



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

### CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

#### EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS.

Tesis previa a la obtención del título de ingeniero agroindustrial

**Autor:** Mario Elicio Ulcuango Conlago

**Directora:** Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez, MSc.

**Ibarra-Ecuador**

**2016**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se autoriza su presentación como  
requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

### APROBADA:

Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez, MSc

**DIRECTORA DE TESIS**

**FIRMA**

Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**FIRMA**

Ing. Juan Carlos de la Vega, MSc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**FIRMA**

Ing. Rosario Espín, MSc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**FIRMA**

Ibarra-Ecuador  
2016



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en forma digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	172467933-5		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Ulcuango Conlago Mario Elicio		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Cayambe, Ayora, Santo Domingo N 2		
<b>EMAIL:</b>	marito_nevado@hotmail.com		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	02216-9002	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0991675976

DATOS DE LA OBRA			
<b>TÍTULO:</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS.</b>		
<b>AUTOR:</b>	Mario Elicio Ulcuango Conlago		
<b>FECHA:</b>	05 de diciembre de 2016		
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO			
<b>PROGRAMA:</b>	PREGRADO	<input checked="" type="checkbox"/>	POSGRADO <input type="checkbox"/>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	<b>INGENIERO AGROINDUSTRIAL</b>		
<b>ASESOR / DIRECTOR:</b>	Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez, MSc		

## 2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, **Mario Elicio Ulcuango Conlago**, con cédula de identidad número **172467933-5**, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo en la biblioteca de la universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior, artículo 144.

## 3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la universidad en caso de reclamación por parte de terceros.


Ibarra, a los 05 días del mes de diciembre de 2016

**EL AUTOR:**



-----  
**Ulcuango Conlago Mario Elicio**  
**C.I. 172467933-5**

**ACEPTACIÓN:**



-----  
**Ing. Bethy Chávez**  
**JEFE DE BIBLIOTECA**



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, **Ulcuango Conlago Mario Elicio**, con cédula de identidad Nro. **172467933-5**, manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte y la Secretaria de Educación Nacional superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, los derechos patrimoniales consagrados en la ley de propiedad intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6 en calidad de autor de la obra o trabajo denominado: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS**, que ha sido desarrollado para optar por el título de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL** en la Universidad Técnica del Norte, junto con el Proyecto Prometeo-SENESCYT, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En condición de autor me reservo 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 Técnica del Norte.

Ibarra, a los 05 días del mes de diciembre de 2016

Sr. Mario Elicio Ulcuango Conlago



## FORMATO DEL REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

**ULCUANGO CONLAGO, MARIO ELICIO.** EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS/ TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra, 05 de Diciembre de 2016.

**DIRECTORA: Yépez, Lucía**

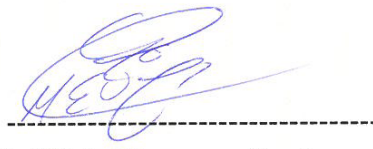
La presente investigación tuvo como objetivo general la evaluación del potencial probiótico de cepas microbianas puras, obtenidas a partir de frutos silvestres nativos.

Para los análisis se utilizó la información recolectada durante la fase de diagnóstico, la cual dio lugar a observaciones y mejoras para la evaluación de la capacidad probiótica, enfocándose principalmente en la obtención de nuevas cepas probióticas de acuerdo a los estándares.

Ibarra, 05 de Diciembre de 2016



**Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez. MSc**  
Directora de Tesis



**Mario Elicio Ulcuango Conlago**  
Autor

## **DEDICATORIA**

*Dedico mi tesis o este nuevo logro a mis padres María Conlago y Luis Ulcuango, quienes en parte son responsables de mi formación tanto personal como académica con su ejemplo de moral y ética. Su confianza y palabras de aliento dieron la fuerza necesaria para continuar a cada instante y ver culminar mi profesión*

*A mi hermana Lizeth Ulcuango, por acompañarme y haber compartido mis éxitos y derrotas a lo largo del camino. No podría sentirme más ameno con sus mejores deseos y apoyo en el transcurso del tiempo.*

*A mi Familia y amigos en general por estar con mígo en todo este tiempo compartiendo momentos felices y tristes, marcando huellas y haciendo de mi vida una historia.*

*Mario Ulcuango*

## *AGRADECIMIENTO*

*Agradezco a Dios por ser guía espiritual y permitir culminar esta etapa de mi vida.*

*A la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, por formarme como profesional servible a la sociedad.*

*De manera especial a la Dra. Gabriela Tenea y la Dra. Lucía Yépez, quienes con su capacidad, experiencia, colaboración y tiempo brindado condujeron esta investigación a un final exitoso.*

*A la Ing. Rosario Espín y el Ing. Juan Carlos de la Vega quienes me asesoraron con sugerencias y consejos compartidos en transcurso de la investigación.*

*Al Dr. José Luis Moreno por su amistad y cooperación en la elaboración de la investigación.*

*Mario Ulcuango*



# ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XV
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS .....	XIX
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIX
RESUMEN .....	XXI
SUMMARY .....	XXII
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Problema .....	1
1.2 Justificación .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo general .....	3
1.3.2 Objetivos específicos .....	3
1.4 Hipótesis .....	3
1.4.1 Hipótesis alternativa .....	3
1.4.2 Hipótesis nula .....	3
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	4
2.2 Los probióticos .....	5
2.3 Material biológico y selección de microorganismos .....	6

2.3.1 Fermentación de los frutos.....	6
2.3.2 Muestreo y selección .....	7
2.3.3 Selección de colonias puras .....	7
2.3.3.1 Medio de cultivo selectivo para bacterias ácido lácticas .....	7
2.4 Identificación de microorganismos .....	8
2.4.1 Identificación fenotípica .....	8
2.4.1.1 Tinción diferencial de Gram .....	9
2.4.1.2 Actividad de catalasa .....	10
2.4.1.3 Producción de sulfuros, indol y movilidad .....	11
2.4.1.3.1 Producción de H <sub>2</sub> S.....	11
2.4.1.3.2 Movilidad .....	11
2.4.1.3.3 Producción de indol.....	12
2.4.1.4 Producción de gas CO <sub>2</sub> de glucosa.....	12
2.4.2 Evaluación de la capacidad probiótica de las cepas aisladas.....	13
2.4.3 Tolerancia a sales biliares .....	13
2.4.4 Tolerancia a medio ácido (pH ácidos) .....	14
2.4.5 Caracterización bioquímica en relación con el crecimiento microbiano .....	14
2.4.5.1 Fases de crecimiento en la temperatura óptima de crecimiento para bacterias .....	14
2.4.5.2 Tolerancia en diferentes condiciones de cloruro de sodio. ....	15
2.4.6 Identificación genotípica .....	15
2.4.6.1 Métodos moleculares basados en ácidos nucleicos .....	16
2.5 Metodología para el análisis por espectrofotometría.....	16

2.6 Técnica de recuento en placas .....	18
2.6.1 Técnica de dilución y siembra en placa .....	19
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Caracterización del área de estudio .....	20
3.1.1 Fase de muestreo.....	20
3.1.2 Fase del desarrollo del experimento .....	21
3.2 Materiales y equipos.....	21
3.2.1 Material biológico.....	21
3.2.2 Material de laboratorio .....	21
3.2.3 Material de vidrio .....	22
3.2.4 Equipos .....	22
3.2.5 Sustancias y reactivos .....	22
3.3 Métodos .....	23
3.3.1 Factores en estudio en la evaluación de las posibles propiedades probióticas de las cepas seleccionadas. ....	23
3.3.1.1 Determinación de crecimiento en bilis .....	23
3.3.1.2 Evaluación de la supervivencia en condiciones ácidas .....	25
3.3.2 Factores en estudio en la evaluación bioquímica en relación con el crecimiento microbiano .....	27
3.3.2.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento .....	27
3.3.2.2 Determinación del crecimiento de la biomasa en la evaluación de la tolerancia en diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación con diferentes temperaturas de incubación.....	30
3.3.3 Variables evaluadas .....	34

3.3.4 Manejo específico del experimento .....	36
3.3.5 Descripción de las operaciones del proceso .....	38
3.3.5.1 Recolección de frutos silvestres .....	38
3.3.5.2 Medición de puntos GPS.....	38
3.3.5.3 Caracterización biológica de los frutos .....	39
3.3.5.3.1 Identificación taxonómica del material biológico .....	39
3.3.5.3.2 Caracterización físico-química de los frutos .....	39
3.3.5.4 Fermentación.....	39
3.3.5.5 Aislamiento de bacterias ácido lácticas .....	40
3.3.5.5.1 Preparación del medio selectivo MRS .....	40
3.3.5.5.2 Aislamiento y purificación .....	40
3.3.5.6 Identificación fenotípica .....	41
3.3.5.7 Evaluación de la capacidad probiótica de las cepas seleccionadas.....	41
3.3.5.7.1 Tolerancia a bilis .....	42
3.3.5.7.2 Tolerancia a diferentes pH ácidos .....	42
3.3.5.8 Caracterización bioquímica en relación con el crecimiento microbiano .....	43
3.3.5.8.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias seleccionadas .....	43
3.3.5.8.2 Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con las temperatura de incubación .....	44

## CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1 Variables cuantitativas en el proceso de obtención de cepas con posible capacidad probiótica.....	45

4.1.1 Codificación de los frutos y bacterias.....	45
4.1.2 Caracterización física de los frutos.....	46
4.1.3 Caracterización química de los frutos.....	46
4.2 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas .....	46
4.3 Determinación de la capacidad probiótica .....	47
4.3.1 Tolerancia a bilis.....	47
4.3.1.1 Análisis estadístico.....	49
4.3.1.2 Recuento de colonias de bacterias vivas después de cuatro horas de incubación .....	49
4.3.1.3 Curvas de crecimiento en presencia de bilis .....	51
4.3.1.4 Gráfica de la tolerancia a bilis.....	52
4.3.2 Supervivencia a medios ácidos (pH ácidos) .....	53
4.3.2.1 Análisis estadístico.....	55
4.3.2.2 Gráficas de supervivencia en pH ácidos .....	57
4.3.3 Crecimiento a diferentes temperaturas de incubación .....	62
4.3.3.1 Análisis estadístico.....	64
4.3.3.2 Gráficas de las curvas de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación .....	66
4.3.4 Evaluación del crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación con las temperaturas de incubación .....	69
4.3.4.1 Análisis estadístico.....	71
4.3.4.2 Cálculo de microorganismos vivos tolerantes a cloruro de sodio.....	74
4.3.4.3 Gráficas de las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 15 °C .....	78

4.3.4.4 Gráficas de las curvas de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 37 °C.....81

4.3.4.5 Gráficas de las curvas de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 45 °C.....84

## CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	87
5.1 Conclusiones .....	87
5.2 Recomendaciones .....	89
BIBLIOGRAFÍA .....	90
ANEXOS .....	94

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Gráfico 1.</b> Bacterias Gram propositiva y negativa .....	10
<b>Gráfico 2.</b> Reacción de la catalasa.....	11
<b>Gráfico 3.</b> Producción de gas CO <sub>2</sub> de bacterias ácido lácticas .....	12
<b>Gráfico 4.</b> Fases de crecimiento bacteriano (medio líquido).....	14
<b>Gráfico 5.</b> Curva de crecimiento absorbancia vs tiempo.....	17
<b>Gráfico 6.</b> Lectura de la absorbancia de la suspensión bacteriana. ....	18
<b>Gráfico 7.</b> Cálculo de microorganismos vivos en 1 ml de muestra con 0.3% de bilis .....	50
<b>Gráfico 8.</b> Efecto de la bilis sobre el crecimiento bacteriano .....	52
<b>Gráfico 9.</b> Viabilidad de BAL en pH 2.5 después de 3 horas de incubación .....	58
<b>Gráfico 10.</b> Viabilidad de BAL en pH 3.0 después de 3 horas de incubación .....	59
<b>Gráfico 11.</b> Viabilidad de BAL en pH 3.5 después de 3 horas de incubación .....	60

<b>Gráfico 12.</b> Viabilidad de BAL en pH 4.0 después de 3 horas de incubación .....	61
<b>Gráfico 13.</b> Viabilidad de BAL en pH 4.5 después de 3 horas de incubación .....	62
<b>Gráfico 14.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C .....	66
<b>Gráfico 15.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C .....	67
<b>Gráfico 16.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C .....	68
<b>Gráfico 17.</b> Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl .....	74
<b>Gráfico 18.</b> Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl .....	76
<b>Gráfico 19.</b> Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl .....	77
<b>Gráfico 20.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 2% de NaCl....	79
<b>Gráfico 21.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 4% de NaCl....	79
<b>Gráfico 22.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 6% de NaCl....	80
<b>Gráfico 23.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 2% de NaCl....	81
<b>Gráfico 24.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 4% de NaCl....	82
<b>Gráfico 25.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 6% de NaCl....	83
<b>Gráfico 26.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 2% de NaCl....	84
<b>Gráfico 27.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 4% de NaCl....	85
<b>Gráfico 28.</b> Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 6% de NaCl....	86
<b>Gráfico 29.</b> Fruto <i>Sacha tarqui</i> o <i>Cherry</i> .....	94
<b>Gráfico 30.</b> Fruto <i>Hamelia axillaris</i> sw .....	94
<b>Gráfico 31.</b> Fruto <i>Codrdia cylindrostachya</i> .....	94
<b>Gráfico 32.</b> Fruto <i>Bactris gasipaes kunth</i> .....	95



<b>Gráfico 33.</b> Fruto <i>Solanum quitoense lam</i> .....	95
<b>Gráfico 34.</b> Mapa con puntos de muestras de la estación experimental .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Microorganismos conocidos como probióticos.....	5
<b>Tabla 2.</b> Información climatológica del lugar de muestreo .....	20
<b>Tabla 3.</b> Información climatológica del lugar del experimento.....	21
<b>Tabla 4.</b> Medio MRS con 0.3% bilis .....	23
<b>Tabla 5.</b> Factores en estudio, experimento con porcentaje de bilis .....	24
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos con bilis .....	24
<b>Tabla 7.</b> Esquema del ADEVA 0.3% bilis .....	24
<b>Tabla 8.</b> Medio salino PBS .....	25
<b>Tabla 9.</b> Factores y niveles de estudio en el experimento de pH ácidos .....	25
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos a pH ácidos .....	26
<b>Tabla 11.</b> Esquema del ADEVA para pH ácidos.....	27
<b>Tabla 12.</b> Medio caldo MRS.....	28
<b>Tabla 13.</b> Factores en estudio en la experimentación con diferentes temperaturas.....	28
<b>Tabla 14.</b> Tratamientos diferentes temperaturas.....	28
<b>Tabla 15.</b> Esquema del ADEVA para las diferentes temperaturas.....	29
<b>Tabla 16.</b> Medio MRS con 2% NaCl.....	30
<b>Tabla 17.</b> Medio MRS con 4% NaCl.....	30
<b>Tabla 18.</b> Medio MRS con 6% NaCl.....	30
<b>Tabla 19.</b> Factores en estudio a diferentes temperaturas y concentraciones de NaCl.....	31

<b>Tabla 20.</b> Tratamientos a diferentes concentraciones de NaCl y temperaturas de incubación.	31
<b>Tabla 21.</b> Esquema del ADEVA a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y temperaturas de incubación.....	33
<b>Tabla 22.</b> Variables evaluadas en la experimentación.....	34
<b>Tabla 23.</b> Codificación de las bacterias e identificación de los frutos.....	45
<b>Tabla 24.</b> Caracterización física de los frutos.....	46
<b>Tabla 25.</b> Caracterización química de los frutos .....	46
<b>Tabla 26.</b> Características de las bacteria ácido lácticas aislados de frutos silvestres nativos...	47
<b>Tabla 27.</b> Datos de la medición de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo .....	47
<b>Tabla 28.</b> ADEVA de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo .....	48
<b>Tabla 29.</b> Prueba de Tukey al 5% para tratamientos de la variable densidad óptica a 605 nm de la tolerancia a bilis.....	49
<b>Tabla 30.</b> Recuento de unidades formadoras de colonias log UFC/ml de muestra .....	50
<b>Tabla 31.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias en 0.3% de bilis a 605 nm de absorbancia (DO).....	51
<b>Tabla 32.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes pH ácidos a la tercera hora de incubación .....	53
<b>Tabla 33.</b> ADEVA de las log UFC/ml sobrevivientes a medios ácidos al final del experimento .....	54
<b>Tabla 34.</b> Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable recuento de supervivencia en medios ácidos log UFC/ml. ....	55
<b>Tabla 35.</b> Prueba de significación DMS para el factor A (cepas) .....	56
<b>Tabla 36.</b> Prueba de significación DMS para el factor C (pH ácidos) .....	57
<b>Tabla 37.</b> La media y la desviación estándar registrada a diferentes pH ácidos en los tiempos indicados .....	57

<b>Tabla 38.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes temperaturas de incubación .....	62
<b>Tabla 39.</b> ADEVA de la densidad óptica (DO) a 605 nm en diferentes temperaturas de incubación .....	63
<b>Tabla 40.</b> Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable densidad óptica a 605 nm en las diferentes temperaturas de incubación.....	64
<b>Tabla 41.</b> Prueba de significación DMS para el factor A (cepas) .....	65
<b>Tabla 42.</b> Prueba de significación DMS para el factor D (diferentes temperaturas).....	65
<b>Tabla 43.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes temperaturas de incubación .....	66
<b>Tabla 44.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y diferentes temperaturas .....	69
<b>Tabla 45.</b> ADEVA del experimento % NaCl en relación con la temperatura .....	70
<b>Tabla 46.</b> Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable densidad óptica a 605 nm en las diferentes temperaturas de incubación y diferentes concentraciones de cloruro de sodio.....	71
<b>Tabla 47.</b> Prueba de significación DMS para el factor A (cepas) .....	72
<b>Tabla 48.</b> Prueba de significación DMS para el factor D (diferentes temperaturas).....	73
<b>Tabla 49.</b> Prueba de significación DMS para el factor E (diferentes concentraciones de cloruro de sodio).....	73
<b>Tabla 50.</b> Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 15 °C .....	74
<b>Tabla 51.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 15 °C .....	74
<b>Tabla 52.</b> Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 37 °C .....	75

<b>Tabla 53.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 37 °C .....	75
<b>Tabla 54.</b> Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 45 °C .....	77
<b>Tabla 55.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 45 °C .....	77
<b>Tabla 56.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 15 °C .....	78
<b>Tabla 57.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 37 °C .....	81
<b>Tabla 58.</b> La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 45 °C .....	84
<b>Tabla 59.</b> Fruto 1 .....	94
<b>Tabla 60.</b> Fruto 2 .....	94
<b>Tabla 61.</b> Fruto 3 .....	94
<b>Tabla 62.</b> Fruto 4 .....	95
<b>Tabla 63.</b> Fruto 5 .....	95
<b>Tabla 64.</b> Datos promediados de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo .....	102
<b>Tabla 65.</b> Datos logarítmicos de las unidades formadoras de colonias (log UFC/ml) .....	104
<b>Tabla 66.</b> Datos logarítmicos para la curva de supervivencia en medios ácidos log UFC/ml	105
<b>Tabla 67.</b> Datos de la medición de la densidad óptica (DO) a 605nm de 5 ml de cultivo para la ADEVA.....	107
<b>Tabla 68.</b> Datos promediados de la medición de la DO a 605 nm de 5 ml de cultivo .....	108
<b>Tabla 69.</b> Datos de la DO a 605 nm al final del experimento .....	110
<b>Tabla 70.</b> Experimento de diferentes concentraciones de NaCl a diferentes temperaturas de incubación .....	113

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Fotografía 1.</b> Recolección de frutos. ....	38
<b>Fotografía 2.</b> Registro de coordenadas en un GPS.....	38
<b>Fotografía 3.</b> Preparación del material vegetal y fermentación de los frutos.....	39
<b>Fotografía 4.</b> Preparación de medios, selección y purificación de bacterias.....	40
<b>Fotografía 5.</b> Procedimiento para la identificación fenotípica de las cepas de interés.....	41
<b>Fotografía 6.</b> Procedimiento para la evaluación de la tolerancia a bilis <i>in vitro</i> .....	42
<b>Fotografía 7.</b> Procedimiento para la determinación de supervivencia a pH ácidos <i>in vitro</i> .....	43
<b>Fotografía 8.</b> Temperatura adecuada de crecimiento .....	43
<b>Fotografía 9.</b> Procedimiento para la evaluación del crecimiento de BAL en concentraciones de NaCl y diferentes temperaturas <i>in vitro</i> .....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Anexo 1.</b> Clasificación taxonómica de los frutos silvestres nativos .....	94
<b>Anexo 2.</b> Mapa geográfico de la estación experimental .....	96
<b>Anexo 3.</b> Procedimiento para tinción Gram.....	97
<b>Anexo 4.</b> Procedimiento para la determinación de la actividad de catalasa.....	97
<b>Anexo 5.</b> Procedimiento para test de SIM.....	97
<b>Anexo 6.</b> Procedimiento para evaluar la producción de gas CO <sub>2</sub> de glucosa.....	97
<b>Anexo 7.</b> Protocolos para evaluar la tolerancia a bilis .....	98
<b>Anexo 8.</b> Protocolos para evaluar la tolerancia a pH .....	99

<b>Anexo 9.</b> Protocolo para el crecimiento a diferentes temperaturas .....	100
<b>Anexo 10.</b> Protocolo para evaluar la tolerancia a cloruro de sodio.....	101
<b>Anexo 11.</b> Datos individuales de las bacterias evaluadas a la tolerancia en bilis .....	102
<b>Anexo 12.</b> Gráficas individuales de las bacterias evaluadas a la tolerancia en bilis.....	103
<b>Anexo 13.</b> Datos de las cepas en diferentes pH para la ADEVA.....	104
<b>Anexo 14.</b> Datos de las cepas en diferentes pH para las gráficas de supervivencia .....	105
<b>Anexo 15.</b> Gráficas de la supervivencia individual en diferentes pH ácidos.....	106
<b>Anexo 16.</b> Datos individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación para el ADEVA .....	107
<b>Anexo 17.</b> Datos individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación para las curvas de crecimiento.....	108
<b>Anexo 18.</b> Gráficas individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación .....	109
<b>Anexo 19.</b> Datos de la experimentación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación a diferentes temperaturas de incubación .....	110
<b>Anexo 20.</b> Datos promedios de la medición de la densidad óptica a 605 nm de 5 ml de cultivo de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación a diferentes temperaturas de incubación.....	113
<b>Anexo 21.</b> Gráficos individuales a 15 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio .....	115
<b>Anexo 22.</b> Gráficos individuales a 37 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio .....	116
<b>Anexo 23.</b> Gráficos individuales a 45 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio .....	117
<b>Anexo 24.</b> Gráficos individuales a diferentes temperaturas y diferentes porcentajes de cloruro de sodio .....	118
<b>Anexo 25.</b> Glosario de términos.....	121

## RESUMEN

En este estudio, se evaluaron las propiedades probióticas *in vitro* de algunas bacterias ácido lácticas, aisladas de frutos silvestres nativos de la selva subtropical del Ecuador. Se aislaron más de 100 colonias de cada material biológico y se seleccionaron cinco cepas: cepa uno (UTNFa37), cepa dos (UTNFa38), cepa tres (UTNFa39), cepa cuatro (UTNFa40) y cepa cinco (UTNFa41); para ser caracterizadas fenotípicamente mediante técnicas microbiológicas básicas: tinción Gram, actividad de catalasa, producción de sulfuros, indol, movilidad y gas (CO<sub>2</sub>). En función de sus propiedades morfológicas se identificaron dos grupos de cepas: *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas por sus propiedades probióticas así como: tolerancia a pH ácidos que asemejan a los jugos gástricos, bilis, crecimiento a diferentes temperaturas de incubación y la tolerancia en condiciones salinas.

