual de Procesamiento Lácteo. Managua-Nicaragua: Instituto Nicaragüense de apoyo a la pequeña y mediana empresa (INPYME).

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. (2018). Acerca de nosotros: NCBI Corporation. Obtenido de NCBI Web Site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Nishino, T., & Matsuda, Y. (2017). Separation of viable lactic acid bacteria from fermented milk. *Heliyon-El Server*, 1-8.

Novillo, A. (2016). Aislamiento y determinación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas de queso artesanal de San Fernando-Azuay contra cepas patógenas. Cuenca: Universidad del Azuay.

OMS. (2016). Reunión de las Naciones Unidas sobre la resistencia a los antimicrobianos. New York: Boletín de la Organización Mundial de la Salud.

Paredes, M., & Yugsi, I. (2016). Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de Pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c. Weber). 24-25.

- Parra H., R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol. 8, 94-105.
- Pepper, C. (11 de Septiembre de 2018). NCBI. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Pérez, I., & Falco, A. (2012). Aislamiento e identificación de cepas del género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29-30.
- Reader, J., & Broda, P. (2008). Preparación rápida del ADN de los hongos filamentosos. Letters in applied microbiology, 17-20.
- Rodríguez, J. E. (2012). Aislamiento e identificación de microorganismos con presuntivo potencial probiótico a partir de heces de animales de producción industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias carrera de microbiología industrial. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Rodríguez, M. (2016). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rosmini, M. R., Sequeira, G.J., Guerrero, I., Martí, L., Dalla, R., Bonazza, J. C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 3, 181-191.
- Sánchez, H., & Domínguez, F. (2017). Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del tracto digestivo del lechón. Rev Inv Vet Perú, 730-736.

- Sánchez, B., Arias, S., Chaignepain, S., Deayrolles, M., Schmitter, J., Bressollier, P., & Urdaci, M. (2009). Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Research Online: Microbiology Society*, 1708-1716.
- Sánchez, i., Vichi, J., Llanes, M., Castro, E., Soler, D. M., Espinosa, I., Ferreira, C. L. (2011). Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticas. *Revista de la Salud Animal*, 154-160.
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 124-129.
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., & Luce Ferreira, C. (2015). Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Salud Animal*, 94-104.
- Sánchez, T., Lamela, L., & López, O. (2015). Influencia del probiótico Sorbifauna en la producción y calidad de la leche de vacas mestizas en pastoreo. *Pastos y Forrajes*, 183-188.
- Simone, C. (2018). The Unregulated Probiotic Market. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 1-9.
- Stanchi, N. O., Martino, G. E., Reinoso, E. H., Echeverría, M. G., Leardini, N., & Leardini, N. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Argentina: Intermedica.
- Sun, Y., He, M., Cao, Z., Xie, Z., Liu, C., Wang, S., Zhou, Y. (2018). Effects of dietary administration of *Lactococcus lactis* HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 296–303.

- Tamay de Dios, L. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en Discapacidad*, 70-78.
- Tomaló, M. V. (2007). Utilización de promotores de crecimiento simbiótico lacture, en producción de huevos de la línea Isabrown. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 4.
- Umesha, S., Manukumar, H. M., & Raghava, S. (2016). A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *Springer Berlin Heidelberg*, 6: 123.
- Universidad de Zulia. (2003). *Introducción al Control de Calidad de la Leche Cruda*. Maracaibo: Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Vélez Zea, J., Gutiérrez, L. A., & Campuzano, O. M. (2015). Identificación molecular y evaluación de la capacidad probiótica de bacterias. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* , 141-149.
- Wallace Ruiz, A. (2015). *Aplicación del modelado estadístico y la detección de señales en memoria dereconocimiento y potenciales evocados*. Málaga: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga.
- Zamorán, D. (2003). *Manual de Procesamiento Lácteo*. Nicaragua: Instituto Nicaragüense de Apoyo a la Pequeña y Mediana Empresa (INPYME).

7. Anexos

Anexo 1. Toma de muestras de Leche, fase de Campo.

Anexo 1a. Ubicación Geográfica del Cetro de Acopio Cariacu



Fuente: (Google Earth, 2018).

Anexo 1b. Toma de muestras de leche en el centro de acopio Cariacu



Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 2. Listado de nombres de los productores del centro de acopio “Cariacu”.