Las cepas seleccionadas sobreviven a medios ácidos en el rango de pH de 2.5 hasta 4.5 y fueron tolerantes a 0.3% de bilis; propiedades que indican su probable potencial probiótico. Las cepas seleccionadas crecen en diferentes temperaturas de 15 °C, 37 °C y 45 °C; con adición de diferentes concentraciones de sal. Las cepas: UTNFa37, UTNFa38, UTNFa39, UTNFa40 y UTNFa41, crecen en todas las temperaturas; mientras que UTNFa39 crece mejor a la temperatura de 15 °C y todas toleran al cloruro de sodio.

La investigación realizada es la primera noticia sobre la presencia de bacterias ácido lácticas en nichos ecológicos nativos del Ecuador. Los resultados muestran el valioso potencial probiótico de las cinco bacterias ácido lácticas estudiadas, demostrando su capacidad de tolerar la bilis, las condiciones de acidez elevadas y a diferentes concentraciones de sal. Por lo que se concluye que las cepas de bacterias aisladas de frutos silvestres poseen capacidad probiótica.

## PALABRAS CLAVE

Bacteria ácido láctica, probiótico, potencial, tolerancia a bilis.



## SUMMARY

In this study were evaluated *in vitro* the probiotic characteristics of some lactic acid bacteria, isolated on native wild type fruits of the subtropical forest of Ecuador. More than 100 colonies were isolated from each biological material, and five selected strains: strain one (UTNFa37), strain two (UTNFa38), strain tree (UTNFa39), strain four (UTNFa40) and strain five (UTNFa41) were farther characterized phenotypically by basic microbiological techniques: Gram stain, catalase activity, sulfide production, indol, mobility and gas (CO<sub>2</sub>). Based on their morphological properties the selected strains were conferred in two groups: *Lactococcus* and *Lactobacillus*.

The selected strains were evaluated for their probiotic properties as well as tolerance to gastric juices, bile, growth at different incubation temperatures and tolerance in saline conditions.

The selected strains survived in acidic media within the pH ranges of 2.5 to 4.5 and they were tolerant at 0.3% bile; properties that indicate to be considered as probiotics: each of the strain grew in different temperatures of 15 °C, 37 °C y 45 °C as well as different concentrations of medium chloride. The strains assigned UTNFa37, UTNFa38, UTNFa40, UTNFa41, grew at all temperature tested while UTNFa39 grew better at temperature of 15 °C and tolerance of medium chloride.

The research is the first news about the presence of lactic acid bacteria in native ecological niches of Ecuador. The results indicated valuable probiotic potential, demonstrated by its ability to tolerate bile, conditions of high acidity and tolerance different medium chloride. So it is concluded that strains of bacteria isolated from wild fruits have probiotic capacity.

## KEYWORDS

Lactic acid bacteria, probiotic, potential, bile tolerance.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 PROBLEMA**

El Ecuador es un país mega-diverso que posee una gran diversidad biológica, distribuida en todo su territorio. Aquí se encuentran variedades de frutos silvestres, exóticas y endémicas. Las denominadas silvestres, que no son cultivadas extensivamente, sino recolectadas de manera tradicional en selvas y bosques. Esta gran diversidad de frutos son deleite de los pobladores y fauna de las distintas zonas, más allá del gusto por sus sabores dulces, ácidos o amargos, también proporcionan funciones y beneficios para los habitantes y los ecosistemas.

Sin embargo, el poco conocimiento de las bondades que brindan los frutos silvestres, tales como: su valor nutricional, los microorganismos presentes, sus posibles usos industriales, etc. Conduce a la escasa investigación en el aprovechamiento de los recursos naturales para ser aplicados en la microbiología, como es la recuperación de nuevas cepas microbianas nativas con posible potencial probiótico y sus viables aplicaciones. Otra de las problemáticas es la competencia en producción de alimentos; en donde no existe equidad ni conciencia en la producción por algunas empresas, restaurantes o vendedores ambulantes, disponiendo de alimentos de mala calidad y que son un riesgo para la salud humana. De esta manera se ha optado en investigar la obtención de microorganismos benéficos que ayuden al sistema inmunológico del consumidor como son los probióticos.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

El Ecuador por su ubicación geográfica, presenta condiciones climáticas favorables, para la obtención de mucha flora y fauna desconocida; con gran posibilidad de ser explotados en proyectos de investigación científica. Debido a la diversidad de especies de plantas y frutos tropicales silvestres presentes en el país, cuya clasificación taxonómica no se conoce en su mayoría; pero los pobladores conocen los nutrientes benéficos, el valor cultural de consumo o mercantil. Siendo el motivo de aprovechamiento de estos recursos para un estudio de aislamiento y evaluación de posibles cepas de bacterias que se extrae a partir de frutos silvestres nativos, y estas posiblemente presenten capacidad probiótica.

La obtención de cepas se realizará aprovechando los frutos silvestres nativos de la estación experimental la Favorita de la UTN, se reproducirá los microorganismos que estos poseen, como son las bacterias ácido lácticas; a las cuales se propone el screening, aislamiento e identificación. El motivo por el cual se realiza el desarrollo de la investigación a los frutos silvestres nativos, se debe por su gran resistencia a los diferentes factores climáticos que están sometidos durante su vida útil, al no ser tratados en su desarrollo y que son de consumo de los pobladores y la fauna de la zona. Esto aporta al estudio de la biotecnología y por ende a la agroindustria, ampliando mucho más los aportes benéficos de los microorganismos al ser humano.

Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo (2012) afirman que: “Las cepas con capacidad probiótica son “microorganismos vivos” que al agregarse a los alimentos o medicamentos ejercen efectos benéficos en la salud de los sujetos que los consumen”. Con el aporte de la biotecnología los estudios previos para la obtención de nuevas cepas con capacidad probiótica, ayudarán al mejoramiento de la calidad de los productos como son los alimenticios funcionales.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial probiótico de cepas microbianas puras, obtenidas a partir de los frutos silvestres nativos.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar y seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas de frutos silvestres nativos.
- Caracterizar fenotípicamente las cepas microbianas seleccionadas.
- Probar el potencial probiótico de las cepas seleccionadas en base a ensayos bioquímicos específicos (tolerancia a bilis y condiciones ácidas elevadas).
- Determinar la temperatura óptima de crecimiento de las cepas seleccionadas.
- Evaluar la tolerancia en diferentes condiciones de cloruro de sodio.

## **1.4 HIPÓTESIS**

### **1.4.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

**Hi:** Las cepas aisladas de frutos silvestres nativos tienen capacidad probiótica.

### **1.4.2 HIPÓTESIS NULA**

**Ho:** Las cepas aisladas de frutos silvestres nativos no tienen capacidad probiótica.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Dairy Foundation, (1997) afirma que las bacterias lácticas producen ácido láctico como su principal producto y se las encuentra en la naturaleza como es en el: suelo, verduras, carne, leche y en el cuerpo humano o animal. Muchas de estas bacterias son utilizadas en los productos lácteos fermentados, tales como: los *Streptococos thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que son utilizados necesariamente en la producción de yogurt; otra bacteria como *Lactobacillus casei* se encuentra con frecuencia en los quesos.

En sus estudios Buruleanu, Bratu, Manea, Avram, & Nicolescu (2013) aseguran que: estas se encuentran entre los microorganismos probióticos más importantes típicamente asociados con el tracto gastrointestinal humano y que las bacterias lácticas han sido clasificadas sobre la base de propiedades fenotípicas. Sin embargo, algunas especies, como el grupo llamado *Lactobacillus acidophilus* y algunas *Bifidobacterias*, no son fácilmente distinguibles por características fenotípicas y se recurre a la identificación molecular o genotípica.

Las bacterias ácido lácticas consisten en una serie de géneros bacterianos dentro del phylum Firmicutes (filo piel gruesa). Los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenoccus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* se las reconoce como BAL (Beasley, 2004).

Vandamme, et al., (1996) aseveran que “algunos autores incluyen el género *Bifidobacterium* debido a su rol como probiótico, aunque pertenece a un grupo filogenético diferente”. Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos, se encuentran las bacterias ácidos lácticas; agrupando una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies observándose en la tabla 1. Las cepas utilizadas generalmente, pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (Amores, et al., 2004).

**Tabla 1.** Microorganismos conocidos como probióticos.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetyllactis</i>				<i>Leuconostocs</i> pp
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. breve</i>					
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>					
<i>L. kéfir</i>	<i>B. adolescentis</i>					
<i>L. brevis</i>						
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

Fuente: (Álvares-Olmos & Oberhelman, 2001)

## 2.2 LOS PROBIÓTICOS

Schrezenmeir, (2001) conceptúa que “un probiótico es un preparado o un producto que contiene microorganismos viables en suficientes números, que alteran la micro flora (por implantación o colonización) en un compartimento del consumidor, provocando efectos beneficiosos para la salud”.

En relación con los alimentos, son considerados como preparaciones viables en estos o como suplementos dietéticos, para mejorar la salud de los seres humanos y los animales. Existen un número impresionante de especies microbianas considerados como probióticos, pero la especie más importante que se utiliza como probióticos son las bacterias ácido lácticas (Harzallah & Belhadj, 2013).

En general, las características probióticas dependen de múltiples aspectos, que generalmente no son específicos a una sola resistencia. Algunos de los efectos probióticos son realizados *in vitro* como son: la producción de enzimas, vitaminas, aminoácidos, la capacidad de adherencia, el efecto antagonista sobre microorganismos patógenos, la tolerancia a las sales biliares, la producción de bacteriocinas, resistencia a los jugos gástricos, reducción de los niveles de colesterol y la estimulación del sistema inmune entre otros (Lee & Salminen, 2009).

## **2.3 MATERIAL BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS**

La Real Academia Española, (2015) el fruto es “producto del desarrollo del ovario de una flor después de la fecundación. En él quedan contenidas las semillas. Con frecuencia cooperan a la formación del fruto tanto el cáliz como el receptáculo floral y otros órganos”.

Según estudios se sabe que la presencia de microorganismo está en frutos, verduras, leche y sus derivados, en el cuerpo humano o animal y que de estas se puede obtener nuevas cepas a ser identificadas y caracterizadas; siendo el motivo principal el aislar bacterias ácido lácticas de frutos desconocidos.

Se entiende como “variedades silvestres”, a aquellos materiales que constan de cierta integridad genética, reconocibles morfológicamente (tradicional y etnobotánicamente conocidas por multitud de nombres diferentes en función de la zona geográfica) y que difieren de las cultivadas en su adaptación al tipo de suelo, fecha de siembra, maduración, altura, valor nutritivo, uso y otras propiedades (Nuez, 2010).

### **2.3.1 FERMENTACIÓN DE LOS FRUTOS**

La fermentación, es la energía de levitación anaeróbica del metabolismo de nutrientes; el azúcar con ayuda de algunos microorganismos convierten a los nutrientes en ácido láctico, ácido acético y etanol, siendo estos productos finales de la fermentación. Esto hace referencia al crecimiento de microorganismos en los alimentos. Aquí, no se establece diferencia entre metabolismo aerobio y anaerobio, concurriendo esto a la causante de cambiar gradualmente las



características de los alimentos por acción de enzimas, producidas por algunas bacterias, mohos y levaduras (Tortora, Funke, & Case, 2007).

### **2.3.2 MUESTREO Y SELECCIÓN**

Cuando se realiza un estudio sobre obtención de nuevas cepas con capacidad probiótica, el primer paso es el muestreo, el cual debe realizarse en lugares en los que probablemente se encuentre el microorganismo de acuerdo a la ecología y características de crecimiento.

Thomas, Hynes, & Ingledew, (2002) afirman que “al disponer de nuevas cepas se procede por un lado a realizar pruebas bioquímicas e incluso moleculares, que permitan caracterizar el microorganismo y por otro, realizar transferencias en medios adecuados según el tipo de microorganismo, que permitan obtener un cultivo axénico”.

### **2.3.3 SELECCIÓN DE COLONIAS PURAS**

Generalmente los microorganismos se encuentran en poblaciones, formando parte de comunidades de gran complejidad, por lo que uno de los objetivos es el screening y aislamiento de bacterias puras. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales, se realiza en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro o axénico, también conocido como cepa, que contiene un solo tipo de microorganismo con la misma composición genética (Aquiahuatl Ramos, et al., 2012).

#### **2.3.3.1 Medio de cultivo selectivo para bacterias ácido lácticas**

En la identificación de bacterias ácido lácticas se utiliza medio selectivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS agar y caldo). Estos investigadores desarrollaron este medio con el propósito específico de emplearlo para el cultivo de *Lactobacilos* en productos derivados de la leche, aunque no por esto deja de estar indicado en otras aplicaciones con bacterias ácido lácticas (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960).

Los estudios de Cultimed, (2014) mencionan que: por la presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio, se aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de los *Lactobacilos*, mientras que el di-Amonio Hidrógeno Citrato inhibe el crecimiento de la mayor parte de gérmenes contaminantes en cuanto al di-Potasio Hidrógeno Fosfato se emplea para estabilizar el pH del medio, mientras que el Tween constituye su fuente de ácidos grasos. De esta manera este medio es ideal para el crecimiento masivo de todas las cepas de *Lactobacilos*, incluso aquellas de crecimiento lento y difícil. El crecimiento también puede mejorarse reduciendo el pH hasta 5,5 aproximadamente, sin embargo, se dificulta la gelificación del medio.

## **2.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

### **2.4.1 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA**

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana, se basan en las características observables de las bacterias, tales como: morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de selección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta selección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación (Agrawal & Prakash, 2013).

Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) afirma que: las pruebas básicas empleadas en la identificación fenotípica de nuevas bacterias son: tinción Gram, actividad de catalasa, producción de sulfuros, indol, motilidad y producción de gas (CO<sub>2</sub>). Otras pruebas bioquímicas, se realiza en medios de cultivo que contienen indicadores de pH para detectar la producción de ácido o álcali, al igual que inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes y sulfuros que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas.

Agrawal & Prakash, (2013) mencionan en su investigación que “las actividades evaluadas a las nuevas cepas con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa,

lactosa, sacarosa), para catabolizar aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo (oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etcétera)”.

Por la importancia que tienen las pruebas bioquímicas para la identificación de especies bacterianas en áreas de alimentos, clínica y ambiental, Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) mencionan que “se han desarrollado sistemas bioquímicos miniaturizados (Api), Micro ID, Microgen que se realizan en forma más rápida y segura, pero que mantienen los criterios de evaluación de las pruebas bioquímicas convencionales”.

Los sistemas de identificación fenotípicos presentan problemas inherentes en los resultados (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros) (Fernández Olmos, et al., 2010).

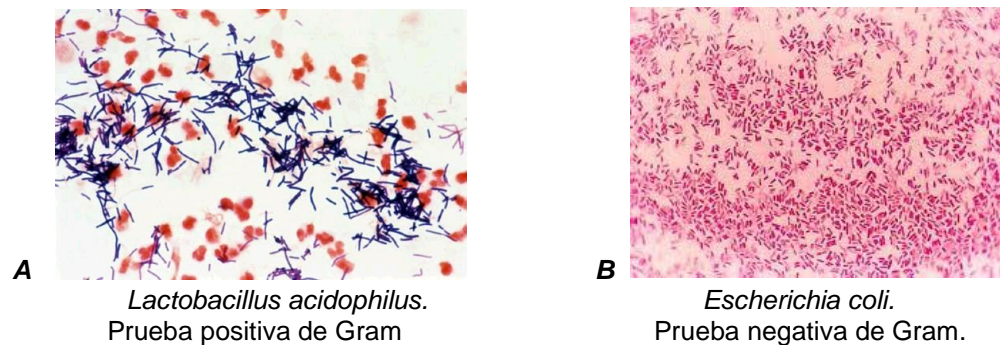
#### **2.4.1.1 Tinción diferencial de Gram**

La tinción fue denominada por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas (en este caso, los términos positivo y negativo no se relacionan con carga eléctrica, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, (2009) mencionan que es el proceso por el cual las moléculas de un colorante son adsorbidas en una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en el microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden ser observadas claramente sin algún tratamiento previo como es la tinción.

Las diferencias en la composición de las paredes de las células Gram positivas, es por contener una capa gruesa de peptidoglicano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico y las

paredes de las células Gram negativas, donde la capa de peptidoglicano es más delgada, explicando las diferencias de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. Es probable que la gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico de los microorganismos Gram positivos contribuya a su capacidad de resistir la decoloración con alcohol. Si bien el decolorante de contraste puede ser captado por los microorganismos Gram positivos, su color violeta no se altera (Fordes, Sahm, & Weissfeld, 2009).



**Gráfico 1.** Bacterias Gram positiva y negativa  
Fuente: (Modificado de atlas, 1995)

En el gráfico **A** se puede observar que las bacterias Gram positivas observadas con aceite de inmersión, tienen un color violeta por ejemplo los *Lactobacillus acidophilus*. El gráfico **B** muestra que las bacterias Gram negativas observadas con aceite de inmersión, tienen aspecto rosado, siendo un ejemplar la *Escherichia coli*.

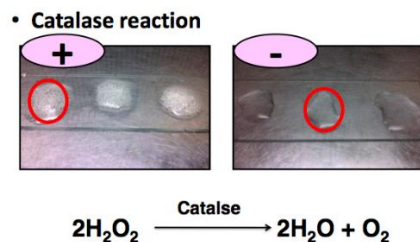
Behnsen, Deriu, Sassone-Corsi, & Raffatellu, (2013) afirman que “las cepas probióticos utilizados en la industria farmacológica y en producción de alimentos funcionales incluyen a las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que se han utilizado durante siglos en la producción de alimentos procesados (yogurt, queso, encurtidos) son las Gram positivos”.

#### **2.4.1.2 Actividad de catalasa**

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa, hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso, que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar

*Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp.* (negativa) (Fernández Olmos, et al., 2010).

Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) presentan “en el gráfico 2 la reacción de una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre bacterias, observándose la formación de burbujas que indican una prueba de catalasa (+)”.



**Gráfico 2.** Reacción de la catalasa

Fuente: (Aquiahuatl Ramos, et al., 2012)

### 2.4.1.3 Producción de sulfuros, indol y movilidad

#### 2.4.1.3.1 Producción de H<sub>2</sub>S

El propósito de la prueba es descartar organismos coliformes basada en la producción de hidrógeno. El Sodio Tiosulfato y el Amonio Hierro (III) o Sulfato, permiten poner de manifiesto la formación de Hidrógeno de Sulfuro por el precipitado negro que se forma. Dando como resultados a la prueba positiva (+), ennegrecimiento del medio y en la prueba negativa (-), no hay ennegrecimiento (Cultimed, 2014).

#### 2.4.1.3.2 Movilidad

La finalidad de esta prueba es separar las bacterias Gram negativas que muestran orgánulos locomotores o lo que se conoce como “movilidad deslizante”. La mezcla de peptonas constituye el elemento nutritivo del medio. Los resultados en la prueba positiva presenta una turbidez difusa del medio, mientras que en la prueba negativa sólo existe crecimiento a lo largo de la picadura (Koneman, Procop, Schreckenberger, & Woods, 2006).

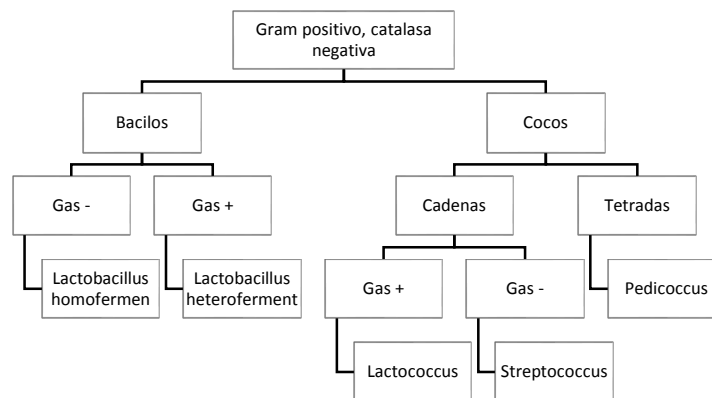
### 2.4.1.3.3 Producción de indol

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa. Presentándose en la prueba positiva la aparición de color rojo cuando se agrega el reactivo de Kovacs, mientras que la prueba negativa no hay aparición de color (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

### 2.4.1.4 Producción de gas CO<sub>2</sub> de glucosa

Los estudios del manual de Microbiología, (2015) muestran en el gráfico 3 la clasificación de las bacterias ácido lácticas debido a la degradación de los azúcares (glucosa) en la fermentación que pueden resultar:

- Homofermentativas: degradan el azúcar en ácido láctico y en la fermentación producen aproximadamente: 90% ácido láctico, 10% CO<sub>2</sub> y acetona.
- Heterofermentativas: Degradación de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato.



**Gráfico 3.** Producción de gas CO<sub>2</sub> de bacterias ácido lácticas

Fuente: (Microbiología, 2015)

## **2.4.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS AISLADAS**

La selección de una cepa con capacidad probiótica requiere que sus efectos fisiológicos beneficiosos sean demostrados científicamente, que las cepas sean de origen vegetal, cárnico, leche, humano y sean segura para uso humano. Los probióticos deben ser estables al ácido, la bilis y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como que también excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos y contribuyan en la formación de una flora intestinal normal equilibrada (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, 2012).

Los estudios de Ávila, et al., (2010) mencionan que las cepas bacterianas que van a ser usadas en la obtención de probióticos, deben resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas, a los bajos valores de pH (1.8-3.2) prevalcientes en el estómago y a la concentración de bilis (0.3%), jugos pancreáticos y mucus presentes en el intestino delgado. Además deben resistir a los antibióticos eventualmente administrados en la dieta e igualmente producir sustancias antimicrobianas, tales como: ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otras.

## **2.4.3 TOLERANCIA A SALES BILIARES**

Peréz Conesa, (2003) afirma que los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y se secretan de la vesícula biliar al duodeno en forma conjugada, pudiendo sufrir modificaciones químicas en el colon. Los ácidos biliares, tanto conjugados como deconjugados, exhiben actividad antibacteriana inhibiendo *in vitro* el crecimiento de *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Enterococcus sp.* Las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas a este efecto.

La resistencia a sales biliares es un mecanismo que implica proteínas de membrana unidos a adenosín trifosfato, lo cual permite de manera eficiente el transporte en ácidos biliares. Otro mecanismo por el cual las cepas son resistentes a las altas concentraciones de sales biliares es la acumulación de polioles y glicerol como elementos para regular la presión osmótica de las células con el ambiente externo; las bacterias toleran a las sales biliares por generar un modo de defensa con proteínas y grasas (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, 2012).

## 2.4.4 TOLERANCIA A MEDIO ÁCIDO (pH ÁCIDOS)

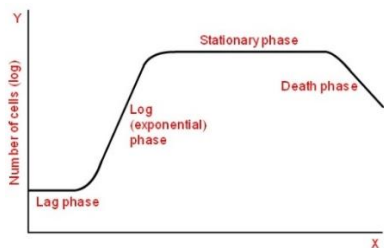
Antes de alcanzar el tracto gastrointestinal (TGI), los probióticos deben sobrevivir al tránsito a través del estómago, donde la secreción del ácido gástrico constituye la primera defensa contra la mayoría de los microorganismos ingeridos (Hoque, et al., 2010).

La tolerancia a pH puede ser debido a dos tipos de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transportadores como se puede identificar en la levadura; Nha1p, que se encuentra en la membrana plasmática y Nhx1p, también se encuentra en el compartimento endosomal pre-vacuolar. Estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) y  $\text{H}^+$  a través de las membranas, de modo que regulan las concentraciones de cationes y pH en orgánulos citoplasmáticos y estabilizan a los niveles medios. Otro posible mecanismo de regulación es una ATPasa localizada en la membrana citoplasmática, se puede crear un gradiente de protones electroquímicos cuya función es la de transporte secundario de solutos y que está implicado en mantener estrecha pH a neutro (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, 2012).

## 2.4.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA EN RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO MICROBIANO

### 2.4.5.1 Fases de crecimiento en la temperatura óptima de crecimiento para bacterias

De la Rosa Fraile, Prieto Prieto & Navarro Marí, (2011) mencionan que cuando una población bacteriana es transferida a un nuevo medio de cultivo líquido, comienza a multiplicarse de acuerdo con las dinámicas que se muestra en el gráfico 4 donde el eje Y es el número de bacterias en UFC/ml o log UFC/ml y en el eje X es el tiempo de incubación.



**Gráfico 4.** Fases de crecimiento bacteriano (medio líquido).  
Fuente: (De la Rosa Fraile, Prieto Prieto & Navarro Marí, 2011)



- **Fase de latencia (lag):** período de adaptación antes de comenzar a multiplicarse.
- **Fase Exponencial:** la multiplicación bacteriana se acelera enormemente y en cada generación se produce un número de bacterias proporcional a las existentes.
- **Fase estacionaria:** se alcanza cuando se consume los elementos nutritivos y número de bacterias se mantiene estable.
- **Fase de declive:** las bacterias comienzan a morir.

Las bacterias también difieren en su temperatura óptima de crecimiento, la mayoría de las bacterias patógenas son mesófilas y crecen mejor a temperaturas de alrededor de 37 °C (temperatura del cuerpo humano) (De la Rosa Fraile, Prieto Prieto, & Navarro Marí, 2011).

- **Psicrófilas:** óptimo por debajo de 20 °C.
- **Mesófilas:** entre 20° y 40 °C.
- **Termófilas:** entre 55° y 80 °C.

#### **2.4.5.2 Tolerancia en diferentes condiciones de cloruro de sodio.**

Los estudios realizados por Martins, et al., (2005) afirman que “una prueba muy importante para considerar una cepa con capacidad probiótica es su resistencia a los jugos gástricos. El jugo gástrico secretado tiene un pH de 2.0 y una concentración de sales de 0,5% (p/v) junto con enzimas catabólicas”.

#### **2.4.6 IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA**

Los métodos de identificación genotípicos se basan en el estudio del material genético de los microorganismos, no en sus características externas. Son más complicados y costosos que los

fenotípicos y tienen el inconveniente (a diferencia de las técnicas fenotípicas clásicas) de que no es posible recuperar la cepa usada (Génova, 2005).

Los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 12S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada (Fernández Olmos, et al., 2010).

#### **2.4.6.1 Métodos moleculares basados en ácidos nucleicos**

Génova, (2005) menciona que la secuencia de nucleótidos del ADN y ARN es una característica propia y específica de cada especie, por lo que se considera como una huella dactilar. Algunas de las técnicas moleculares que da a conocer son:

- Métodos de hidratación de ácidos nucleicos.
- Técnicas de amplificación génica.
- Métodos de digestión enzimática.

## **2.5 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

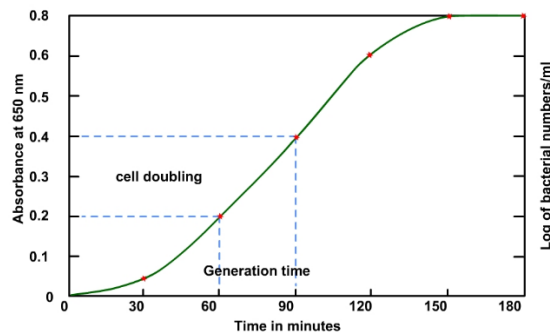
El crecimiento de un organismo es el aumento en el tamaño y masa celular durante el desarrollo. Siendo las únicas características de todos los organismos para su generación de energía y la biosíntesis celular.

El crecimiento del organismo se ve afectado tanto por factores físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen el pH, la temperatura, la presión osmótica, presión hidrostática, y contenido de humedad del medio en el que el organismo está creciendo. Los factores

nutricionales incluyen la cantidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, y otros oligoelementos proporcionados en el medio de crecimiento.

Las bacterias son unicelulares (organismos unicelulares). Cuando las bacterias alcanzan un cierto tamaño, se dividen por fisión binaria, en la que la célula se divide en dos, dos en cuatro y continúa con el proceso de una manera geométrica. Esto se conoce como fase de crecimiento activo de la bacteria. Para estudiar la población crecimiento bacteriano, las células viables de la bacteria deben inocularse en el caldo estéril y se incuban en condiciones de crecimiento óptimas. La bacteria comienza a utilizar los componentes de los medios de cultivo, además de aumentar en tamaño y masa celular.

La dinámica del crecimiento bacteriano se puede estudiar mediante el trazado de crecimiento celular (absorbancia) versus el tiempo de incubación o el registro del número de células en función del tiempo (Gráfico 5). La curva obtenida de este modo es una curva sigmoide y se conoce como una curva de crecimiento estándar (Vishwa Vidyapeetham, 2015).

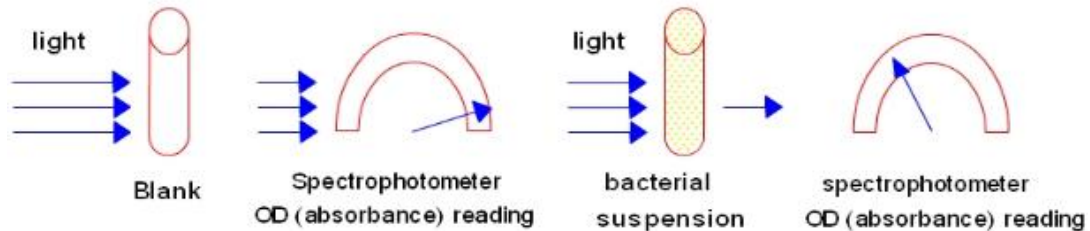


**Gráfico 5.** Curva de crecimiento Absorbancia vs Tiempo.

Fuente: (Vishwa Vidyapeetham, 2015)

El aumento de la masa celular del organismo se mide utilizando el espectrofotómetro. El equipo mide la turbidez o la densidad óptica, que es la medida de la cantidad de luz absorbida por una suspensión bacteriana. El grado de turbidez en el caldo de cultivo está directamente relacionada con el número de células viables, microorganismo vivos o muertos presente, es un método conveniente y rápido de medir la tasa de crecimiento de las células de un organismo. Así, el aumento de la turbidez del medio de cultivo indica aumento de la masa celular microbiana

(Gráfico 6). La cantidad de luz transmitida a través de cultivo turbio disminuye con el consiguiente aumento en el valor de la absorbancia (Vishwa Vidyapeetham, 2015).



**Gráfico 6.** Lectura de la absorbancia de la suspensión bacteriana.

Fuente: (Vishwa Vidyapeetham, 2015)

## 2.6 TÉCNICA DE RECuento EN PLACAS

El crecimiento microbiano se define como el aumento del número de microorganismos o de biomasa en un periodo de tiempo determinado. Existen diferentes métodos para detectar y medir el crecimiento de microorganismos.

La forma de cuantificar células viables más utilizada en microbiología es la de recuento en placa con medios de cultivo específicos para la población de interés. Consiste en inocular un volumen determinado de cultivo o muestra sobre un medio de cultivo sólido adecuado para el crecimiento de colonias. Cada una de estas deriva de una célula aislada; es decir, una unidad formadora de colonia (UFC).

Hay dos variaciones en la forma de realizar esta técnica: la siembra en superficie o vertido en placa, en ambos casos, a la muestra a cuantificar se le aplica el método de diluciones sucesivas y cada dilución se deposita en cajas de Petri estériles.

Es recomendable homogenizar las diluciones y hacer la adecuada inoculación de las muestras para evitar resultados erróneos. Si no se separan bien las células, se obtendrán valores bajos y los valores serán elevados si la toma de muestra se hace del fondo del tubo donde se concentran los microorganismos por gravedad (Aquiahuatl Ramos, et al., 2012).

### **2.6.1 TÉCNICA DE DILUCIÓN Y SIEMBRA EN PLACA**

En condiciones asépticas, pipetear 1 ml del cultivo del microorganismo o de la muestra problema y depositarla en el tubo con 9 ml de agua estéril. Esta corresponderá a la dilución  $10^{-2}$ . Hacer diluciones decimales del cultivo hasta  $10^{-n}$  para facilitar el conteo.

Para la inoculación por la técnica de superficie, se deposita 0.1 ml de la dilución que se desea cuantificar. Distribuir cuidadosamente el inóculo en toda la superficie de la caja con una varilla de vidrio doblada en “L” que previamente fue sumergida en alcohol, pasada en la flama del mechero y previamente enfriada.

Incubar las cajas en forma invertida a  $37^{\circ}\text{C}$  o a la temperatura adecuada durante 24-72 horas y realizar el recuento de colonias, con la ayuda de un contador de colonias (Aquiahuatl Ramos, et al., 2012).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El estudio realizado fue parte del proyecto Prometeo con el título: “Bioprospección y mejoramiento de cepas de bacterias, hongos y levaduras de zonas no explotadas, para el desarrollo de nuevos probióticos a ser aplicados en la producción de alimentos”.

La investigación fue realizada en dos fases:

##### 3.1.1 FASE DE MUESTREO

La fase de muestreo o recolección de frutos nativos fue realizada en la estación experimental “La Favorita” ubicada en la provincia Santo Domingo de los Tsachilas, parroquia Alluriquín, sector Chiriboga, a 40 Km al Noroeste de la ciudad de Quito, esta comunicada por una vía alterna secundaria que va desde el sector de Chillogallo hasta la población de Chiriboga. En la tabla 2 se presenta algunas características climatológicas de la zona:

**Tabla 2.** Información climatológica del lugar de muestreo

---

<b>Área</b>	: 448 hectáreas
<b>Altitud</b>	: 1600 a 2200 msnm
<b>Temperatura media anual</b>	: 16° C
<b>Precipitación media anual</b>	: 3000 mm
<b>Tipos de suelo</b>	: Suelos limo-arenosos derivados de cenizas volcánicas vítreas.
<b>Tipo de vegetación</b>	: Remanentes de bosque primario con bosque secundario y plantaciones forestales

---

Fuente: (Beltrán, Cuamacas, & Rosero, 2009)

---

### 3.1.2 FASE DEL DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

La parte experimental se realizó en los Laboratorios de análisis físico-químico, microbiológico y biotecnología molecular de la Universidad Técnica del Norte que se encuentran ubicados en el edificio de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, quinto piso.

La tabla 3 indica las condiciones ambientales de la ubicación del experimento:

**Tabla 3.** Información climatológica del lugar del experimento

<b>Provincia</b>	: Imbabura
<b>Cantón</b>	: Ibarra
<b>Parroquia</b>	: El sagrario
<b>Temperatura</b>	: 17.4º C
<b>Altitud</b>	: 2250 m.s.n.m
<b>Clima</b>	: Templado
<b>Latitud</b>	: 00 18' norte
<b>Longitud</b>	: 78 09' oeste
<b>Pluviosidad</b>	: 503-1000 m.m/año
<b>Humedad relativa promedio</b>	: 73%

Fuente (INAMHI, 2014)

## 3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se recolectaron cinco muestras de frutos silvestres, observándose en el Anexo 1 y se realizó su clasificación taxonómica.

De los cinco frutos silvestres nativos se aislaron cinco cepas ácido lácticas. También se utilizó un probiótico comercial que ayudo como testigo.

### 3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Cooler	Fundas estériles	Papel toalla
Guantes de nitrilo	Fundas autoclavables	Papel aluminio
Guantes para calor	Papel empaque	Tijera

Piseta	Gradillas	Gotero
Bisturí	Micro tubos	Atomizador
Agujas de disección	Micro pipetas	Cucharas
Pinzas	Micro soporte de micro	Paletas
Asas	tubos	Plancha de calor
Agitadores	Puntas para micro pipetas	Agitador magnético
Soporte universal		Bandeja

### 3.2.3 MATERIAL DE VIDRIO

Porta objetos	Bureta
Tubos capilares	Vasos de precipitación
Tubos de ensayo con tapa rosca	Varillas de dispersión
Goteros de vidrio	Pipetas
Cajas Petri	Probetas
Frascos autoclavables	

### 3.2.4 EQUIPOS

Cámara fotográfica	Contador de colonias	Espectrofotómetro NOVA
GPS	Microscopio óptico	60 A
Mechero de bunsen	Computadora	Centrifuga
Balanza analítica	Cámara para microscopio	Horno de secado
Refractómetro electrónico	Autoclave	Refrigeradora y ultra
Potenciómetro	Incubadora	congelador
Vortex	Cámara de flujo laminar	

### 3.2.5 SUSTANCIAS Y REACTIVOS

Geles para conservación	Agua destilada	Alcohol cetona
Probiótico comercial	Alcohol	Agua potable



Fenolftaleína	Safranina	MRS caldo
Hidróxido de sodio (NaOH)	Aceite de inmersión	PBS
MRS	Peróxido de hidrogeno	HCl 0.1, 1 N
AGAR	0.3%	NaCl
Cristal violeta	SIM	
Lugol	Kovaks	
	Bilis de vacuno	

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 FACTORES EN ESTUDIO EN LA EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

##### 3.3.1.1 Determinación de crecimiento en bilis

Una de las propiedades probióticas es la tolerancia a bilis, para la determinación de este factor se utilizó bilis natural de vacuno; preparando un medio de cultivo como se muestra en la tabla 4. Simulando la resistencia de las bacterias a 0.3% de bilis liberado por la vesícula biliar al duodeno al ingerir un alimento.

**Temperatura de incubación:** 37 °C por 4 horas.

**Porcentaje de bilis:** en el medio de cultivo se encuentra al 0.3% y se mantiene fijo.

**Tabla 4.** Medio MRS con 0.3% bilis

Medio de cultivo MRS	Cantidades	%
Agua destilada (ml)	1000	94,5
MRS (g)	55	5,2
Bilis (ml)	3	0,3
Total:	1058	100

En la tabla 5 se presentan los factores y niveles utilizados en el diseño completamente al azar. Siendo cinco cepas obtenidas de los frutos y un probiótico comercial como control indicándose.

**Tabla 5.** Factores en estudio, experimento con porcentaje de bilis

<b>FACTOR</b>	<b>NIVEL 1</b>	<b>NIVEL 2</b>	<b>NIVEL 3</b>	<b>NIVEL 4</b>	<b>NIVEL 5</b>	<b>NIVEL 6</b>
<b>A: Cepa de interés</b>	1	2	3	4	5	6
<b>B: Bilis</b>	0.3%					

El Diseño experimental utilizado en la determinación de tolerancia a bilis es completamente al azar observándose los tratamientos en la tabla 6.

**Tabla 6.** Tratamientos con bilis

<b>N</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Cepa</b>	<b>Bilis</b>
<b>1</b>	A1B1	1	0.3%
<b>2</b>	A2B1	2	0.3%
<b>3</b>	A3B1	3	0.3%
<b>4</b>	A4B1	4	0.3%
<b>5</b>	A5B1	5	0.3%
<b>6</b>	A6B1	6	0.3%

Tratamientos: 6

Repeticiones: 3

Total unidades experimentales: 18

La tabla 7 muestra el esquema del análisis de varianza.

**Tabla 7.** Esquema del ADEVA 0.3% bilis

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	17
Tratamientos	5
Error experimental:	12

El Análisis funcional se determina con:

- Coeficiente de variación (C.V).
- Para la diferencia estadística entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey al 5%.
- Desviación mínima significativa (DMS) para factores.

Las variables de respuesta en la experimentación con bilis son:

- Absorbancia: densidad óptica a 605 nm

- Curva de crecimiento: absorbancia (605 nm) vs tiempo (minutos)
- Recuento de microorganismos en placa

### 3.3.1.2 Evaluación de la supervivencia en condiciones ácidas

La resistencia o supervivencia de las bacterias a medios ácidos (otra propiedad probiótica), se realiza mediante la simulación de las condiciones acidas, que las bacterias deben resistir a los jugos gástricos en el estómago utilizando ácido clorhídrico, es uno de los ácidos que el cuerpo produce para el desdoblamiento de los alimentos ingeridos; con el propósito de ayudar a una mejor digestión o también siendo causante de enfermedades.

**La temperatura de incubación:** Durante las 3 horas de experimentación se inoculo en medio PBS con diferentes pH y se incubó a 37 °C; mientras que para la siembra en placas se utilizó temperaturas óptimas para cada cepa.