	PRODUCTOR
1	Cadena Emilio
2	Cadena Eulalia
3	Cadena Eumelia
4	Caluguillin Dolores
5	Caluguillin José
6	Caluguillin Rosa
7	Campues Carmen
8	Catucuamba Angel
9	Catucuamba Antonio
10	Catucuamba Isidro
11	Farinango Janeth
12	Farinango José
13	Farinango Luis
14	Guacan Ernesto
15	Guacan Manuel
16	Guajan Isabel
17	Guajan Janeth
18	Guaján Patricio
19	Gualavi Enma Fria
20	Gualavisí Enma Cal
21	Guatemal Segundo
22	Lechon Rosa
23	Novoa Gladys

24	Novoa Gonzalo
25	Novoa Manuel
26	Novoa Marco
27	Rojas Blanca
28	Rojas Carmen
29	Tabango Hortencia
30	Tabango Luz
31	Tabango Ulcuango Manuel
32	Tabango Ushiña Manuel
33	TQ1
34	TQ2
35	Tùqueres Rodrigo
36	Ulcuango Margarita
37	Ulcuango Marina
38	Ulcuango Miguel
39	Ulcuango Ramón
40	Ulcuango Zoila
41	Ushiña Blanca
42	Ushiña Jorge
43	Ushiña Remigio
44	Cadena Emilio
45	Cadena Eulalia
46	Cadena Eumelia
47	Caluguillin Dolores

Elaborado por: Los Autores, 2018

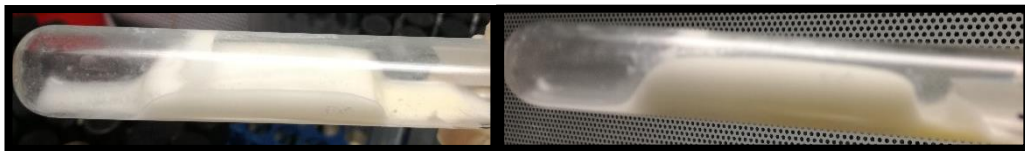
Anexo 3. Proceso de lacto-fermentación en laboratorio

Anexo 3a. Lacto-fermentación en distintas fases entre las muestras.



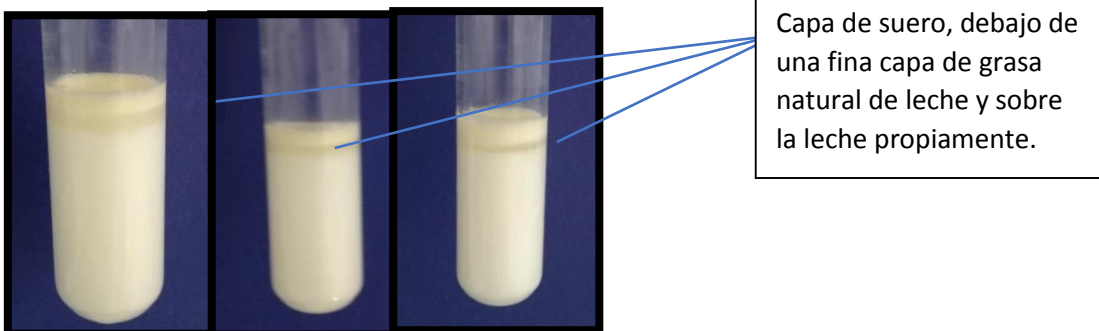
Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 3b. Fase 2 de coagulo lacto-fermentación



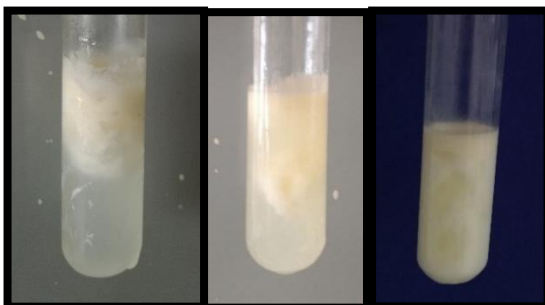
Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 3c. Fase 3 separación por suero



Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 3d. Fase 4, Grumos no uniformes y suero abundante.



Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 4. Datos de todos los muestreos CBT y Lacto-fermentación

FECHAS:		23/02/2018	24/02/18	21/03/2018	22/03/2018	03/04/2018	04/04/2018	26/04/2018	26/04/2018	12/06/2018	13/06/2018	PROMEDIOS	
COD	PRODUCTOR	CBT/mL X 1000	Lacto-F	CBT/mL X 1000	Lacto-F	CBT/mL X 1000	Lacto-F	CBT/mL X 1000	Lacto-F	CBT/mL X 1000	Lacto-F	CBT/mL X 1000	Lacto-F
1	Cadena Emilio	11	2	2	3	13	3	13	1	8	3	9,40	3,0
2	Cadena Eulalia	40	1	10	1	97	1	45	1	16	1	41,60	1,0
3	Cadena Eumelia	18	2	31	1	10	2	11	1	5	1	15,00	1,0
4	Calaguillin Dolores	9	1	6	1	13	1	12	1	2	1	8,40	1,0
5	Calaguillin José	16	3	14	1	19	1	14	1	10	1	14,60	1,0
7	Calaguillin Rosa	19	1	15	1	37	1	X	X	4	3	18,75	1,0
8	Campues Carmen	14	3	11	1	10	1	14	1	1	1	10,00	1,0
9	Catcuamba Angel	33	3	8	3	17	3	49	3	1	1	21,60	3,0
11	Catcuamba Antonio	116	3	63	1	1001	1	68	1	21	1	253,80	1,0
12	Catcuamba Isidro	37	2	18	2	X	X	43	1	28	3	31,50	2,0
13	Farinango Janeth	33	3	32	3	X	X	46	1	X	X	37,00	3,0
14	Farinango José	19	4	16	4	230	1	21	3	28	1	62,80	4,0
15	Farinango Luis	369	2	33	2	21	2	15	1	358	2	159,20	2,0
17	Guacan Ernesto	37	3	20	2	80	1	X	X	20	2	39,25	2,0
18	Guacan Manuel	37	2	34	2	20	1	23	1	22	1	27,20	1,0
19	Guajan Isabel	149	3	26	3	95	1	68	1	23	2	72,20	1,0
20	Guajan Janeth	14	3	13	3	15	3	12	1	5	3	11,80	3,0
21	Guaján Patricio	31	1	16	1	93	1	19	1	17	1	35,20	1,0
22	Gualavi Enma Fria	133	3	64	2	179	2	554	2	17	1	189,40	2,0
23	Gualavisí Enma Cal	25	3	33	2	71	2	45	1	13	2	37,40	2,0
24	Guatemala Segundo	34	3	14	3	74	1	58	1	17	2	39,40	2,0
25	Lechon Rosa	X	X	7	1	17	1	X	X	19	1	14,33	1,0

27	Novoa Gladys	65	1	37	1	144	2	223	1	118	1	117,40	1,0
28	Novoa Gonzalo	21	1	9	3	10	1	15	1	8	1	12,60	1,0
29	Novoa Manuel	23	3	12	3	X	X	14	1	18	1	16,75	1,0
30	Novoa Marco	239	3	138	3	372	3	89	3	132	3	194,00	3,0
31	Rojas Blanca	28	1	21	3	93	1	17	1	12	1	34,20	1,0
32	Rojas Carmen	26	1	15	1	19	1	20	1	2	1	16,40	1,0
33	Tabango Hortencia	X	X	32	3	24	4	38	1	X	X	31,33	1,0
34	Tabango Luz	21	1	8	1	15	2	24	2	5	2	14,60	2,0
35	Tabango Ulcuango Manuel	36	4	26	3	155	2	35	1	84	1	67,20	1,0
36	Tabango Ushiña Manuel	32	2	34	3	X	X	76	1	39	3	45,25	3,0
37	TQ1	106	3	76	2	111	4	31	2	61	3	77,00	3,0
38	TQ2	92	2	43	2	98	3	65	2	47	2	69,00	2,0
39	Tüqueres Rodrigo	38	2	8	2	110	2	57	1	14	3	45,40	2,0
40	Ulcuango Margarita	85	1	8	1	X	X	35	1	11	1	34,75	1,0
41	Ulcuango Marina	28	1	18	1	X	X	32	1	40	1	29,50	1,0
42	Ulcuango Miguel	60	3	9	1	18	1	28	1	87	2	40,40	1,0
43	Ulcuango Ramón	39	1	17	1	28	3	27	1	17	3	25,60	1,0
44	Ulcuango Zoila	203	2	5	3	X	X	59	1	113	2	95,00	2,0
45	Ushiña Blanca	X	X	14	2	9	3	X	X	X	X	11,50	3,0
46	Ushiña Jorge	39	1	18	1	23	1	28	1	27	1	27,00	1,0
47	Ushiña Remigio	27	2	52	1	18	2	25	1	16	3	27,60	1,0

Elaborado por: Los Autores, 2018

Anexo 5. Datos CTB y Lacto-fermentación de las 27 muestras para inoculación.