**pH:** El pH en el medio de cultivo se ajusta con HCl al 0.1 y 1N.

La solución tapón PBS ayuda a las células a activar el modo de defensa cuya composición se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.** Medio salino PBS

Sal	Concentración (g/L)
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24

Los factores y niveles en estudio utilizados en la tolerancia a medio ácido se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Factores y niveles de estudio en el experimento de pH ácidos

FACTOR	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3	NIVEL 4	NIVEL 5	NIVEL 6
<b>A: Cepas de interés</b>	1	2	3	4	5	6
<b>C: pH</b>	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	

El diseño experimental utilizado es completamente al azar con arreglo factorial A x C, donde A son las cinco cepas de interés con el testigo comercial y C los diferentes niveles de pH, mostrándose los tratamientos en la tabla 10.

**Tabla 10.** Tratamientos a pH ácidos

<b>N</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Cepa</b>	<b>pH</b>
1	A1C1	1	2.5
2	A1C2	1	3
3	A1C3	1	3.5
4	A1C4	1	4
5	A1C5	1	4.5
6	A2C1	2	2.5
7	A2C2	2	3
8	A2C3	2	3.5
9	A2C4	2	4
10	A2C5	2	4.5
11	A3C1	3	2.5
12	A3C2	3	3
13	A3C3	3	3.5
14	A3C4	3	4
15	A3C5	3	4.5
16	A4C1	4	2.5
17	A4C2	4	3
18	A4C3	4	3.5
19	A4C4	4	4
20	A4C5	4	4.5
21	A5C1	5	2.5
22	A5C2	5	3
23	A5C3	5	3.5
24	A5C4	5	4
25	A5C5	5	4.5
26	A6C1	6	2.5
27	A6C2	6	3
28	A6C3	6	3.5
29	A6C4	6	4
30	A6C5	6	4.5

Tratamientos: 30

Repeticiones: 3

Total unidades experimentales: 90

La tabla 11 muestra el esquema del análisis de la varianza.

**Tabla 11.** Esquema del ADEVA para pH ácidos

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	89
Tratamientos	29
Factor A	5
Factor C	4
A x C	20
Error experimental:	60

El análisis funcional se determina con:

- Coeficiente de variación (C.V).
- Para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey al 5%.
- Desviación mínima significativa (DMS) para factores.

La variable de respuesta para la tolerancia a medio ácido es:

- Determinación de UFC/ml: recuento en placas (UFC) vs tiempo (horas).

### **3.3.2 FACTORES EN ESTUDIO EN LA EVALUACIÓN BIOQUÍMICA EN RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO MICROBIANO**

#### **3.3.2.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento**

Las bacterias se desarrollan de mejor manera en las condiciones que sean adecuadas para cumplir con su metabolismo, una de estas fue la temperatura a la cual se desarrollaron las bacterias seleccionadas.

- Temperatura de 15 °C: se buscó analizar el comportamiento de las bacterias seleccionadas a una temperatura ambiental de conservación promedio en la zona de estudio.

- Temperatura de 37 °C: se buscó simular la temperatura del organismo de un ser humano o animal.
- Temperatura de 45 °C: es utilizado para simular un tratamiento térmico, al cual se sometería un alimento con dichas bacterias.

En la tabla 12 se muestra el contenido en la preparación del medio de cultivo MRS caldo.

**Tabla 12.** Medio caldo MRS

<b>Medio de cultivo MRS</b>	<b>Cantidades</b>	<b>%</b>
Agua destilada (ml)	1000	94,8
MRS (g)	55	5,2
Total:	1055	100

Los factores y niveles en estudio para la determinación de la temperatura adecuada se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Factores en estudio en la experimentación con diferentes temperaturas

<b>FACTOR</b>	<b>NIVEL 1</b>	<b>NIVEL 2</b>	<b>NIVEL 3</b>	<b>NIVEL 4</b>	<b>NIVEL 5</b>	<b>NIVEL 6</b>
<b>A: Cepas de interés</b>	1	2	3	4	5	6
<b>D: Temperaturas</b>	15 °C	37 °C	45 °C			

La tabla 14 muestra el diseño experimental utilizado, el cual fue completamente al azar con arreglo factorial A x D, donde el factor A son las cinco cepas de interés con el testigo comercial y el factor D son los diferentes niveles de temperaturas de incubación.

**Tabla 14.** Tratamientos diferentes temperaturas

<b>N</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Cepa</b>	<b>Temperatura</b>
1	A1D1	1	15 °C
2	A1D2	1	37 °C
3	A1D3	1	45 °C
4	A2D1	2	15 °C
5	A2D2	2	37 °C
6	A2D3	2	45 °C
7	A3D1	3	15 °C
8	A3D2	3	37 °C
9	A3D3	3	45 °C
10	A4D1	4	15 °C
11	A4D2	4	37 °C
12	A4D3	4	45 °C
13	A5D1	5	15 °C
14	A5D2	5	37 °C

15	A5D3	5	45 °C
16	A6D1	6	15 °C
17	A6D2	6	37 °C
18	A6D3	6	45 °C

Tratamientos: 18

Repeticiones: 3

Total unidades experimentales: 54

La tabla 15 presenta el esquema del análisis de varianza en la determinación de la temperatura óptima de crecimiento.

**Tabla 15.** Esquema del ADEVA para las diferentes temperaturas

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	53
Tratamientos	17
Factor A	5
Factor D	2
A x D	10
Error experimental:	36

El análisis funcional se determina con:

- Coeficiente de variación (C.V).
- Para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey al 5%.
- Desviación mínima significativa (DMS) para factores.

Las variables de respuesta en la tolerancia a temperaturas son:

- Absorbancia: densidad óptica a 605nm
- Curva de crecimiento: absorbancia (605nm) vs tiempo (horas)

### 3.3.2.2 Determinación del crecimiento de la biomasa en la evaluación de la tolerancia en diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación con diferentes temperaturas de incubación

El organismo del consumidor al ingerir alimentos debe ser desdoblado por jugos gástricos, el cual tiene pH ácidos y concentraciones de sales. Por tal motivo se determina el comportamiento de las cepas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y se realiza una correlación con la temperatura de incubación, para analizar cuál de los factores no permite el crecimiento adecuado; estas cepas posiblemente pueden ser utilizadas en producción de alimentos en medios salinos y sean expuestas a diferentes tratamientos térmicos o de conservación.

La tabla 16 muestra la preparación del medio de cultivo MRS caldo con 2% de cloruro de sodio.

**Tabla 16.** Medio MRS con 2% NaCl

<b>Medio de cultivo MRS</b>	<b>Cantidades</b>	<b>%</b>
Agua destilada (ml)	1000	92,8
MRS (g)	55	5,2
% NaCl (g)	22	2
Total:	1077	100

La tabla 17 muestra la preparación del medio de cultivo MRS caldo con 4% de cloruro de sodio.

**Tabla 17.** Medio MRS con 4% NaCl

<b>Medio de cultivo MRS</b>	<b>Cantidades</b>	<b>%</b>
Agua destilada (ml)	1000	91
MRS (g)	55	5
% NaCl (g)	44	4
Total:	1099	100

La tabla 18 muestra la preparación del medio de cultivo MRS caldo con 6% de cloruro de sodio.

**Tabla 18.** Medio MRS con 6% NaCl

<b>Medio de cultivo MRS</b>	<b>Cantidades</b>	<b>%</b>
Agua destilada (ml)	1000	89.1
MRS (g)	55	4.9
% NaCl (g)	67	6
Total:	1122	100

Los factores y niveles en estudio para la determinación de la tolerancia a cloruro de sodio en correlación con las temperaturas de incubación se detallan en la tabla 19.



**Tabla 19.** Factores en estudio a diferentes temperaturas y concentraciones de NaCl

FACTOR	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3	NIVEL 4	NIVEL 5	NIVEL 6
A: Cepa de interés	1	2	3	4	5	6
D: Temperatura	15 °C	37 °C	45 °C			
E: % NaCl	2	4	6			

El diseño experimental utilizado es completamente al azar con arreglo factorial A x D x E, donde el factor A son las cinco cepas de interés con el testigo comercial, el factor D son los diferentes niveles de temperaturas y el factor E son los diferentes niveles de cloruro de sodio tratamientos mostrados en la tabla 20.

**Tabla 20.** Tratamientos a diferentes concentraciones de NaCl y temperaturas de incubación

N	Tratamiento	Cepa	Temperatura	% NaCl
1	A1D1E1	1	15 °C	2
2	A1D1E2	1	15 °C	4
3	A1D1E3	1	15 °C	6
4	A1D2E1	1	37 °C	2
5	A1D2E2	1	37 °C	4
6	A1D2E3	1	37 °C	6
7	A1D3E1	1	45 °C	2
8	A1D3E2	1	45 °C	4
9	A1D3E3	1	45 °C	6
10	A2D1E1	2	15 °C	2
11	A2D1E2	2	15 °C	4
12	A2D1E3	2	15 °C	6
13	A2D2E1	2	37 °C	2
14	A2D2E2	2	37 °C	4
15	A2D2E3	2	37 °C	6
16	A2D3E1	2	45 °C	2
17	A2D3E2	2	45 °C	4
18	A2D3E3	2	45 °C	6
19	A3D1E1	3	15 °C	2
20	A3D1E2	3	15 °C	4
21	A3D1E3	3	15 °C	6
22	A3D2E1	3	37 °C	2
23	A3D2E2	3	37 °C	4
24	A3D2E3	3	37 °C	6
25	A3D3E1	3	45 °C	2
26	A3D3E2	3	45 °C	4
27	A3D3E3	3	45 °C	6

28	A4D1E1	4	15 °C	2
29	A4D1E2	4	15 °C	4
30	A4D1E3	4	15 °C	6
31	A4D2E1	4	37 °C	2
32	A4D2E2	4	37 °C	4
33	A4D2E3	4	37 °C	6
34	A4D3E1	4	45 °C	2
35	A4D3E2	4	45 °C	4
36	A4D3E3	4	45 °C	6
37	A5D1E1	5	15 °C	2
38	A5D1E2	5	15 °C	4
39	A5D1E3	5	15 °C	6
40	A5D2E1	5	37 °C	2
41	A5D2E2	5	37 °C	4
42	A5D2E3	5	37 °C	6
43	A5D3E1	5	45 °C	2
44	A5D3E2	5	45 °C	4
45	A5D3E3	5	45 °C	6
46	A6D1E1	5	15 °C	2
47	A6D1E2	5	15 °C	4
48	A6D1E3	5	15 °C	6
49	A6D2E1	5	37 °C	2
50	A6D2E2	5	37 °C	4
51	A6D2E3	5	37 °C	6
52	A6D3E1	5	45 °C	2
53	A6D3E2	5	45 °C	4
54	A6D3E3	5	45 °C	6

Tratamientos: 54

Repeticiones: 3

Total unidades experimentales: 162

El esquema del análisis de varianza en la determinación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación con las temperaturas de incubación se observa en la tabla 21.

**Tabla 21.** Esquema del ADEVA a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y temperaturas de incubación

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	161
Factor A	5
Factor C	2
A x C	10
Factor D	2
A x D	10
C x D	4
A x C x D	20
Error experimental:	108

El análisis funcional se determina con:

- Coeficiente de variación (C.V).
- Para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó la prueba de Tukey al 5%.
- Desviación mínima significativa (DMS) para factores.

Las variables de respuesta en la tolerancia a concentraciones de cloruro de sodio son:

- Absorbancia: densidad óptica a 605nm
- Curva de crecimiento: absorbancia (605nm) vs tiempo (horas)
- Recuento de microorganismos en placa (UFC): log UFC/ml

### 3.3.3 VARIABLES EVALUADAS

En la tabla 22 se muestra todas las variables determinadas en la investigación.

**Tabla 22.** Variables evaluadas en la experimentación

Variable	Unidad	Método de ensayo	Frecuencia y aplicación
<b>Caracterización física del fruto</b>			
Tamaño	mm	Procedimiento DI-008 pie de rey	Materia prima por triplicado
Peso	g	Manual de instrucciones Balanza analítica	Materia prima por triplicado
Volumen	mm <sup>3</sup>	Cálculo	Materia prima por triplicado
Densidad	g/mm <sup>3</sup>	Cálculo	Materia prima por triplicado
<b>Caracterización química del fruto</b>			
Cenizas	%	AOAC 923.03	Materia prima por duplicado
Sólidos solubles	°Brix	AOAC 932.14C	Materia prima por triplicado
pH	-----	AOAC 981.12	Materia prima por Triplicado
Humedad	%	AOAC 925.10	Materia prima por duplicado
Acidez titulable	mg/100g	AOAC 954.07	Materia prima una vez
<b>Experimentación</b>			
	<b>Resultado</b>	<b>Método o técnica</b>	<b>Frecuencia y aplicación</b>
<b>Identificación fenotípica</b>			
Tinción Gram	+ o -	Anexo 3	Por duplicado
Actividad de catalasa	+ o -	Anexo 4	Por duplicado
Producción sulfuros, indol, movilidad	+ o -	Anexo 5	Por duplicado
Producción gas CO <sub>2</sub>	+ o -	Anexo 6	Por duplicado
<b>Evaluación de la capacidad probiótica</b>			
Tolerancia a bilis		Anexo 7	
- Curva de crecimiento	DO(605nm)	Espectrofotometría (Vishwa Vidyapeetham, 2015)	Por triplicado
- Recuento de microorganismos	UFC/ml	(Aquihuatl Ramos, et al., 2012)	Una sola siembra al final de la experimentación
Supervivencia a pH ácidos		Anexo 8	
- Recuento de microorganismos	UFC/ml	(Aquihuatl Ramos, et al., 2012)	Tres siembras a diferentes tiempos

**Evaluación del crecimiento biomasa**

Determinación de la temperatura óptima

Anexo 9

Espectrofotometría  
(Vishwa Vidyapeetham, 2015)

– Curva de crecimiento

DO(605nm)

Por triplicado

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl

Anexo 10

Espectrofotometría  
(Vishwa Vidyapeetham, 2015)

– Curva de crecimiento

DO(605nm)

Por triplicado

– Recuento de microorganismos

UFC/ml

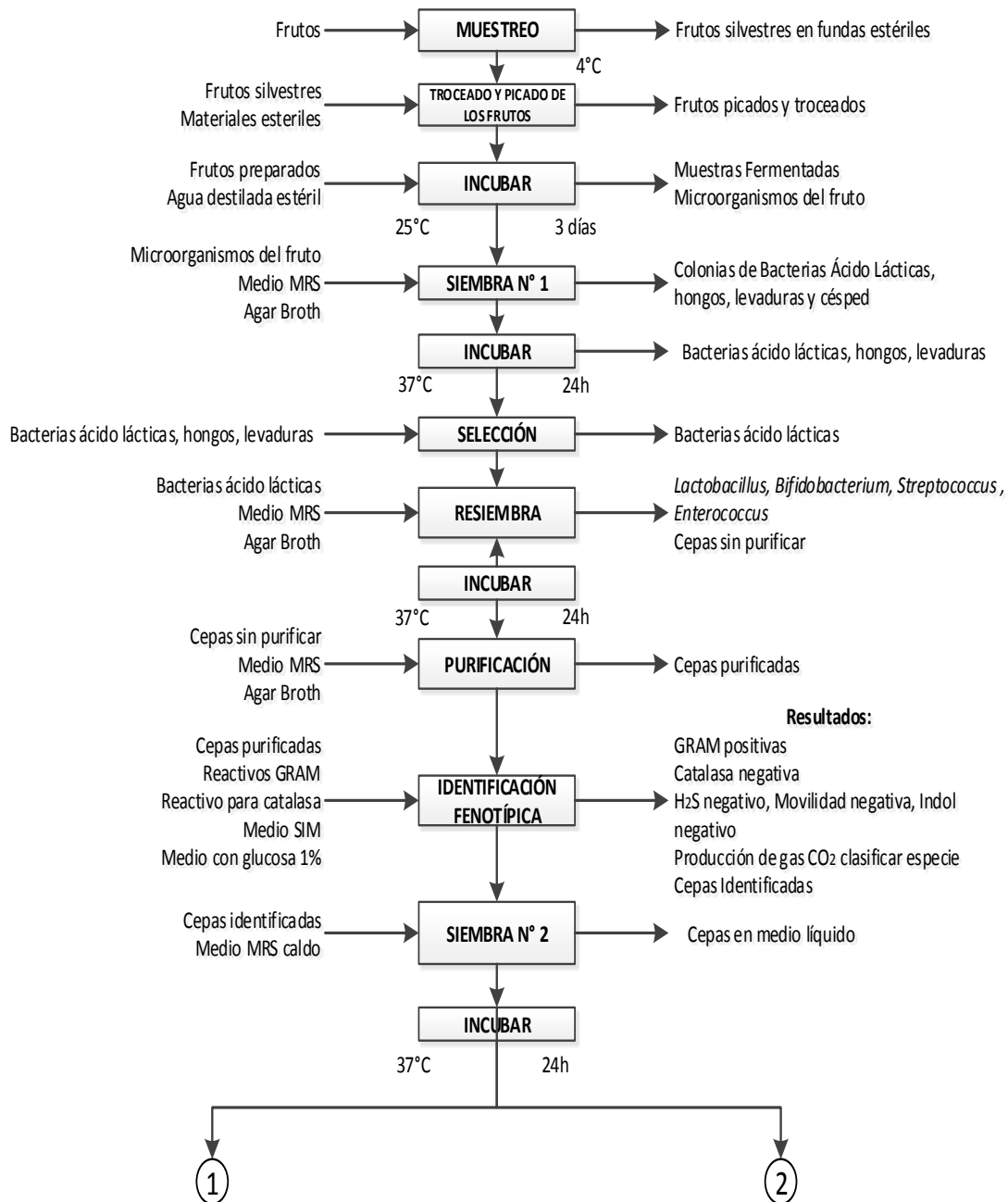
(Aquihuatl Ramos, et al., 2012)

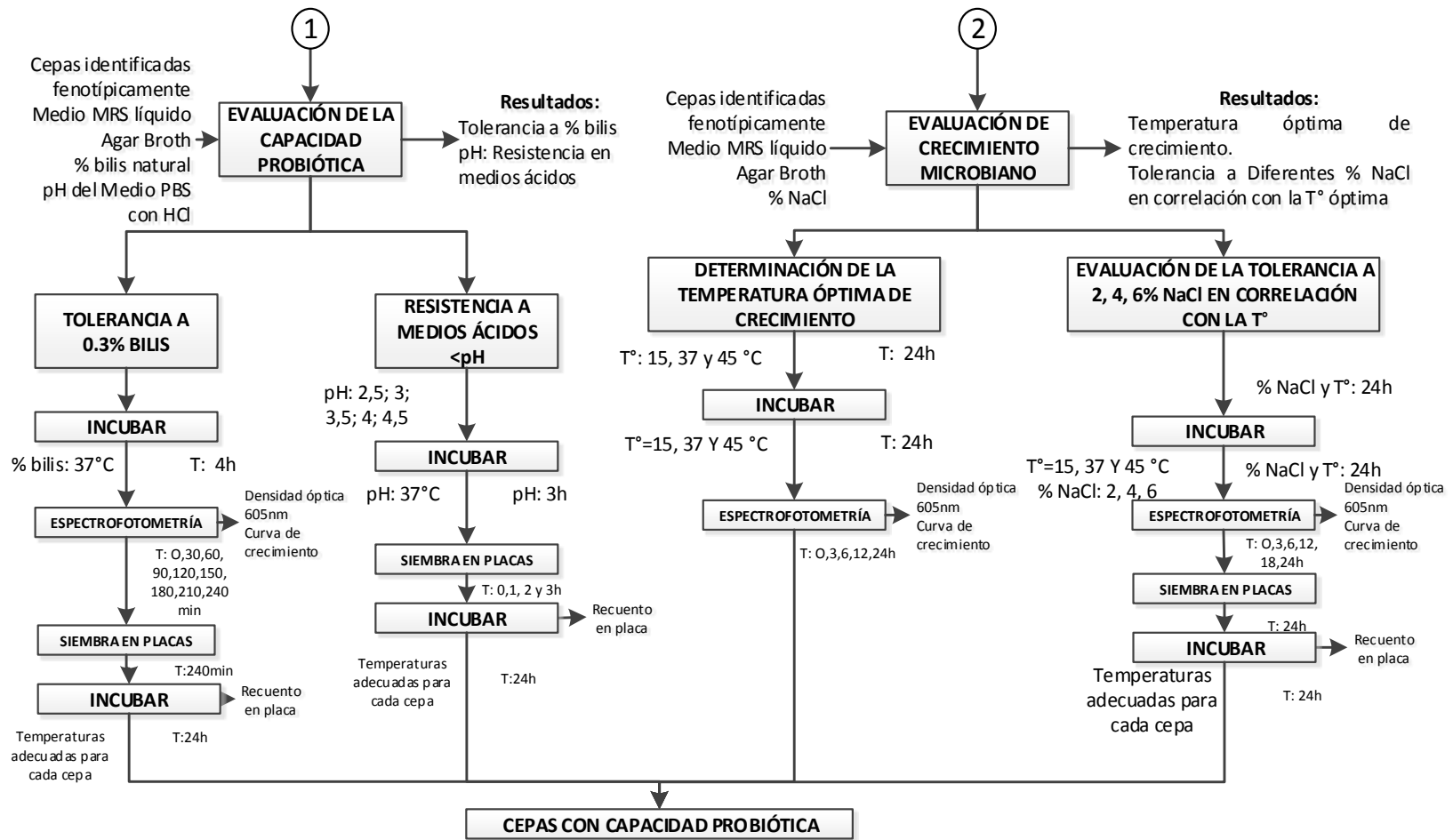
Una sola siembra al final de la experimentación

---

### 3.3.4 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Diagrama de proceso para el screening y evaluación de la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas.