Cod.	Datos promedios de	
	CBT/mL X1000	Lacto-F
1	9,40	3,0
2	41,60	1,0
3	15,00	1,0
4	8,40	1,0
5	14,60	1,0
8	10,00	1,0
9	21,60	3,0
14	62,80	4,0
18	27,20	1,0
19	72,20	1,0
20	11,80	3,0
21	35,20	1,0
23	37,40	2,0
24	39,40	2,0
27	117,40	1,0
28	12,60	1,0
31	34,20	1,0
32	16,40	1,0
34	14,60	2,0
35	67,20	1,0
37	77,00	3,0
38	69,00	2,0
39	45,40	2,0
42	40,40	1,0
43	25,60	1,0
46	27,00	1,0
47	27,60	1,0

Elaborado por: Los Autores, 2018

Anexo 6. Identificación mediante pruebas bioquímicas

Anexo 6a. Pruebas de hemólisis y oxidasa.



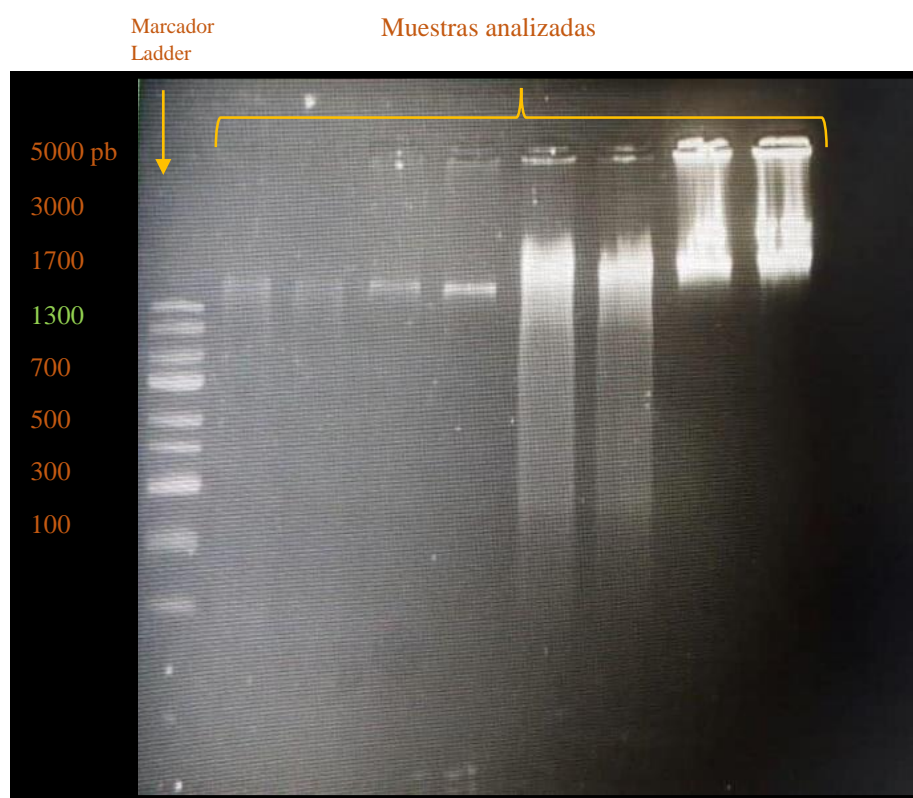
Nota: Tomada por los Autores, 2018

Anexo 6b. Grado de hemólisis generado por microorganismos

Hemólisis	Descripción
α -Hemólisis	Se observa clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias, además se produce una degradación de los enlaces alfa de la hemoglobina
β -hemólisis	Se observa clarificación total del medio de cultivo alrededor de las colonias. Se produce una degradación de los enlaces Beta de la hemoglobina
γ -hemólisis	No se observa clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias. No se produce ninguna degradación de los enlaces alfa y Beta de la hemoglobina

Fuente: (Gutierrez, 2016, pág. 16)

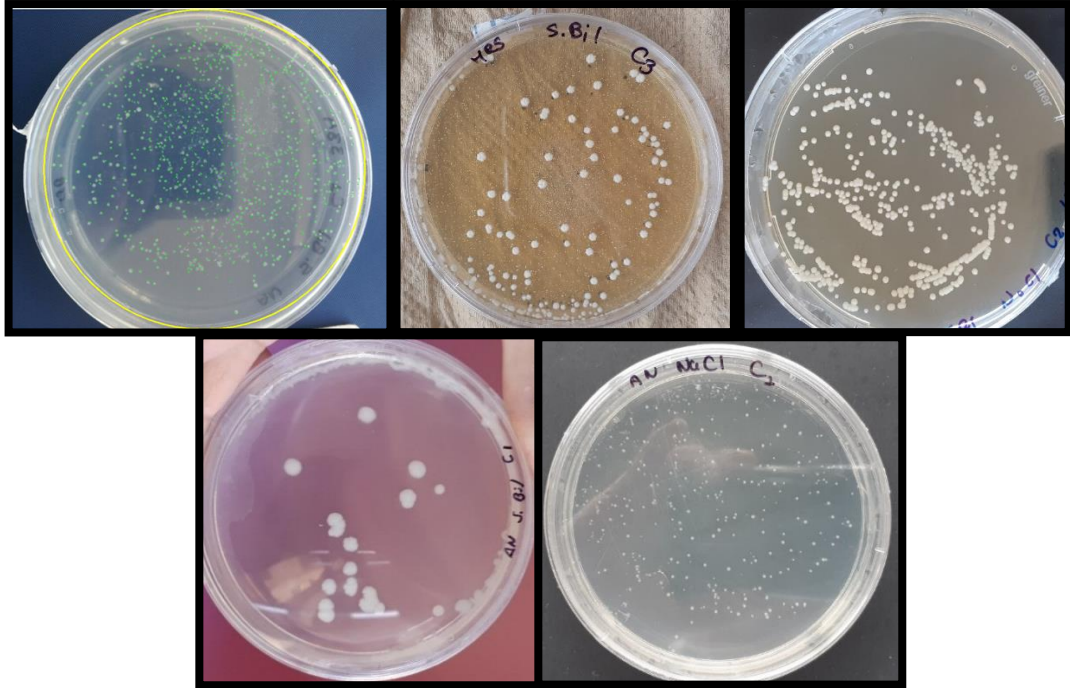
Anexo 7. Identificación Molecular (Electroforesis de ADN)