### 3.3.5 DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES DEL PROCESO

#### 3.3.5.1 Recolección de frutos silvestres

El material biológico (frutos silvestres nativos) se realizó en la estación experimental la favorita. Se cortaron los frutos con ayuda de una podadora y se tomó la cantidad de fruto necesaria para la caracterización físico-química y la fermentación. Estos frutos fueron transferidos en fundas estériles membretadas y consecuentemente ubicadas en un cooler que contenía geles congelados, que ayudaron a la conservación de los frutos, evitando cambios durante su traslado para la siguiente fase de la experimentación.



Fotografía 1. Recolección de frutos.

#### 3.3.5.2 Medición de puntos GPS

Se realizó un mapa geo-referencial (Anexo 2), ubicando las coordenadas medidas en el punto de recolección de cada muestra con el GPS (Garmin Oregon 650).



Fotografía 2. Registro de coordenadas en un GPS



### 3.3.5.3 Caracterización biológica de los frutos

#### 3.3.5.3.1 Identificación taxonómica del material biológico

Se realizó la identificación de los nombres científicos de los frutos según (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balsey, 2008) y (Ceron, 2013), siendo libros y revistas de investigación realizada de frutos silvestres nativos en el Ecuador.

#### 3.3.5.3.2 Caracterización físico-química de los frutos

Se realizó de acuerdo con las normas, técnicas y cálculos como se indica en la tabla 22.

### 3.3.5.4 Fermentación

Las muestras se fermentaron luego de llegar al laboratorio en condiciones de conservación de 4 °C y sin tener contaminación alguna.

Los frutos fueron ubicados en cajas Petri procediendo a picarles o trocearles con ayuda de bisturís, cuchillas y tijeras; los frutos picados se colocaron en frascos con agua destilada estéril. Cada frasco fue etiquetado con su respectiva codificación. La fermentación se llevó a cabo por el tiempo de 72 horas a una temperatura de incubación de 25 °C, con la finalidad de mejorar la fermentación de las muestras; se las agito de forma circular tres veces al día para homogenizar el caldo de microorganismos producido.



**Fotografía 3.** Preparación del material vegetal y fermentación de los frutos

### 3.3.5.5 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

La clasificación de las cepas microbianas aisladas, se realizó mediante los métodos microbiológicos básicos.

Cultimed, (2014) indica que “todos los materiales, los medios de cultivo deben ser esterilizados por un autoclave eléctrico durante 15 minutos a 121 °C y 1 psi”; los equipos del laboratorio, de protección del personal y el área de trabajo fueron higienizados y desinfectados antes de su previa utilización. Esto ayudo a evitar contaminación en el trabajo de experimentación.

#### 3.3.5.5.1 Preparación del medio selectivo MRS

Para el medio de cultivo selectivo MRS líquido y sólido, se utilizó la técnica de preparación de medios que indica (Cultimed, 2014), dependiente de cada uno de los experimentos a realizarse.

#### 3.3.5.5.2 Aislamiento y purificación

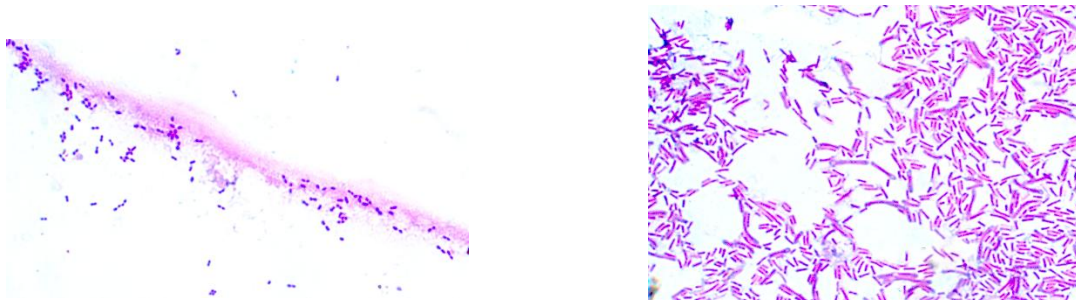
El proceso se realizó al tercer día de la fermentación de los frutos. Al tener homogenizado las muestras fermentadas se procedió a realizar la primera siembra en el medio MRS sólido. El manual de prácticas de laboratorio microbiología general de Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) indica las técnicas de purificación de bacterias.



**Fotografía 4.** Preparación de medios, selección y purificación de bacterias

### 3.3.5.6 Identificación fenotípica

La identificación fenotípica se realizó por métodos básicos, como son: tinción Gram, actividad de catalasa, producción de H<sub>2</sub>S, movilidad, producción de indol, producción de gas CO<sub>2</sub>. Las técnicas utilizadas fueron del manual de prácticas de laboratorio microbiología general de (Aquiahuatl Ramos, et al., 2012).



**Fotografía 5.** Procedimiento para la identificación fenotípica de las cepas de interés

### 3.3.5.7 Evaluación de la capacidad probiótica de las cepas seleccionadas

Se prepararon medios de control positivo, (medios de cultivo líquidos con bilis, diferentes pH, % NaCl) y medios de control negativo (sin ninguna cepa). Esto ayudo a verificar que no se laboraba con medios de cultivos contaminados en los experimentos, aportando en la eficiencia de las prácticas realizadas en la esterilización y manipuleo de todo lo utilizado en las diferentes experimentaciones.

Otro control positivo fue el utilizar un probiótico comercial. Ayudando a evaluar y comparar en las diferentes experimentaciones.

Al obtener resultados positivos de la identificación fenotípica se procedió a realizar siembras en MRS caldo, siendo incubadas a 37 °C durante 24 horas, para la conservación de las cepas aisladas (resiembra); al igual que se conservó en medio de cultivo solido MRS con agar; dando paso a los métodos bioquímicos para determinar la capacidad probiótica de las cepas, como son: tolerancia a concentraciones de sales biliares y la tolerancia a pH ácidos.

#### 3.3.5.7.1 Tolerancia a bilis

La evaluación de la tolerancia en presencia de bilis se realizó con un protocolo adecuado o modificado de las experimentaciones de (Pedersen, Jonsson, Lindberg, & Roos, 2004); (Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, 2013) y (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, 2012).



**Fotografía 6.** Procedimiento para la evaluación de la tolerancia a bilis *in vitro*

#### 3.3.5.7.2 Tolerancia a diferentes pH ácidos

Las guías o protocolos de (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo 2012); (Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, 2013) y de (Victoria-León, Totosaus, Guerrero, & Pérez-Chabela, 2006) fueron adecuados para realizar la experimentación.







**Fotografía 7.** Procedimiento para la determinación de supervivencia a pH ácidos *in vitro*

### **3.3.5.8 Caracterización bioquímica en relación con el crecimiento microbiano**

Al obtener resultados en la determinación de la capacidad probiótica, se procedió a determinar la capacidad de producción de biomasa a todas las cepas de estudio, sometiendo a pruebas físico químicas como son: Tolerancia a temperaturas y tolerancia a cloruro de sodio.

#### **3.3.5.8.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias seleccionadas**

El protocolo utilizados para la experimentación fue el de (Powthong & Suntornthiticharoen, 2013); siendo las temperaturas utilizadas de 15°, 37°, 45 °C.



**Fotografía 8.** Temperatura adecuada de crecimiento

### 3.3.5.8.2 Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con las temperatura de incubación

El protocolo utilizado fue el de (Powthong & Suntornthiticharoen, 2013) siendo las concentraciones de cloruro de sodio de 2, 4, 6 % y presentando combinaciones con las temperaturas de incubación a 15°, 37°, 45 °C.



**Fotografía 9.** Procedimiento para la evaluación del crecimiento de BAL en concentraciones de NaCl y diferentes temperaturas *in vitro*

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 VARIABLES CUANTITATIVAS EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE CEPAS CON POSIBLE CAPACIDAD PROBIÓTICA

##### 4.1.1 CODIFICACIÓN DE LOS FRUTOS Y BACTERIAS

Inicialmente se muestra los nombres científicos de los frutos y a las bacterias seleccionadas se las designo un código mostrándose en la tabla 23. Ayudando a identificar a las bacterias en estudio de manera menos confusa en todos los datos obtenidos.

**Tabla 23.** Codificación de las bacterias e identificación de los frutos

N	Nombre del Fruto	Código UTN	Bacteria	Código Cepa para este trabajo
1	Probiótico comercial	LACT	<i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>L. delbrueckii</i>	Cepa N1
2	<i>Cherry; Sacha Tarqui.</i>	UTNFa37	BAL	Cepa N2
3	<i>Hamelia axillaris Sw.</i>	UTNFa38	BAL	Cepa N3
4	<i>Cordia cylindrostachya.</i>	UTNFa39	BAL	Cepa N4
5	<i>Bactris gasipaes Kunth.</i>	UTNFa40	BAL	Cepa N5
6	<i>Solanum quitoense Lam.</i>	UTNFa41	BAL	Cepa N6

#### 4.1.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS FRUTOS

La tabla 24 muestra los resultados de las variables físicas medidas.

**Tabla 24.** Caracterización Física de los frutos

	<b>FRUTO 1</b>	<b>FRUTO 2</b>	<b>FRUTO 3</b>	<b>FRUTO 4</b>	<b>FRUTO 5</b>	<b>Unidades</b>
DENSIDAD	1.108	1.134	0.766	1.342	1.172	g/mm3
VOLUMEN	0.212	1.232	0.848	1.066	64.493	mm3
PESO	0.235	1.392	0.649	1.426	75.112	g
TAMAÑO	0.740	1.323	1.173	1.267	4.973	cm

La caracterización física de los frutos indica que son cuatro frutos pequeños y uno grande. Su peso es muy diferencial, todos los frutos presentan diferentes densidad y volumen.

#### 4.1.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS FRUTOS

Se determinó las diferentes variables químicas de los frutos como se indica en la tabla 25.

**Tabla 25.** Caracterización Química de los frutos

	<b>%S. Totales</b>	<b>%Humedad</b>	<b>%Ceniza</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>% Acidez</b>
<b>FRUTO 1</b>	5.3478	94.6522	0.7489	6.097	1.000	0.085
<b>FRUTO 2</b>	14.1241	85.8759	0.6130	5.127	10.667	0.213
<b>FRUTO 3</b>	9.1259	90.8741	1.0086	5.583	5.583	0.406
<b>FRUTO 4</b>	55.1724	44.8276	1.1915	5.847	13.333	0.704
<b>FRUTO 5</b>	14.4552	85.5448	0.4661	3.543	8.500	2.284

Las características químicas de interés en los frutos fueron la acidez y los sólidos solubles, debido que a mayor acidez las bacterias aisladas de estos frutos resistirán a altos pH, mientras que los grados brix o sólidos solubles indica que puede generar una mejor fermentación ya que son indicadores de obtención de un producto final como ácido láctico.

#### 4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS

En la tabla 26 se presenta la identificación de cada una de las bacterias fenotípicamente, dando como resultados favorables a las diferentes pruebas de caracterización.



**Tabla 26.** Características de las bacteria ácido lácticas aislados de frutos silvestres nativos

N	Nombre del Fruto	Código	Gram	Catalasa	SIM	CO2	Bacteria	Especie
1	<i>Cherry; Sacha Tarqui.</i>	UTNFa37	+	-	-	+	bacilos	<i>Lactobacillus heteroferment</i>
2	<i>Hamelia axillaris Sw.</i>	UTNFa38	+	-	-	+	cocos-cadena	<i>Lactococcus sp</i>
3	<i>Cordia cylindrostachya.</i>	UTNFa39	+	-	-	+	cocos-cadena	<i>Lactococcus sp</i>
4	<i>Bactris gasipaes Kunth.</i>	UTNFa40	+	-	-	+	cocos-cadena	<i>Lactococcus sp</i>
5	<i>Solanum quitoense Lam.</i>	UTNFa41	+	-	-	+	cocos-cadena	<i>Lactococcus sp</i>
6	Probiótico comercial	LACT	+	-	-	+	mix de bacilos y cocos-cadena	<i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>L. delbrueckii</i>

Aquihuatl Ramos, et al., (2012) mantiene que “las bacterias ácido lácticas deben ser Gram positivas, catalasa negativa, SIM negativo como las pruebas con mayor relevancia”. Esto ayudo a identificar a las bacterias siendo seleccionadas y caracterizadas. La prueba de producción de CO<sub>2</sub> ayudo a clasificarlas en la especie de bacteria láctica.

## 4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA

### 4.3.1 TOLERANCIA A BILIS

La tabla 27 presenta los datos medidas en una absorbancia a una longitud de onda a 605 nm, para determinar la tolerancia en bilis.

**Tabla 27.** Datos de la medición de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo

Cepa	%bilis	Repeticiones al final de la experimentación (4h)			Sumatoria	Media
		I DO 605 nm	II DO 605 nm	III DO 605 nm		
LACT	0.3	2.059	2.058	2.060	6.177	2.059
UTNFa37	0.3	1.158	1.157	1.160	3.475	1.158
UTNFa38	0.3	1.950	1.952	1.952	5.854	1.951
UTNFa39	0.3	0.422	0.420	0.424	1.266	0.422
UTNFa40	0.3	1.978	1.981	1.983	5.942	1.981
UTNFa41	0.3	1.934	1.936	1.935	5.805	1.935
Sumatoria		9.502	9.505	9.515	28.521	1.585

La tabla 28 presenta el Análisis de Varianza para la tolerancia a 0.3% de Bilis.

**Tabla 28.** ADEVA de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	F. tabulares		
					0.05	0.01	
F de V	gl	SC	CM	Fc			
SCT=	17	6.518					
SCT=	5	6.518	1.304	488821.371	3.11	5.06	**
SCEExp=	12	0.000	2.667E-06				

Coefficiente de variación:

CV= 0.103%

Desviación estándar:

S= 0.619

\*\* : Altamente significativo

El análisis de varianza indica que existe alta significación estadística para los tratamientos, esto demuestra que las seis cepas al incubar a 37 °C en un medio de caldo MRS y 0.3% de bilis durante las cuatro horas, presenta un crecimiento diferente pero todas poseen resistencia a bilis.

El coeficiente de variación fue de 0.103% con promedio de crecimiento bacteriano de 1.585 densidad óptica a 605 nm. Se obtuvo la desviación estándar la cual nos indica que los datos se encuentran alejados de la media, siendo un valor alto debido a que no creció la bacteria UTNFa39 a estas condiciones.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para tratamientos como se indica en la tabla 29.

### 4.3.1.1 Análisis estadístico

**Tabla 29.** Prueba de Tukey al 5% para tratamientos de la variable densidad óptica a 605 nm de la tolerancia a bilis

---

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00448  
Error: 0.0000 gl: 12

Cepas	Medias	n	E.E.	
LACT	2.06	3	9.4E-04	A
UTN Fa 40	1.98	3	9.4E-04	B
UTN Fa 38	1.95	3	9.4E-04	C
UTN Fa 41	1.94	3	9.4E-04	D
UTN Fa 37	1.16	3	9.4E-04	E
UTN Fa 39	0.42	3	9.4E-04	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

Realizada la prueba de Tukey se puede observar que existen seis rangos diferentes “a”, “b”, “c”, “d”, “e” y “f” para la variable densidad óptica a 605 nm en la tolerancia a bilis. En donde las medias han sido ordenadas de mayor a menor.

Como manifiestan Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, (2012) “la resistencia a sales biliares es un mecanismo que implica proteínas de membrana unidos a ATP, lo cual permite de manera eficiente el transporte en ácidos biliares. Otro mecanismo por el cual las cepas son resistentes a las altas concentraciones de sales biliares es la acumulación de polioles y glicerol como elementos para regular la presión osmótica de las células con el ambiente externo”.

De acuerdo a la investigación se ordena a las cepas UTNFa40, UTNFa38, UTNFa41, UTNFa37 y UTNFa39 de forma descendente; determinándose que todas las bacterias son diferentes al crecimiento en las condiciones de 0.3% de bilis y 37 °C, mientras que el probiótico comercial que se encuentra en el rango “a” por tener mayor biomasa en el medio con bilis, ayudó en la comparación con las cepas de interés.

### 4.3.1.2 Recuento de colonias de bacterias vivas después de cuatro horas de incubación

La tabla 30 presenta la determinación de células que sobrevivieron a la concentración de bilis al final de la experimentación.

**Tabla 30.** Recuento de unidades formadoras de colonias log UFC/ml de muestra

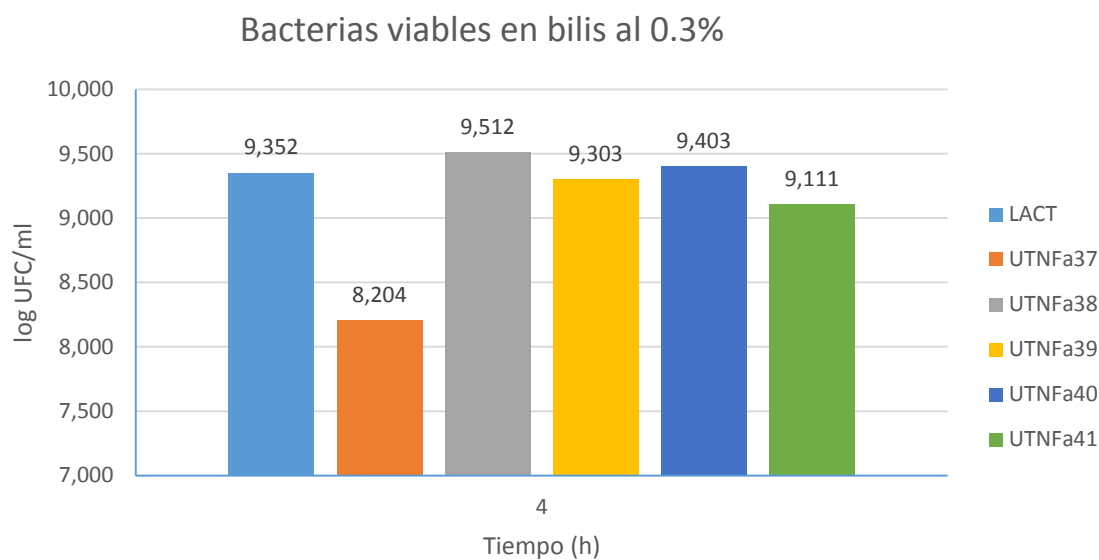
CEPA	en 100 $\mu$ l	en 1 ml	en 5 ml
LACT	8.352	9.352	10.051
UTNFa37	7.204	8.204	8.903
UTNFa38	8.512	9.512	10.211
UTNFa39	8.303	9.303	10.002
UTNFa40	8.403	9.403	10.102
UTNFa41	8.111	9.111	9.810

Desviación estándar:

S= 0.481

Media:

X= 9.148



**Gráfico 7.** Cálculo de microorganismos vivos en 1 ml de muestra con 0.3% de bilis

Con la finalidad de determinar el número de bacterias que sobreviven al final del experimento, se realizó un recuento en placas y se expresó como log UFC/ml de muestra, resultando con mayor población la bacteria UTNFa38. En el gráfico 7 se observa la biomasa de las bacterias vivas que toleran la bilis con una media de  $9.148 \pm 0.481$  log UFC/ml, también se aprecia que la biomasa generada por las cinco bacterias de interés es similar a la biomasa del probiótico comercial.

Al respecto, Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) manifiestan que “la tolerancia a sales biliares es vital en las bacterias para sobrevivir y crecer en el tracto gastrointestinal, por lo que es requisito principal para las bacterias que se considerarán probióticos”.

#### 4.3.1.3 Curvas de crecimiento en presencia de bilis

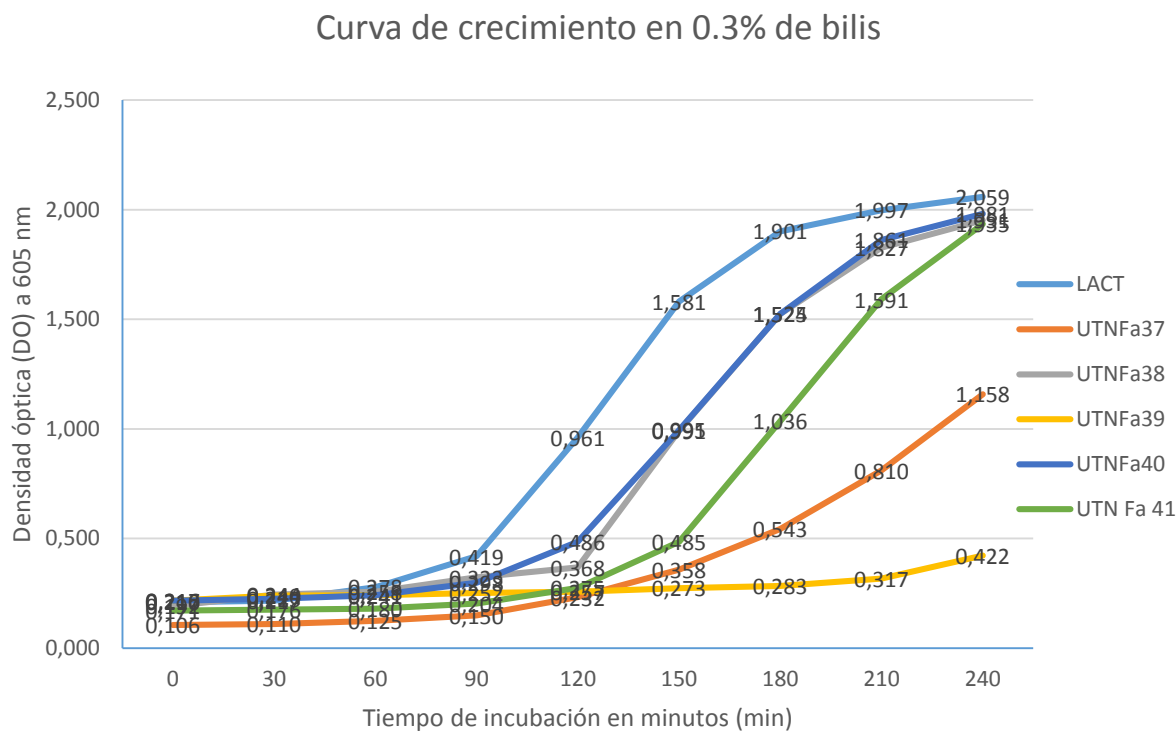
La tabla de datos para los gráficos de crecimiento se observa en el Anexo 12. El cálculo de la media y la desviación estándar en los determinados rangos de tiempo, se aprecia en la tabla 31.