Nota: Elaborado por: Los autores, 2018

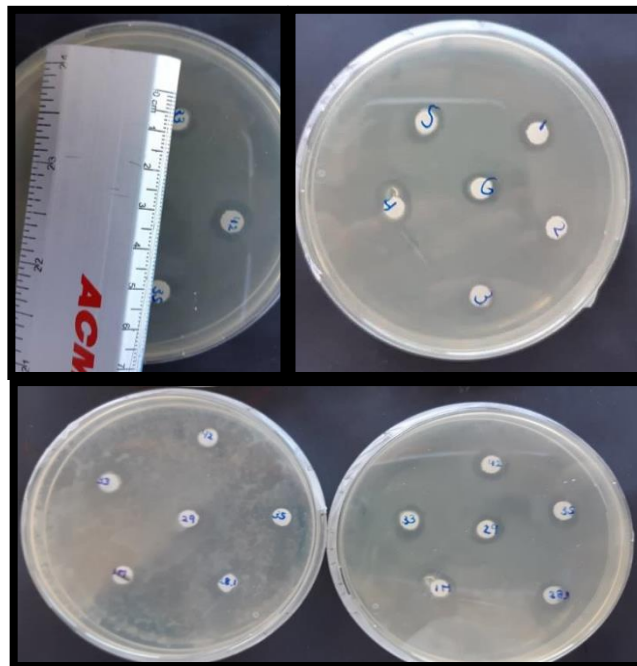
Anexo 8. Pruebas como Probiótico

Anexo 8a. Conteo de UFC, para Temperatura, Sal Biliar, pH, NaCl



Nota: Elaborado por: Los autores, 2018

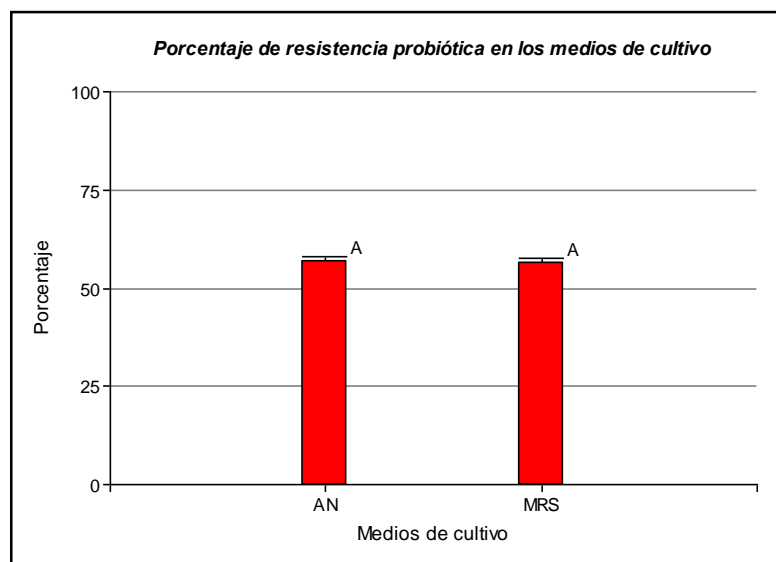
Anexo 8b. Halos de inhibición en prueba de antagonismo



Nota: Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9. Datos estadísticos de las Pruebas como probióticos

Anexo 9a. Gráfica de barras entre las medias de los porcentajes de resistencia según los medios de cultivo.



Nota: Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9b. Tabla de medias de los porcentajes de los medios de cultivo para las pruebas de bacterias como probióticos

Medios	Medias	E.E.	
AN	56,65	1,33	A
MRS	56,2	1,33	A

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

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9c. Tabla de las medias entre bacterias

Bacteria	Medias	E.E.	
<i>Bacillus cereus</i>	83,07	2,31	A
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	71,5	2,31	B
<i>Lactobacillus casei</i>	63,87	2,31	C
<i>Lactobacillus paracasei</i>	63,26	2,31	C
<i>Lactococcus lactis</i>	36,29	2,31	D
<i>Bacillus subtilis</i>	20,54	2,31	E

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

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9d. Tabla de datos complementarios en las interacciones Bacterias vs Pruebas probióticas

Pruebas*Conc.	Bacteria	Medias	E.E.	
PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	7,5	A
NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	100	7,5	A
PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	100	7,5	A
PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	100	7,5	A
PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	100	7,5	A
S.B./C2	<i>Bacillus cereus</i>	100	7,5	A
PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100	7,5	A
PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	100	7,5	A
T°/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	100	7,5	A
PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	100	7,5	A
PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	100	7,5	A
PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100	7,5	A
T°/C2	<i>Bacillus cereus</i>	97,97	7,5	A
S.B./C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	97,73	7,5	A
T°/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97,59	7,5	A
PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	96,84	7,5	A
T°/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	96,8	7,5	A

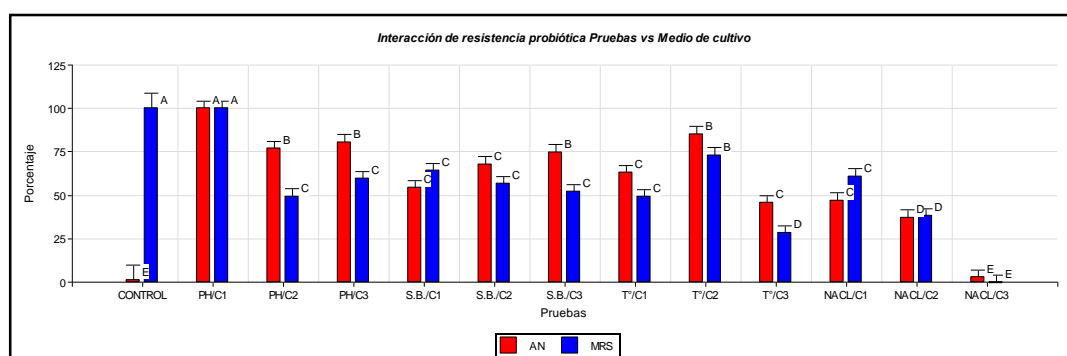
PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	94,38	7,5	A
S.B./C3	<i>Bacillus cereus</i>	93,78	7,5	A
T°/C3	<i>Bacillus cereus</i>	91,14	7,5	A
T°/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	90,9	7,5	A
S.B./C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	90,23	7,5	A
T°/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	89,41	7,5	A
T°/C1	<i>Bacillus cereus</i>	89,14	7,5	A
PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	84,88	7,5	A
T°/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	84,56	7,5	A
S.B./C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	84,02	7,5	A
S.B./C1	<i>Lactobacillus casei</i>	81,58	7,5	A
S.B./C2	<i>Lactobacillus casei</i>	80,47	7,5	A
T°/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	78,98	7,5	A
S.B./C1	<i>Bacillus cereus</i>	78,84	7,5	A
NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	78,53	7,5	A
S.B./C3	<i>Lactobacillus casei</i>	77,96	7,5	A
PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	74,31	7,5	A
NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	69,65	7,5	A
S.B./C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	68,96	7,5	A
NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	65,93	7,5	A
NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	61,27	7,5	A
S.B./C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	58,98	7,5	A
S.B./C1	<i>Lactococcus lactis</i>	54,26	7,5	B
NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	52,23	7,5	B
CONTROL	<i>Bacillus cereus</i>	50,5	15	B
CONTROL	<i>Lactococcus lactis</i>	50,5	15	B
CONTROL	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	50,5	15	B
CONTROL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	50,5	15	B
CONTROL	<i>Bacillus subtilis</i>	50,5	15	B
CONTROL	<i>Lactobacillus casei</i>	50,5	15	B
NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	50	7,5	B
PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	50	7,5	B

T°/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	50	7,5	B
PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	43,88	7,5	B
S.B./C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	43,32	7,5	B
NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	38,53	7,5	B
PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	36,74	7,5	B
S.B./C3	<i>Lactococcus lactis</i>	34,18	7,5	B
T°/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	25	7,5	C
S.B./C3	<i>Bacillus subtilis</i>	25	7,5	C
S.B./C2	<i>Bacillus subtilis</i>	22,61	7,5	C
T°/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	21,28	7,5	C
T°/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	20,13	7,5	C
NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	18,71	7,5	C
PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	17,09	7,5	C
S.B./C2	<i>Lactococcus lactis</i>	16,84	7,5	C
NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	14,98	7,5	C
NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	5,87	7,5	C
NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,41	7,5	C
NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
S.B./C1	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	0	7,5	C
NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	0	7,5	C
NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	0	7,5	C
T°/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
T°/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	0	7,5	C
T°/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	0	7,5	C
T°/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	0	7,5	C

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

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9e. Grafica de barras de interacción entre los medios de cultivo y las pruebas probióticas.



Nota: Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9f. Tabla de medias entre los medios de cultivo y las pruebas probióticas

Pruebas*concentración	Medias	E.E.	
PH/C1	100	3,06	A
T°/C2	79,17	3,06	B
PH/C3	70,03	3,06	C
S.B./C3	63,36	3,06	D
PH/C2	62,99	3,06	D
S.B./C2	62,15	3,06	D
S.B./C1	59,29	3,06	D
T°/C1	55,99	3,06	D
NAACL/C1	54,02	3,06	D
CONTROL	50,5	6,12	D
NAACL/C2	37,62	3,06	E
T°/C3	36,99	3,06	E
NAACL/C3	1,38	3,06	F

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

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 9g. Tabla con los datos completos para el análisis de pruebas para probióticos.

Medios	Pruebas/ concentración	Bacteria	Repetición	Conteo
AN	CONTROL	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	920
AN	CONTROL	<i>Lactobacillus casei</i>	I	468
AN	CONTROL	<i>Lactococcus Lactis</i>	I	49
AN	CONTROL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	CONTROL	<i>Bacillus cereus</i>	I	899
AN	CONTROL	<i>Bacillus subtilis</i>	I	141
MRS	CONTROL	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	170
MRS	CONTROL	<i>Lactobacillus casei</i>	I	313
MRS	CONTROL	<i>Lactococcus lactis</i>	I	31
MRS	CONTROL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	954
MRS	CONTROL	<i>Bacillus cereus</i>	I	385
MRS	CONTROL	<i>Bacillus subtilis</i>	I	1074
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	644
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	802
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	0
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	0
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	371
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	356
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	383
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	421
AN	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	14
AN	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	19
AN	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	39
AN	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	54
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	0
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	0
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	0
AN	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	0
AN	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	1710
AN	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	1732
AN	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	1017
AN	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	979
AN	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0

AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	650
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	526
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	0
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	0
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	0
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	0
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	0
AN	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	16
AN	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	15
AN	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	17
AN	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	19
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	385
AN	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	341
AN	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	648
AN	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	678
AN	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	0
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	0
AN	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	1
AN	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	3
AN	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	8
AN	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	11
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	211
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	234
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	53
AN	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	81

AN	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	574
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	534
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	668
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1070
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	204
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	131
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	135
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	157
MRS	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	4
MRS	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	4
MRS	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	5
MRS	NACL/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	6
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	1028
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1116
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	1436
MRS	NACL/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	1392
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	917
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	1000
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	843
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	836
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	NACL/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	568
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	867
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	79
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	74
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	103
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	115
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	75
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	82