**Tabla 31.** La media y la desviación estándar de las bacterias en 0.3% de bilis a 605 nm de absorbancia (DO)

Tiempo (min)	Media	S=
0	0.185	0.040
30	0.202	0.050
60	0.221	0.055
90	0.274	0.091
120	0.430	0.263
150	0.781	0.472
180	1.136	0.591
210	1.401	0.639
240	1.585	0.619

La tabla 31 indica que las seis bacterias al ser cultivadas en medio con 0.3% de bilis, por un tiempo de cuatro horas a 37 °C crecieron y por ende aumentaron su biomasa, por lo que se calculó la media y la desviación estándar para todas las cepas en los lapsos de tiempo establecidos. Determinándose que las desviaciones son similares al no alejarse mucho de las medias, indicando paralelismo en el crecimiento de todas las bacterias hasta el tiempo de 150 minutos; luego las bacterias crecen de manera diferente ya que la desviación estándar indica que está muy alejada de las medias.

#### 4.3.1.4 Gráfica de la tolerancia a bilis.



**Gráfico 8.** Efecto de la bilis sobre el crecimiento bacteriano

De acuerdo a lo que sostiene Iranmanesh, et al., (2012) que “el desafío para los posibles probióticos sobrevivientes en el tracto gastrointestinal es exposición a las sales biliare en la parte superior del intestino delgado. Siendo la concentración de la bilis humana de 0.3% a 0.5%, sin embargo 0.3% se considera una concentración crítica para identificar cepas de bacterias resistentes”.

En el gráfico 8 se observa las curvas de crecimiento de las bacterias en medio caldo MRS con 0.3% de bilis y la temperatura de incubación de 37 °C que permaneció constante, se aprecia la fase de latencia para todas las BAL que perdura hasta los 90 minutos e inician su crecimiento de forma acelerada presentándose en la fase exponencial que dura hasta el final de la experimentación. Determinándose que el probiótico comercial presentó mayor producción de biomasa 2.059 de DO a 605 nm en el menor tiempo, mientras que las cepas en estudio UTNFa40, UTNFa38 y UTNFa41 presentan un crecimiento lento hasta el final de la incubación. Las cepas

UTNFa37 y UTNFa39, presentan una producción de biomasa muy leve y están muy alejadas de la biomasa del testigo. Todas las cepas en estudio toleran a esta concentración de bilis viéndose reflejada en la producción de biomasa de cada una de las BAL.

#### 4.3.2 SUPERVIVENCIA A MEDIOS ÁCIDOS (pH ÁCIDOS)

La variable para determinar la supervivencia en medios ácidos se realizó mediante recuento en placas, siendo la unidad de medida (log UFC/ml), se inoculó la cantidad 100 µl en cada una de las cajas Petri en los diferentes tiempos de experimentación y diferentes diluciones; los valores se detallan en el Anexo 13. La tabla 32 presenta el cálculo de la desviación estándar y la media de las cepas en los determinados pH ácidos, mientras que el análisis de varianza se presenta en la tabla 33.

**Tabla 32.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes pH ácidos a la tercera hora de incubación

pH	Media	S=
2.5	2.231	0.674
3.0	6.365	0.403
3.5	7.636	0.247
4.0	7.831	0.085
4.5	7.858	0.267

Se observa en la tabla 32, que al calcular las desviaciones estándar y las medias a pH de 2.5; la desviación está muy alejada de la media, debido a que la viabilidad de las cepas disminuye por la alta concentración de HCl en el cultivo. En los pH de 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 la desviación no se aleja mucho de las medias ya que se tiene valores altos de biomasa viva a estas condiciones verificando que existe resistencia por parte de las cepas a medios ácidos.

**Tabla 33.** ADEVA de las log UFC/ml sobrevivientes a medios ácidos al final del experimento

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	F. tabulares		
					0.05	0.01	Significancia
F de V	gl	SC	CM	Fc			
SCT=	89	428.38					
SCt=	29	428.27	14.77	8298.37	1.65	2.03	**
SCA=	5	4.07	0.81	457.68	2.37	3.34	**
SCC=	4	415.52	103.88	58372.09	2.53	3.65	**
SCA * C=	20	8.68	0.43	243.80	1.75	2.20	**
SCEExp=	60	0.11	0.0018				

Coefficiente de variación:

CV= 1 %

\*\* : Altamente significativo

El análisis de varianza muestra la significación estadística para: tratamientos, factor A (cepas), factor C (pH ácidos) e interacción (A x C). Al existir significación estadística se realizó las pruebas correspondientes: Tukey para tratamientos y la desviación mínima significativa (DMS) para factores.

El coeficiente de variación fue de 1 % con una población promedio de 6.385 log UFC/ml.



### 4.3.2.1 Análisis estadístico

**Tabla 34.** Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable recuento de supervivencia en medios ácidos log UFC/ml.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.13557  
 Error: 0.0018 gl: 60

Cepas	pH	Medias	n	E.E.	
UTNFa38	4.50	8.14	3	0.02	A
UTNFa37	4.50	8.11	3	0.02	A
LACT	4.50	8.09	3	0.02	A
UTNFa37	4.00	7.94	3	0.02	B
UTNFa41	4.00	7.93	3	0.02	B
UTNFa39	4.00	7.84	3	0.02	B C
UTNFa39	3.50	7.81	3	0.02	B C D
UTNFa38	4.00	7.81	3	0.02	B C D
UTNFa40	4.00	7.75	3	0.02	C D
UTNFa37	3.50	7.74	3	0.02	C D
UTNFa40	3.50	7.74	3	0.02	C D
LACT	4.00	7.72	3	0.02	C D
LACT	3.50	7.72	3	0.02	C D
UTNFa40	4.50	7.70	3	0.02	D
UTNFa41	3.50	7.70	3	0.02	D
UTNFa39	4.50	7.56	3	0.02	E
UTNFa41	4.50	7.54	3	0.02	E
UTNFa38	3.50	7.11	3	0.02	F
UTNFa37	3.00	6.97	3	0.02	G
LACT	3.00	6.73	3	0.02	H
UTNFa40	3.00	6.33	3	0.02	I
UTNFa39	3.00	6.32	3	0.02	I
UTNFa38	3.00	5.99	3	0.02	J
UTNFa41	3.00	5.84	3	0.02	K
UTNFa37	2.50	3.23	3	0.02	L
UTNFa40	2.50	2.92	3	0.02	M
UTNFa38	2.50	2.24	3	0.02	N
UTNFa41	2.50	1.92	3	0.02	O
LACT	2.50	1.62	3	0.02	P
UTNFa39	2.50	1.46	3	0.02	Q

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En la tabla 34 se presenta los resultados de la prueba de Tukey donde se obtuvo 17 rangos y están ordenados de forma descendente, la población que sobrevivió al medio ácido. La mejor cepa fue UTNFa37 en pH de 2.5, en pH 3.0 fue UTNFa37, en pH 3.5 fue UTNFa39, en 4.0 pH fue UTNFa37 y en pH 4.5 fue UTNFa38. Obteniendo como la mejor cepa a UTNFa37 ya que tiene mayor población sobrevivientes en los distintos medios ácidos. Al respecto, Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) mantienen que “la tolerancia a niveles de pH bajos es vital para las bacterias para sobrevivir en el tracto gastrointestinal, por lo que es el requisitos principal para las bacterias que se considerarán probiótico”.

**Tabla 35.** Prueba de significación DMS para el factor A (cepas)

---

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04535  
Error: 0.0018 gl: 60

Cepas	Medias	n	E.E.	
UTNFa37	6.80	15	0.01	A
UTNFa40	6.49	15	0.01	B
LACT	6.38	15	0.01	C
UTNFa38	6.26	15	0.01	D
UTNFa39	6.20	15	0.01	E
UTNFa41	6.19	15	0.01	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

La tabla 35 presenta los resultados de la prueba de DMS, donde se obtuvo cinco rangos para el factor A (diferentes cepas), las especies tienen comportamiento dependiente. Las cepas UTNFa39 y UTNFa41 son estadísticamente iguales indicándonos las poblaciones más bajas, mientras que las cepas UTNFa40, LACT y UTNFa38 presentan una mayor sobrevivencia. Determinándose la mejor cepa con mayor población a UTNFa37, siendo su población mayor comparada con el probiótico comercial.

De acuerdo a lo que sostiene Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, (2012) “la tolerancia a pH puede ser debido a dos tipos de cationes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que se encuentra en la membrana plasmática y en el compartimento pre-vacuolar endosomal. Estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) y  $\text{H}^+$  a través de las membranas, de modo que regulan las concentraciones de cationes y pH en orgánulos citoplasmáticos y estabilizar a los niveles medios”.

Los mismos autores mencionan que “otro posible mecanismo de regulación es una ATPasa localizada en la membrana citoplasmática; se puede crear una gradiente de protones electroquímicos que conduce a la de transporte secundario de solutos y que está implicado en mantener estrecha pH a neutro”.

**Tabla 36.** Prueba de significación DMS para el factor C (pH ácidos)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03955  
Error: 0.0018 gl: 60

pH	Medias	n	E.E.	
4.50	7.86	18	0.01	A
4.00	7.83	18	0.01	A
3.50	7.64	18	0.01	B
3.00	6.37	18	0.01	C
2.50	2.23	18	0.01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Según los resultados de la tabla 36, se establece cuatro rangos: “a”, “b”, “c”, y “d” para el factor C (pH ácidos) en función de la variable log UFC/ml durante el tiempo de incubación sobreviviendo al medio ácido. En donde el nivel de los medios ácidos de 4.0 y 4.5 son estadísticamente iguales en supervivencia, pero en medios más ácidos como es en 2.5, 3.0 y 3.5 son diferentes la supervivencia por el motivo de ser aún más ácido el cultivo y tienen a disminuir la población. Determinándose que las cepas se adaptan, resisten y sobreviven a medios ácidos.

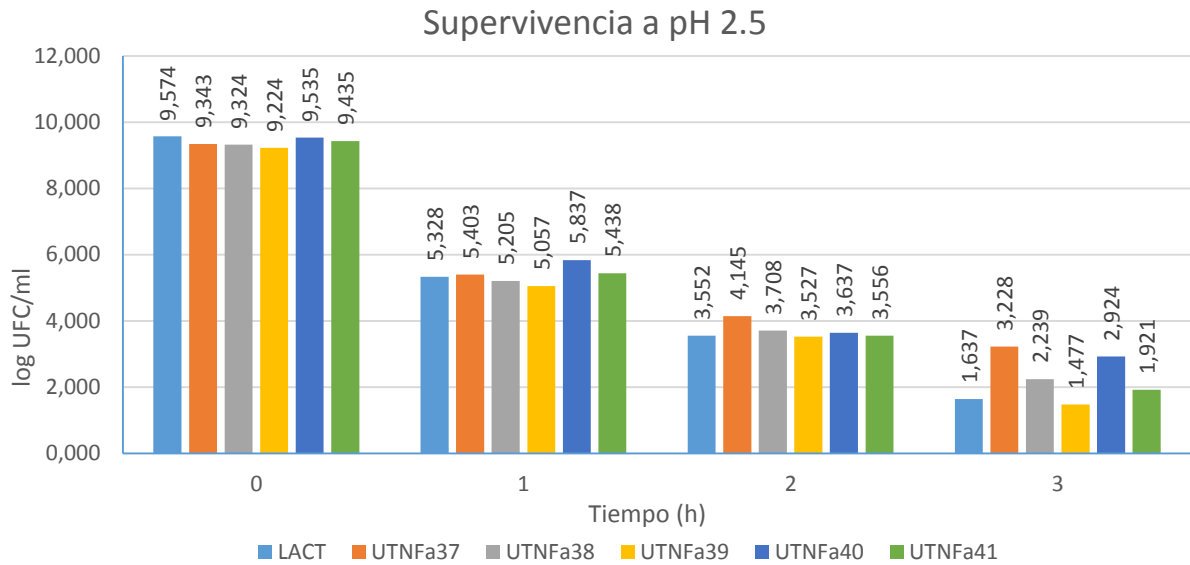
Según Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) “las bacterias son generalmente sensibles a bajos valores de pH en el estómago, sin embargo, algunas bacterias ácido lácticas pueden sobrevivir y crecer a pH relativamente bajo porque tienen un sistema que transporta simultáneamente ácido láctico y protones para el exterior de la célula.

#### 4.3.2.2 Gráficas de supervivencia en pH ácidos

La tabla de los datos se detalla en el Anexo 14 y se calculó la desviación estándar para las cepas en los determinados pH ácidos y rangos de tiempo definiéndose mostrándose en la tabla 37.

**Tabla 37.** La media y la desviación estándar registrada a diferentes pH ácidos en los tiempos indicados

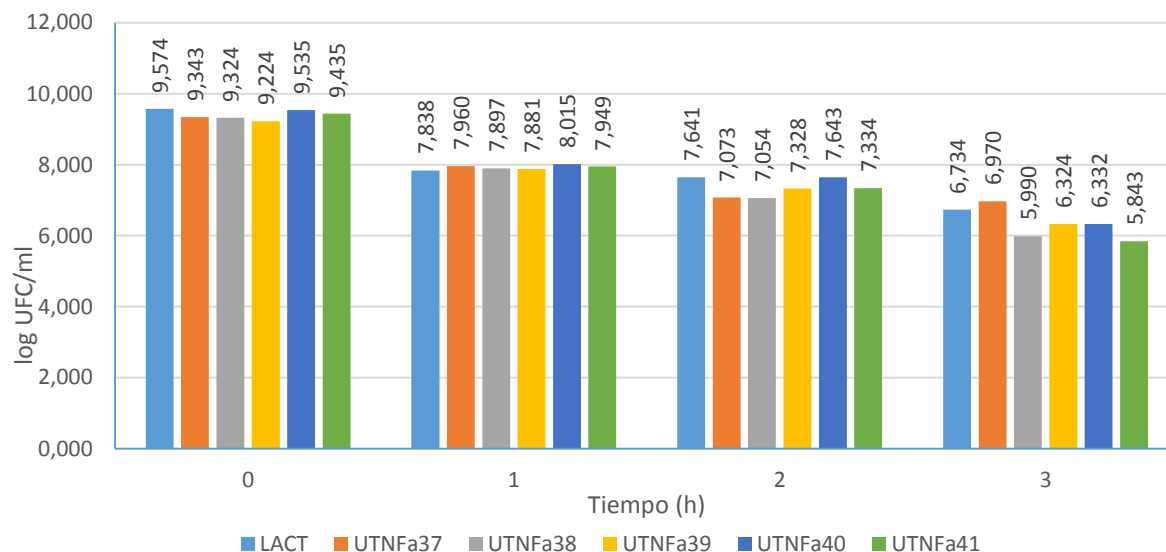
Tiempo	2.5		3.0		3.5		4.0		4.5	
Horas (h)	Media	S=	Media	S=	Media	S=	Media	S=	Media	S=
0	9.406	0.134	9.406	0.134	9.406	0.134	9.406	0.134	9.406	0.134
1	5.378	0.265	7.923	0.064	8.055	0.075	8.142	0.073	8.377	0.123
2	3.688	0.234	7.346	0.259	7.934	0.078	8.014	0.060	8.118	0.116
3	2.238	0.706	6.365	0.429	7.636	0.262	7.831	0.091	7.859	0.284



**Gráfico 9.** Viabilidad de BAL en pH 2.5 después de 3 horas de incubación

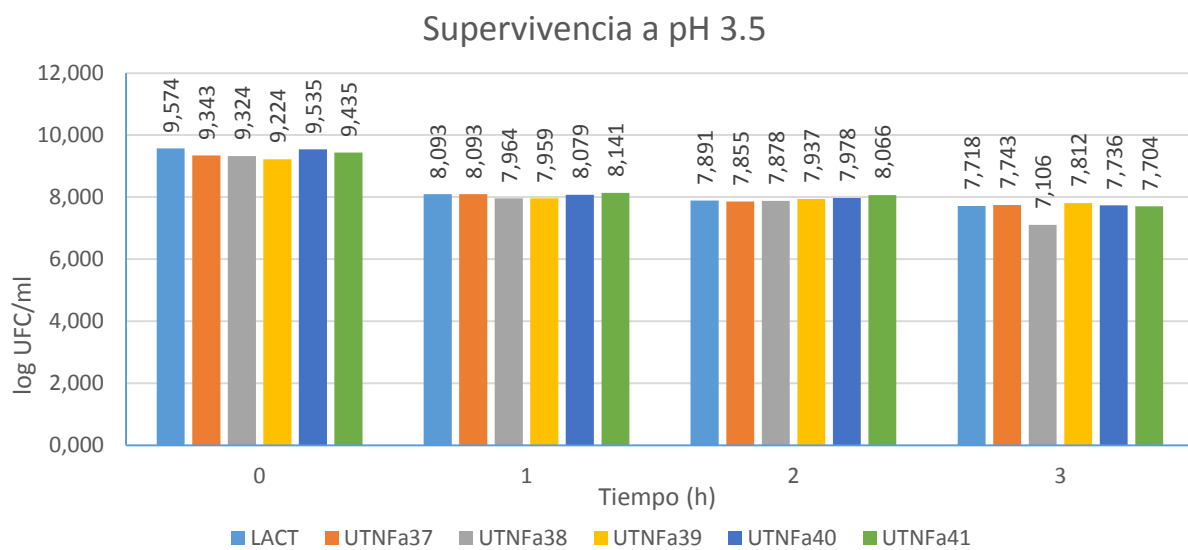
En el gráfico 9 se presenta los resultados en relación al pH 2.5 la viabilidad de las cepas disminuye debido al alto contenido de HCl en el medio de cultivo. Se inicia con una población de  $9.406 \pm 0.134$  log UFC/ml, a la primera hora de exposición a esta condición se presenta un valor de  $5.378 \pm 0.265$  log UFC/ml, lo que representa estabilidad en la resistencia de las BAL. A la segunda hora el declive es mayor indica la media de  $3.688 \pm 0.234$  log UFC/ml, mientras que a la tercera hora la media es de  $2.238 \pm 0.706$  log UFC/ml, esto indica que las bacterias perdieron estabilidad; llegando así a determinar la supervivencia de las bacterias y considerando como mejor cepa UTN Fa37 que comparada con la cepa comercial LACT tiene una supervivencia mayor a este pH.

### Supervivencia a pH 3.0



**Gráfico 10.** Viabilidad de BAL en pH 3.0 después de 3 horas de incubación

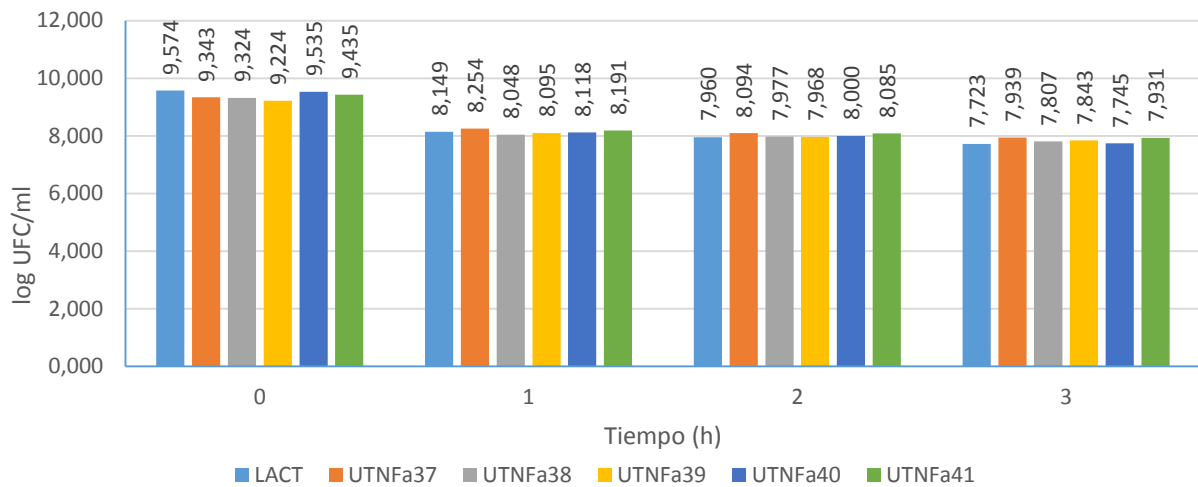
El gráfico 10 presenta la viabilidad de las bacterias ácido lácticas a pH 3.0. Se inicia con una población promedio de  $9.046 \pm 0.134$  log UFC/ml, la supervivencia de las bacterias a la primera hora tiene un valor de  $7.923 \pm 0.064$  log UFC/ml, observándose una disminución de la población de las bacterias. Después de dos horas de incubación la viabilidad disminuye hasta  $7.346 \pm 0.259$  log UFC/ml, mientras que a la tercera hora las cepas tienen una población de  $6.365 \pm 0.429$  log UFC/ml, lo que indica que las bacterias perdieron viabilidad, observándose que la bacteria UTN Fa37 muestra mayor supervivencia a esta condición y es similar al comportamiento de la cepa comercial LACT.



**Gráfico 11.** Viabilidad de BAL en pH 3.5 después de 3 horas de incubación

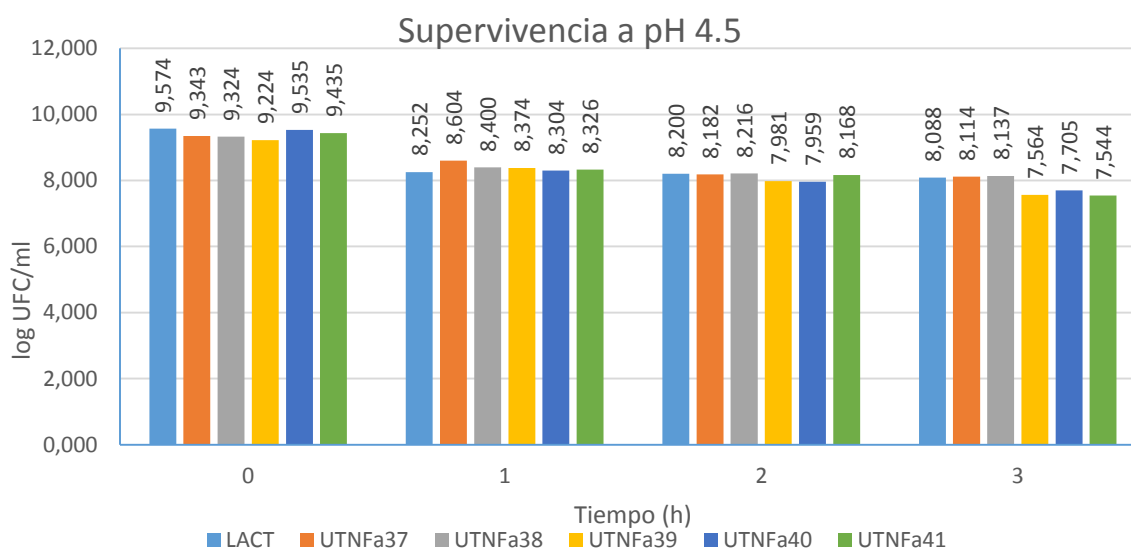
El gráfico 11 muestra la viabilidad de las bacterias ácido lácticas a pH 3.5. Se inicia con una población promedio de  $9.406 \pm 0.134$  log UFC/ml, a la primera hora de incubación la viabilidad de las cepas disminuye registrando un valor de  $8.055 \pm 0.075$  log UFC/ml y no se registra una disminución significativa después de 2 y 3 horas de incubación demostrando que las cepas sobreviven a este rango de pH. La mejor cepa a pH 3.5 es UTN Fa39 comparada con la cepa comercial LACT que tiene una tendencia similar en la disminución de la población con respecto al tiempo.

### Supervivencia a pH 4.0



**Gráfico 12.** Viabilidad de BAL en pH 4.0 después de 3 horas de incubación

El gráfico 12 presenta que a pH 4.0 la viabilidad de las cepas disminuye, observándose que se inicia con una población promedio de  $9.406 \pm 0.134$  log UFC/ml, a la primera hora de exposición a esta condición se tiene una población media de  $8.142 \pm 0.073$  log UFC/ml. Después de dos horas la población tiene una media de  $8.014 \pm 0.060$  log UFC/ml, mientras que a las tres horas las cepas tienen a encontrarse con una población media de  $7.831 \pm 0.091$  log UFC/ml, indicando que las bacterias son muy resistentes a este pH ya que la media al final de las tres horas no presenta una disminución significativa comparada con la inicial. La mejor cepa a pH 4.0 es UTN Fa37 comparada con la cepa comercial LACT que tiene una tendencia similar en la disminución de la población con respecto al tiempo.



**Gráfico 13.** Viabilidad de BAL en pH 4.5 después de 3 horas de incubación

El gráfico 13 presenta la viabilidad de las bacterias ácido lácticas a pH 4.5. la población de las bacterias al inicio fue de  $9.406 \pm 0.134$  log UFC/ml, a la primera hora de incubación se aprecia una disminución leve respecto de la media inicial con un valor de  $8.377 \pm 0.123$  log UFC/ml. Después de dos horas la población disminuye a una media de  $8.118 \pm 0.116$  log UFC/ml, observándose que la variación respecto a la media inicial no es significativa. Mientras que a la tercera hora la población da una media de  $7.859 \pm 0.284$  log UFC/ml, indicando que las bacterias se adaptan al medio, resisten y sobreviven a este pH. Siendo la mejor cepa a pH 4.5 UTN Fa37 comparada con la cepa comercial LACT que tiene una tendencia similar en la disminución de la población con respecto al tiempo.

#### 4.3.3 CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN

La tabla de los datos obtenidos para el análisis de varianza, se detalla en el Anexo 16; de manera que se calculó la desviación estándar y las medias en las diferentes temperaturas de incubación, al periodo de 24 horas mostrándose en la tabla 38.

**Tabla 38.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes temperaturas de incubación

Temperaturas	Media	S=
15 °C	1.857	0.329
37 °C	1.918	0.213
45 °C	1.405	0.534



En la tabla 38 se determinó que las seis bacterias al ser incubadas a diferentes temperaturas si presentaron crecimiento y producción de biomasa. Por lo que se calculó la media y la desviación estándar para todas las cepas en el lapso de las 24 horas de incubación, determinándose que la mejor temperatura de incubación es la de 37 °C, registrándose una densidad óptica de  $1.918 \pm 0.213$ . En la temperatura de 15 °C, se registró un valor de  $1.857 \pm 0.329$  de DO a 605 nm, que demuestra que las cepas si se desarrollan a esta temperatura. En la temperatura de 45 °C se ha registrado un valor de  $1.405 \pm 0.534$  de DO a 605 nm, demostrando que las cepas se adaptan a esta temperatura extrema.

La tabla 39 presenta el ADEVA de la experimentación del crecimiento de las cepas en diferentes temperaturas.

**Tabla 39.** ADEVA de la densidad óptica (DO) a 605 nm en diferentes temperaturas de incubación

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	F. tabulares		
F de V	gl	SC	CM	Fc	0.05	0.01	
SCT=	53	10.291					
SCT=	17	10.252	0.603	566.434	2	2.6	**
SCA=	5	0.978	0.196	183.720	2.5	3.6	**
SCD=	2	2.832	1.416	1330.060	3.3	5.3	**
SCA*D=	10	6.442	0.644	605.065	2.14	2.9	**
SCEExp=	36	0.038	0.001				

CV= 1.890%

\*\* : Altamente significativo

El análisis de varianza indica que existe alta significación estadística para tratamientos, factores: A (cepas), D (diferentes temperaturas e interacciones A x D).

El coeficiente de variación fue de 1.890% con una media de crecimiento bacteriano de 1,737 de densidad óptica a 605 nm.

### 4.3.3.1 Análisis estadístico

**Tabla 40.** Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable densidad óptica a 605 nm en las diferentes temperaturas de incubación

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.09992  
 Error: 0.0011 gl: 36

Cepas	Temperaturas	Medias	n	E.E.						
UTNfa39	15 C	2.41	3	0.02	A					
UTNfa40	37 C	2.12	3	0.02		B				
UTNfa39	37 C	2.08	3	0.02		B	C			
UTNfa38	37 C	1.98	3	0.02			C	D		
UTNfa41	37 C	1.96	3	0.02				D	E	
LACT	15 C	1.88	3	0.02					E	F
LACT	37 C	1.87	3	0.02					E	F
UTNfa38	15 C	1.87	3	0.02					E	F
UTNfa40	15 C	1.85	3	0.02						F
UTNfa41	15 C	1.83	3	0.02					F	G
UTNfa37	45 C	1.73	3	0.02					G	H
UTNfa40	45 C	1.71	3	0.02						H
LACT	45 C	1.60	3	0.02						I
UTNfa38	45 C	1.58	3	0.02					I	J
UTNfa41	45 C	1.55	3	0.02					I	J
UTNfa37	37 C	1.50	3	0.02						J
UTNfa37	15 C	1.31	3	0.02						K
UTNfa39	45 C	0.26	3	0.02						L

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La tabla 40 presenta los resultados de la prueba de Tukey, observándose que existen 12 rangos diferentes para la variable crecimiento de bacterias, medidas en densidad óptica a 605 nm en diferentes temperaturas de incubación; en el cual los tratamientos han sido ordenados en forma descendente de acuerdo a los valores medios. Los rangos van desde el “a” hasta el “l”.

Se observa que existen bacterias estadísticamente iguales en crecimiento o producción de biomasa a diferentes temperaturas, siendo estas ordenadas de forma descendente de la cepa con mayor producción de biomasa a la que menor producción generó en estas condiciones de temperaturas. De acuerdo a lo que sostiene De la Rosa Fraile, Prieto Prieto, & Navarro Marí, (2011) “las bacterias también difieren en su temperatura óptima de crecimiento. Teniendo bacterias psicrófilas, mesófilas y termófilas”.

**Tabla 41.** Prueba de significación DMS para el factor A (cepas)

---

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04628  
Error: 0.0011 gl: 36

Cepas	Medias	n	E.E.	
UTNFa40	1.89	9	0.01	A
UTNFa38	1.81	9	0.01	B
LACT	1.78	9	0.01	B
UTNFa41	1.78	9	0.01	B
UTNFa39	1.58	9	0.01	C
UTNFa37	1.51	9	0.01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

Según los resultados de la Tabla 41, se establece cuatro rangos: “a”, “b”, “c” y “d” para el factor A (cepas) en función de la variable crecimiento de bacterias en diferentes temperaturas. Dentro de la investigación se considera que todas las bacterias crecen mejor en temperaturas adecuadas, estando definidas al ordenar las medias; con esto se ha logrado identificar la temperatura óptima de crecimiento para cada una de las bacterias. Las bacterias están ordenadas de forma descendente de mayor a menor en producción de biomasa en las distintas temperaturas, siendo iguales en producción de biomasa las bacterias UTNFa38, el probiótico comercial LACT y UTNFa41.

**Tabla 42.** Prueba de significación DMS para el factor D (diferentes temperaturas)

---

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.02659  
Error: 0.0011 gl: 36

Temperaturas	Medias	n	E.E.	
37 C	1.92	18	0.01	A
15 C	1.86	18	0.01	B
45 C	1.40	18	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

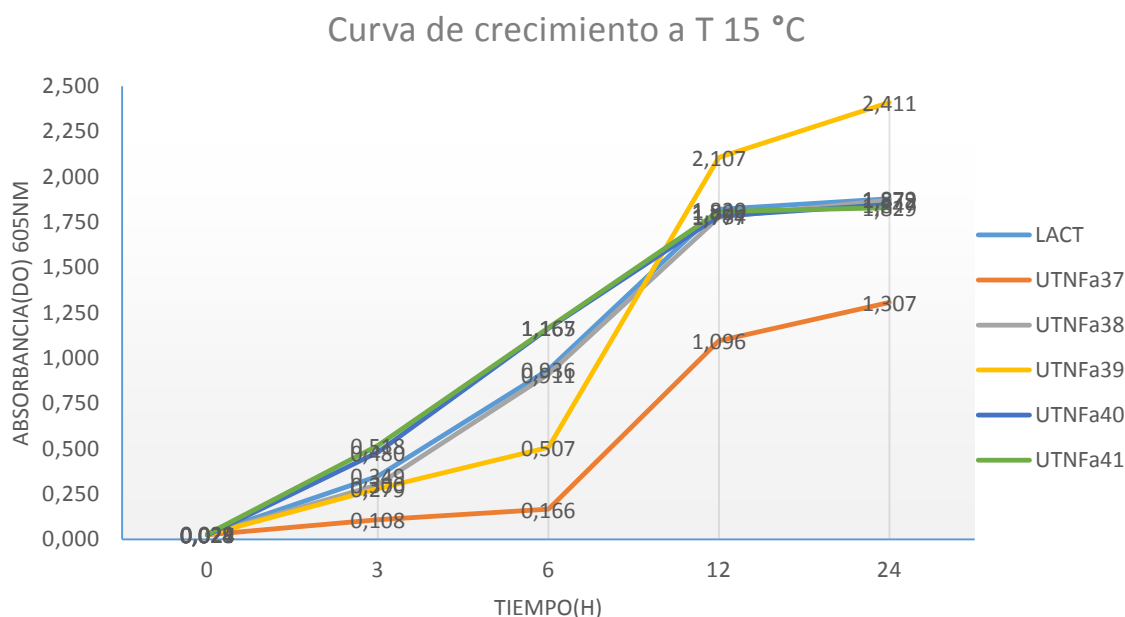
En la tabla 42 se observa que influye la temperatura en el crecimiento de las bacterias y el cálculo de DMS demuestra cual fue la mejor temperatura. De la Rosa Fraile, Prieto Prieto, & Navarro Marí, (2011) sostiene que “la mayoría de las bacterias son mesófilas y crecen mejor a temperaturas de alrededor de 37 °C (temperatura del cuerpo humano)”. Observando en el cuadro 35 que la mejor temperatura en la cual existió mayor crecimiento de bacterias fue en la temperatura de 37 °C, seguida de la temperatura a 15 °C y 45 °C, siendo distintas ya que los rangos lo demuestran.

### 4.3.3.2 Gráficas de las curvas de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación

Los datos obtenidos para las curvas de crecimiento en la experimentación, se detalla en el Anexo 17; mientras que la tabla 43 presenta el cálculo de las medias y desviación estándar, ayudando en el análisis e interpretación de los gráficos respectivos.

**Tabla 43.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes temperaturas de incubación

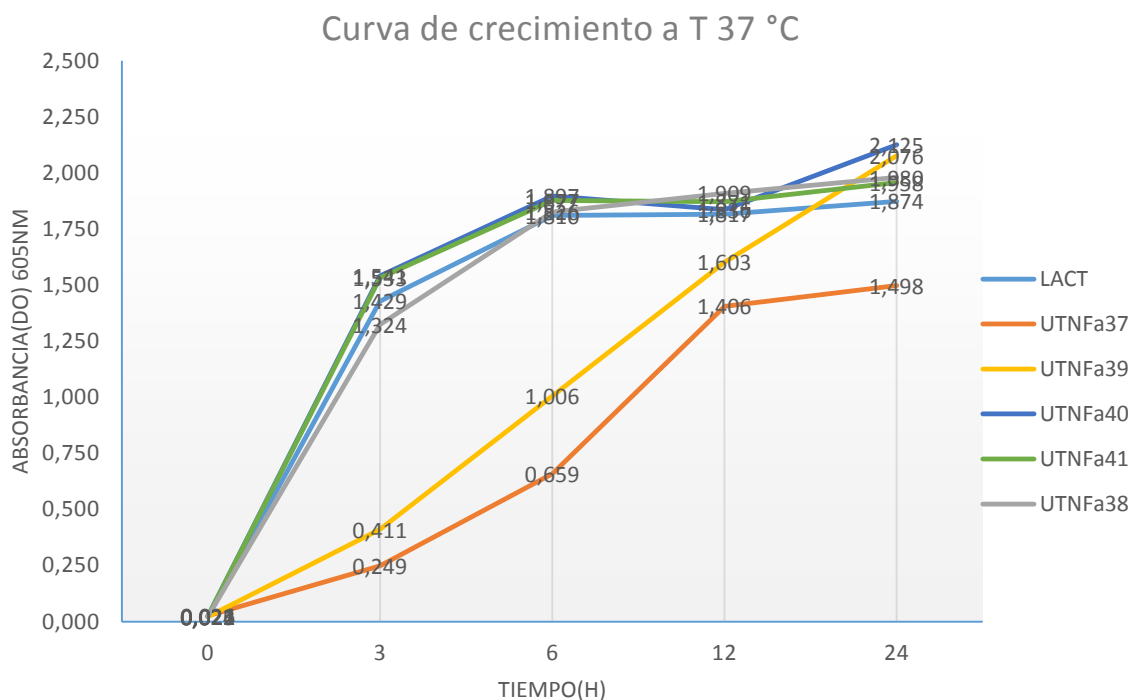
Tiempo Horas(h)	15 °C		37 °C		45 °C	
	Media	S=	Media	S=	Media	S=
0	0.026	0.003	0.023	0.003	0.025	0.003
3	0.339	0.142	1.081	0.554	0.743	0.312
6	0.808	0.374	1.513	0.507	1.039	0.392
12	1.732	0.315	1.740	0.184	1.263	0.481
24	1.857	0.329	1.918	0.213	1.405	0.534



**Gráfico 14.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C

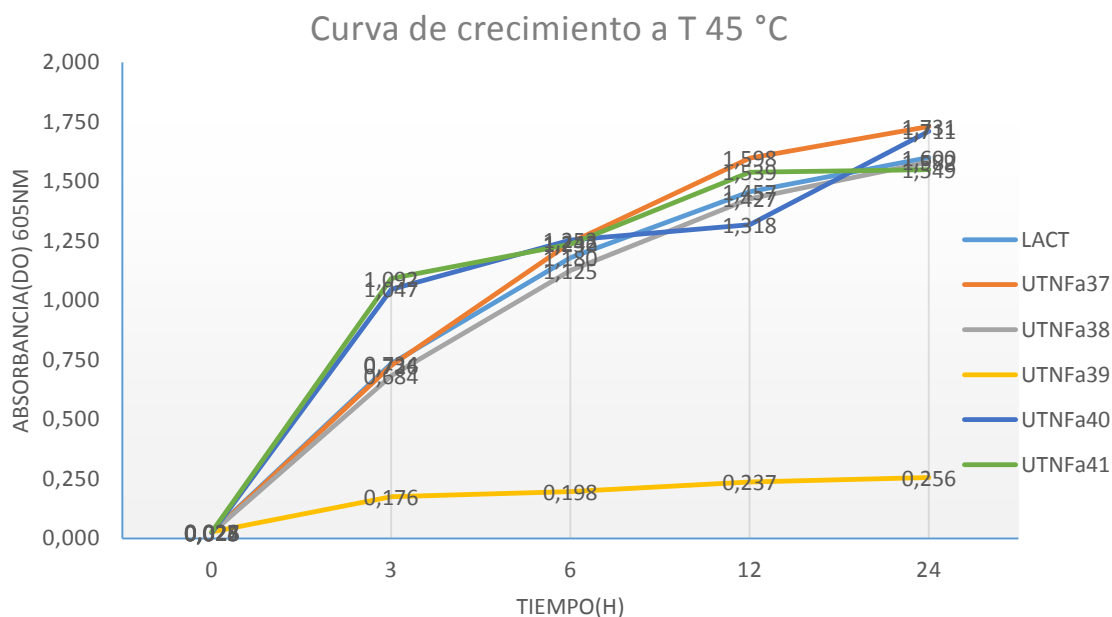
En el gráfico 14 se aprecia el crecimiento de las bacterias en estudio a la temperatura de incubación de 15 °C, observándose que tienen un periodo de latencia muy corto, debido que las bacterias inician su crecimiento de manera rápida; apreciándose el desarrollo de la fase exponencial hasta las 24 horas para las cepas UTN Fa37 y UTN Fa39, mientras que las cepas UTN Fa38, UTN Fa40, UTN Fa41 y el probiótico comercial a partir de las 12 horas, se

mantuvieron en la fase estacionaria hasta el final de la experimentación. El promedio de la biomasa al final del experimento es de  $1.857 \pm 0.329$  con un DO a 605 nm.



**Gráfico 15.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C

En el gráfico 15 se observa la curva de crecimiento de las bacterias en estudio a 37 °C de temperatura de incubación, se observa que la fase de latencia es despreciable ya que las cepas UNTFa38, UTNFa40, UTNFa41 y el probiótico comercial inician rápidamente su crecimiento, de igual manera se aprecia que en las cepas UTNFa39 y UTNFa40 la fase exponencial se desarrolla hasta las 24 horas, mientras que UTNFa41 y LACT inician la fase estacionaria a las 6 horas y UTNFa37 a las 12 horas. La biomasa media al final del experimento es de  $1.918 \pm 0.213$  de DO a 605 nm, con lo que se determina la variación mínima de la biomasa en esta condición. Se observa que la cepa UTNFa40 presenta la mayor biomasa con un valor de 2.125.