MRS	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	1
MRS	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	3
MRS	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	NACL/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	270
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	343
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	111
MRS	NACL/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	136
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	668
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	455
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	398
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	858
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	NACL/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	NACL/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0

AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	832
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	841
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1208
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1102
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	3000
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	3000
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	441
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	444
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	25
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	39
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	25
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	32
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	522
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	546
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	294
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	326
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	567
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	546
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	624
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	337
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	1137
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	993
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	322
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	342
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	390
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	447
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	429
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	446
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	33
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	33
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	1153
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1098
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000

AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	1124
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	1137
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	1117
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1224
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	162
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	114
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	477
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	1200
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1178
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	644
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	444
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	508
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	404
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	606
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	45
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	72
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	19
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	21
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	2042
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1907
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	2112
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	2007
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	891
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	748
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	676
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	834
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	349
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	324
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	472
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	464
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	498
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	692
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	232
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	207
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	188
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	198

MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	9
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	12
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	15
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	22
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	1124
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1164
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	406
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	455
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	764
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	693
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	674
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	710
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	SAL BILIAR/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	719
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	460
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	866
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1148
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	117
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	127
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	1012
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	1026
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	1164
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1092
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	359
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	372
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	438
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	463
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	1204
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1108
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	SAL BILIAR/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0

MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	886
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	766
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1240
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1398
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	197
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	219
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	140
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	203
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	526
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	314
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	553
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	543
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	712
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	662
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	454
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	516
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	SAL BILIAR/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	1362
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	1130
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1222
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1072
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	800
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	974
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	468
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	472
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000

AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	650
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	698
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	838
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	629
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	482
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	546
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1176
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1474
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	525
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	496
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	439
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	412
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	33
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	55
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	49
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	56
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	818
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	834
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	994
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	948
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	288
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	276
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1044
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	646
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	0

AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	22
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	27
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	9
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	13
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	724
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	1174
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	1004
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1122
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	1342
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	1152
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	1488
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	1426
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	310
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	287
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	262
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	369
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	689
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	734
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	1668
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1583
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0

MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	119
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	193
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	161
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	206
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	219
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	236
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	379
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	416
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	48
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	53
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	9
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	11
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	1026
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	1064
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	854
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	870
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	748
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	724
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	1498
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1326
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	4
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	1
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	488
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	612
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	1216
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	1112

MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	281
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	291
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	1457
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1360
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	TEMPERATURA/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	3000
AN	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	3000
AN	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	3000
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	1202
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	1160
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	766
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	660
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	473
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	537
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	438
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	498

AN	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	19
AN	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	45
AN	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	42
AN	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	38
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	1335
AN	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	1451
AN	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	1204
AN	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1841
AN	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
AN	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
AN	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
AN	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	563
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	650
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	680
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	674
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	438
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	427
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	451
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	403
AN	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	14
AN	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	17
AN	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	14
AN	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	22
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
AN	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
AN	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	1146
AN	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	1548
AN	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	1214
AN	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1240
AN	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	114
AN	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	99
AN	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	197
AN	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	153

MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus cereus</i>	IV	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	I	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	II	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	III	3000
MRS	PH/C1	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	3000
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	612
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	732
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	686
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	645
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	I	282
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	II	285
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	III	322
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	358
MRS	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	PH/C2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	0
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	0
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	0
MRS	PH/C2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	0

MRS	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	I	636
MRS	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	II	658
MRS	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	III	1062
MRS	PH/C2	<i>Bacillus cereus</i>	IV	932
MRS	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	PH/C2	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	I	913
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	II	846
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	III	920
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	IV	860
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	I	180
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	II	118
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	III	142
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus casei</i>	IV	271
MRS	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	I	0
MRS	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	II	0
MRS	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	III	0
MRS	PH/C3	<i>Lactococcus lactis</i>	IV	0
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	I	3000
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	II	3000
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	III	3000
MRS	PH/C3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	IV	3000
MRS	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	I	852
MRS	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	II	972
MRS	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	III	1420
MRS	PH/C3	<i>Bacillus cereus</i>	IV	1352
MRS	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	I	0
MRS	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	II	0
MRS	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	III	0
MRS	PH/C3	<i>Bacillus subtilis</i>	IV	0

Nota: Elaborado por: Los autores, 2018