**Gráfico 16.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C

En el gráfico 16 se observa la curva de crecimiento a 45 °C de incubación. Las cepas UTNFa37, UTNFa38, UTNFa40 y el probiótico comercial mantienen su fase exponencial hasta las 24 horas, mientras que la cepa y UTNFa41 a las 12 horas ya inicia la fase estacionaria y la mantiene hasta las 24 horas, a diferencia de la cepa UTNFa39 que a esta condición de temperatura produce una biomasa mínima, lo que indica que esta temperatura no es adecuada para su crecimiento. La cepa UTNFa37 presenta mayor biomasa con un valor de 1.731 de DO a 605 nm comparada con el probiótico comercial que tiene una biomasa con un valor de 1.600 de DO a 605 nm, siendo esta la más tolerante a esta temperatura.

De acuerdo a lo que sostiene De la Rosa Fraile, Prieto Prieto, & Navarro Marí, (2011) “el crecimiento de las bacterias en un nuevo medio de cultivo líquido, comienza a multiplicarse de acuerdo con las dinámicas, teniendo como fase de latencia, exponencial, estacionaria y declive”. Además menciona Iranmanesh, et al., (2012) que “de ser resistentes al ácido y la bilis, otra propiedad importante de algunos de estos aislamientos fue su tolerancia a la temperatura y la resistencia a temperaturas altas. Las bacterias se ven afectadas también por factores genéticos, diferencias entre especies, estado fisiológico de las células y factores ambientales como pH, actividad del agua, contenido de cloruro de sodio y conservantes”.

Las cepas de bacterias UTNFa37, UTNFa38, UTNFa40, UTNFa41 y LACT se desarrollaron con mayor eficiencia a temperatura de 37 °C, produciendo gran cantidad de biomasa, mientras que la bacteria UTNFa39 se desarrolla mejor a la temperatura de 15 °C. Comparando las cepas en estudio con el probiótico comercial cultivadas a temperatura de 45 °C se observa que la producción de biomasa es buena y podrían ser utilizadas en procesos biotecnológicos industriales ya que toleran temperaturas extremas de incubación.

#### **4.3.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO EN CORRELACIÓN CON LAS TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN**

Los datos para el ADEVA se detallan en el Anexo 19, mientras que en la tabla 44 se presentan los datos de las desviaciones estándar y las medias en las diferentes concentraciones de cloruro de sodio y en relación con las diferentes temperaturas de incubación.

**Tabla 44.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y diferentes temperaturas

Concentración NaCl	T 15 C		T 37 C		T 45 C	
	Media	S=	Media	S=	Media	S=
2%	1.655	0.340	1.611	0.266	1.346	0.569
4%	0.910	0.415	1.285	0.463	0.981	0.431
6%	0.112	0.036	0.644	0.366	0.104	0.070

En la tabla 44 se determina que mientras aumenta la concentración de cloruro de sodio se inhibe el crecimiento de las cepas en las diferentes temperaturas de incubación, las desviaciones estándar indican la variación en el crecimiento al no alejarse de las medias en gran dimensión.

La tabla 45 muestra el análisis de varianza en la experimentación a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con las temperaturas de incubación.

**Tabla 45.** ADEVA del experimento % NaCl en relación con la temperatura

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	F. tabulares		
					0.05	0.01	Signif
F de V	gl	SC	CM	Fc			
SCT=	161	69.692					
SCCep=	5	9.632	1.926	696.004	2.29	3.17	**
SCTem=	2	4.068	2.034	734.882	3.07	4.79	**
SCCep*Tem=	10	3.596	0.360	129.936	1.91	2.47	**
SC%NaCl=	2	43.024	21.512	7772.183	3.07	4.79	**
SCCep*%NaCl=	10	2.768	0.277	99.994	1.91	2.47	**
SCTem*%NaCl=	4	1.805	0.451	163.028	2.45	3.48	**
SCCep*Tem*%NaCl=	20	4.501	0.225	81.308	1.66	2.03	**
SCE=	108	0.299	0.003				

CV= 5.48%

\*\* : Altamente significativo

El análisis de varianza indica que existe alta significación estadística para tratamientos y factores, tales como: factor A (cepa), factor D (diferentes temperaturas de incubación) y factor E (diferentes concentraciones de cloruro de sodio), e interacciones A x D, A x E, D x E y significación estadística para la interacción A x D x E.

El coeficiente de variación fue de 5.48% con una media de crecimiento bacteriano de 0.961 a densidad óptica a 605 nm.

Las bacterias en condiciones salinas en correlación con las diferentes temperaturas de incubación son diferentes y significativas, por tal razón se realizó pruebas de significancia, prueba de Tukey al 5% para tratamientos como se indica en la tabla 46 y DMS para los factores A, D, E que se muestran en las tablas 47, 48, 49 respectivamente.



### 4.3.4.1 Análisis estadístico

**Tabla 46.** Pruebas de Tukey para tratamientos. Variable densidad óptica a 605 nm en las diferentes temperaturas de incubación y diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17841  
 Error: 0.0028 gl: 108  
 NaCl Temperaturas Cepas Medias n E.E.

NaCl	Temperaturas	Cepas	Medias	n	E.E.	
2%	T 15 C	UTNfa39	2.13	3	0.03	A
2%	T 37 C	LACT	1.83	3	0.03	B
2%	T 37 C	UTNfa40	1.80	3	0.03	B
2%	T 37 C	UTNfa41	1.76	3	0.03	B C
2%	T 45 C	UTNfa40	1.75	3	0.03	B C
2%	T 37 C	UTNfa38	1.73	3	0.03	B C D
2%	T 15 C	LACT	1.72	3	0.03	B C D
2%	T 15 C	UTNfa40	1.71	3	0.03	B C D
2%	T 15 C	UTNfa38	1.68	3	0.03	B C D
2%	T 45 C	LACT	1.68	3	0.03	B C D E
2%	T 15 C	UTNfa41	1.66	3	0.03	B C D E F
4%	T 37 C	UTNfa40	1.61	3	0.03	C D E F G
4%	T 37 C	UTNfa38	1.59	3	0.03	C D E F G
2%	T 45 C	UTNfa38	1.55	3	0.03	D E F G
4%	T 37 C	LACT	1.50	3	0.03	E F G H
2%	T 45 C	UTNfa41	1.49	3	0.03	F G H
2%	T 45 C	UTNfa37	1.48	3	0.03	G H I
2%	T 37 C	UTNfa37	1.46	3	0.03	G H I J
4%	T 37 C	UTNfa41	1.44	3	0.03	G H I J
4%	T 45 C	UTNfa40	1.35	3	0.03	H I J K
4%	T 45 C	LACT	1.32	3	0.03	H I J K L
4%	T 15 C	UTNfa40	1.30	3	0.03	I J K L
4%	T 15 C	LACT	1.28	3	0.03	J K L M
4%	T 37 C	UTNfa37	1.24	3	0.03	K L M N
4%	T 45 C	UTNfa41	1.15	3	0.03	L M N O
2%	T 37 C	UTNfa39	1.10	3	0.03	M N O
4%	T 45 C	UTNfa37	1.09	3	0.03	N O
4%	T 15 C	UTNfa41	1.07	3	0.03	O
4%	T 15 C	UTNfa38	1.05	3	0.03	O
2%	T 15 C	UTNfa37	1.04	3	0.03	O
6%	T 37 C	LACT	1.01	3	0.03	O P
6%	T 37 C	UTNfa40	1.00	3	0.03	O P
6%	T 37 C	UTNfa41	0.85	3	0.03	O P Q
4%	T 45 C	UTNfa38	0.84	3	0.03	O P Q
6%	T 37 C	UTNfa38	0.67	3	0.03	O P Q R
4%	T 15 C	UTNfa37	0.54	3	0.03	O P Q R
4%	T 37 C	UTNfa39	0.33	3	0.03	S
6%	T 45 C	UTNfa37	0.23	3	0.03	S T
4%	T 15 C	UTNfa39	0.21	3	0.03	S T U
6%	T 37 C	UTNfa39	0.17	3	0.03	S T U
6%	T 37 C	UTNfa37	0.16	3	0.03	S T U
6%	T 15 C	UTNfa39	0.15	3	0.03	S T U
6%	T 15 C	LACT	0.15	3	0.03	S T U
6%	T 15 C	UTNfa37	0.15	3	0.03	T U
2%	T 45 C	UTNfa39	0.13	3	0.03	T U
4%	T 45 C	UTNfa39	0.13	3	0.03	T U
6%	T 45 C	LACT	0.12	3	0.03	T U
6%	T 45 C	UTNfa41	0.12	3	0.03	T U
6%	T 15 C	UTNfa40	0.08	3	0.03	T U
6%	T 15 C	UTNfa38	0.08	3	0.03	T U
6%	T 15 C	UTNfa41	0.07	3	0.03	T U
6%	T 45 C	UTNfa38	0.05	3	0.03	U
6%	T 45 C	UTNfa40	0.05	3	0.03	U
6%	T 45 C	UTNfa39	0.04	3	0.03	U

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

En la tabla 46 se presentan los resultados de la prueba de Tukey, donde se puede observar que existen 21 rangos diferentes para la variable crecimiento de las bacterias; medida en densidad óptica a 605 nm, en donde los tratamientos han sido ordenados en forma descendente de acuerdo a los valores medios. Los rangos van desde “a” hasta “u”.

Martins, et al., (2005) manifiesta que “una prueba muy importante para considerar a una cepa con capacidad probiótica es su resistencia a los jugos gástricos, mismos que están compuestos por ácidos y diferentes concentraciones de cloruro de sodio junto a enzimas catabólicas”. Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) mencionan que “las bacterias destinadas a ejercer efectos beneficiosos en los intestinos deben sobrevivir el tránsito por medio ácido y salino del estómago”. Según Hoque, et al. (2010) “el experimento utilizó cloruro de sodio (NaCl) que es una sustancia inhibidora del crecimiento de ciertos tipos de bacterias y se encuentra con mayor presencia en el tracto gastrointestinal”. Por lo tanto, el mejor tratamiento no será aquel que tenga mayor crecimiento en menor concentración de cloruro de sodio, sino aquel o aquellos que resistan y se reproduzcan a mayor concentración de cloruro de sodio durante el tiempo expuesto a las diferentes temperaturas de incubación; siendo entonces los tratamientos de los rangos “o” hasta “u”.

**Tabla 47.** Prueba de significación DMS para el factor A (cepas)

Cepas	Medias	n	E.E.	
UTNFa40	1.18	27	0.01	A
LACT	1.18	27	0.01	A
UTNFa41	1.07	27	0.01	B
UTNFa38	1.03	27	0.01	B
UTNFa37	0.82	27	0.01	C
UTNFa39	0.49	27	0.01	D

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04155  
 Error: 0.0028 gl: 108  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Según los resultados de la tabla 47, se establecen cuatro rangos: “a”, “b”, “c” y “d” para el factor A (diferentes cepas), en función de la variable de crecimiento de microorganismos en medios líquidos. En donde la cepa UTNFa39 que se encuentra en el rango “d” presento la menor medida de densidad óptica (DO) de 0.49 a 605 nm. La cepa UTNFa37 tiene como densidad óptica de 0.82 a 605 nm y se encuentra en el rango “c”. Mientras que las cepas UTNFa38 y UTNFa41 son estadísticamente iguales representadas por el rango “b” obteniendo valores de 1.03 y 1.07 respectivamente de densidad óptica a 605 nm. Las bacterias UTNFa40 y el probiótico comercial LACT también son estadísticamente iguales, y presentan la mayor producción de biomasa a las diferentes condiciones de temperatura y cloruro de sodio con una densidad óptica de 1.18 a 605 nm.

**Tabla 48.** Prueba de significación DMS para el factor D (diferentes temperaturas)

---

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.02406  
Error: 0.0028 gl: 108

Temperaturas	Medias	n	E.E.	
T 37 C	1.18	54	0.01	A
T 15 C	0.89	54	0.01	B
T 45 C	0.81	54	0.01	C

---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

Según los resultados de la tabla 48, se establecen tres rangos: “a”, “b”, y “c” para el factor D (diferentes temperaturas) en función de la variable producción de biomasa medida en densidad óptica a 605 nm. A 45 °C se obtuvo la menor cantidad de biomasa, por lo que se encuentra en el rango “c” con una densidad óptica promedio de 0.81 a 605 nm, demostrándose que el crecimiento de las bacterias difiere mucho con la temperatura de incubación y el cloruro de sodio. En la misma tabla se observa que a temperatura de 15 °C se obtiene una biomasa con un promedio de densidad óptica de 0.89 a 605 nm y se encuentra en el rango “b”. A temperatura de 37 °C se obtiene la mayor biomasa con una densidad óptica media de 1.18 a 605 nm por lo que se encuentra en el rango “a”, siendo el mejor nivel. Las bacterias mesófilas son las que se reproducen con mayor eficacia a 37 °C y su tolerancia al cloruro de sodio es mayor.

**Tabla 49.** Prueba de significación DMS para el factor E (diferentes concentraciones de cloruro de sodio)

---

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.02406  
Error: 0.0028 gl: 108

NaCl	Medias	n	E.E.	
2%	1.54	54	0.01	A
4%	1.06	54	0.01	B
6%	0.29	54	0.01	C

---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

En los resultados de esta prueba se indican tres rangos: “a”, “b”, y “c” como se observa en la tabla 49, en el nivel 6% de cloruro de sodio se observa que las cepas resisten a esta condición ya que presentan una biomasa con una densidad óptica promedio de 0.29 a 605 nm. Los otros niveles 2% y 4% de cloruro de sodio están dentro de los rangos “a” y “b” con valores de 1.54 y 1.06 de densidad óptica promedio a 605 nm respectivamente. Con lo cual se deduce que el cloruro de sodio es un parámetro que si tiene influencia en el desarrollo de las bacterias especialmente en altas concentraciones.

#### 4.3.4.2 Cálculo de microorganismos vivos tolerantes a cloruro de sodio

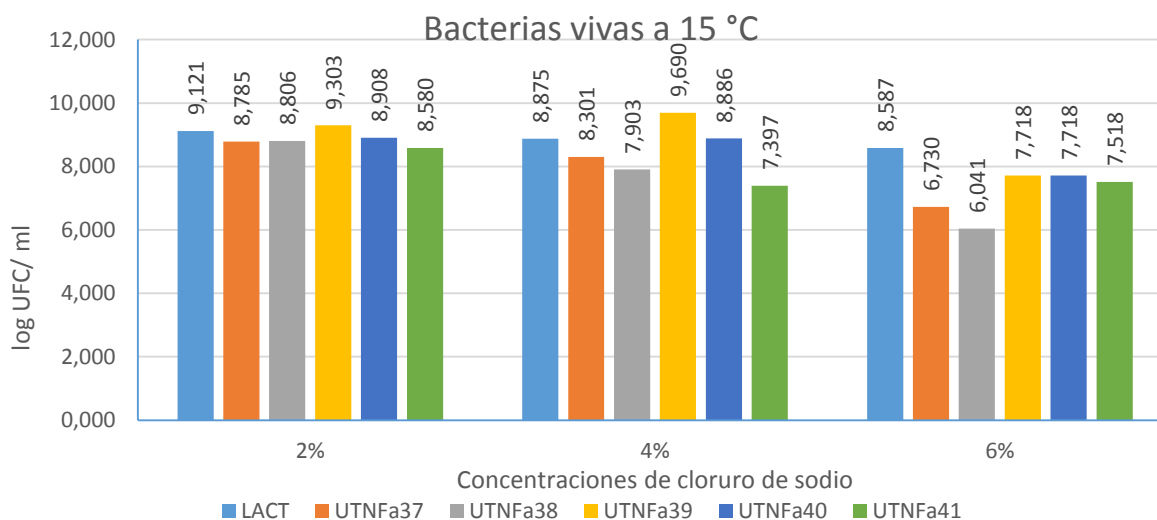
La tabla 50 muestra los resultados de las células que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio a la temperatura de 15 °C, también se calculó la media y la desviación estándar de las tres concentraciones de cloruro de sodio mostrada en la tabla 51.

**Tabla 50.** Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 15 °C

CEPA	2% NaCl	4% NaCl	6% NaCl
LACT	9.121	8.875	8.587
UTNFa37	8.785	8.301	6.730
UTNFa38	8.806	7.903	6.041
UTNFa39	9.303	9.690	7.718
UTNFa40	8.908	8.886	7.718
UTNFa41	8.580	7.397	7.518

**Tabla 51.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 15 °C

% NaCl	Media	S=
2%	8.917	0.258
4%	8.509	0.815
6%	7.385	0.885



**Gráfico 17.** Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl

Con el propósito de conocer el número de bacterias que sobreviven al final del experimento, se realizó un recuento en placa, y la medida de la población se expresa en log UFC/ml de muestra. El gráfico 17 muestra el recuento de las cepas de bacterias resistentes a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación a la temperatura de 15 °C de incubación, observándose a UTNFa39 como la que presenta mejor sobrevivencia al 2% de cloruro de sodio con una población de 9.303 log UFC/ml, a UTNFa40 al 4% de cloruro de sodio con una población de 9.690 log UFC/ml y al 6% de cloruro de sodio al probiótico comercial LACT con una población de 8.587 log UFC/ml seguido de UTNFa39 y UTNFa40 con la mayor población siendo 7.718 log UFC/ml. La población promedio al 2% de cloruro de sodio fue de  $8.917 \pm 0.258$  log UFC/ml, al 4% de cloruro de sodio su valor medio fue de  $8.509 \pm 0.815$  log UFC/ml, mientras que al 6% de cloruro de sodio su valor medio fue de  $7.385 \pm 0.885$  log UFC/ml. Donde se determinó que la biomasa generada a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio por las cinco bacterias de interés es similar a la del probiótico comercial.

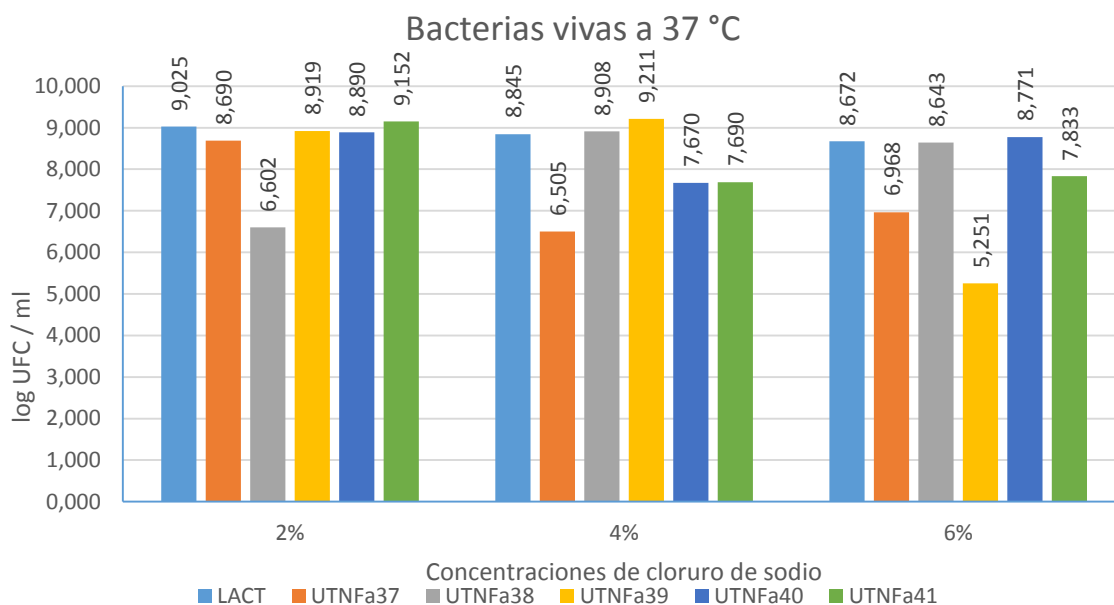
La tabla 52 muestra los resultados de las células vivas a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en la temperatura de 37 °C, también se calculó la media y la desviación estándar de las tres concentraciones de cloruro de sodio mostrada en la tabla 53.

**Tabla 52.** Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 37 °C

<b>CEPA</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>
LACT	9.025	8.845	8.672
UTNFa37	8.690	6.505	6.968
UTNFa38	6.602	8.908	8.643
UTNFa39	8.919	9.211	5.251
UTNFa40	8.890	7.670	8.771
UTNFa41	9.152	7.690	7.833

**Tabla 53.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 37 °C

<b>% NaCl</b>	<b>Media</b>	<b>S=</b>
2%	8.547	0.965
4%	8.138	1.032
6%	7.690	1.381



**Gráfico 18.** Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl

Para determinar el número de cepas vivas al final del experimento, se realizó un recuento en placas y la medida de la población se expresa en log UFC/ml. En el gráfico 18 se observa el recuento de las cepas de bacterias resistentes a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación a la temperatura de 37 °C de incubación, observándose a UTNFa41 como la que presenta mejor sobrevivencia al 2% de cloruro de sodio con una población de 9.152 log UFC/ml, a UTNFa39 al 4% de cloruro de sodio con una población de 9.211 log UFC/ml y al 6% de cloruro de sodio la cepa UTNFa40 con una población de 8.771 log UFC/ml, siendo poblaciones mayores comparando con el testigo comercial. La población promedio obtenida al 2% de cloruro de sodio fue de  $8.547 \pm 0.965$  log UFC/ml, al 4% de cloruro de sodio su valor fue de  $8.138 \pm 1.032$  log UFC/ml y mientras que al 6% de cloruro de sodio su valor promedio fue de  $7.690 \pm 1.381$  log UFC/ml. Donde se determinó que la biomasa generada a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio por las cinco bacterias de interés es similar a la del probiótico comercial.

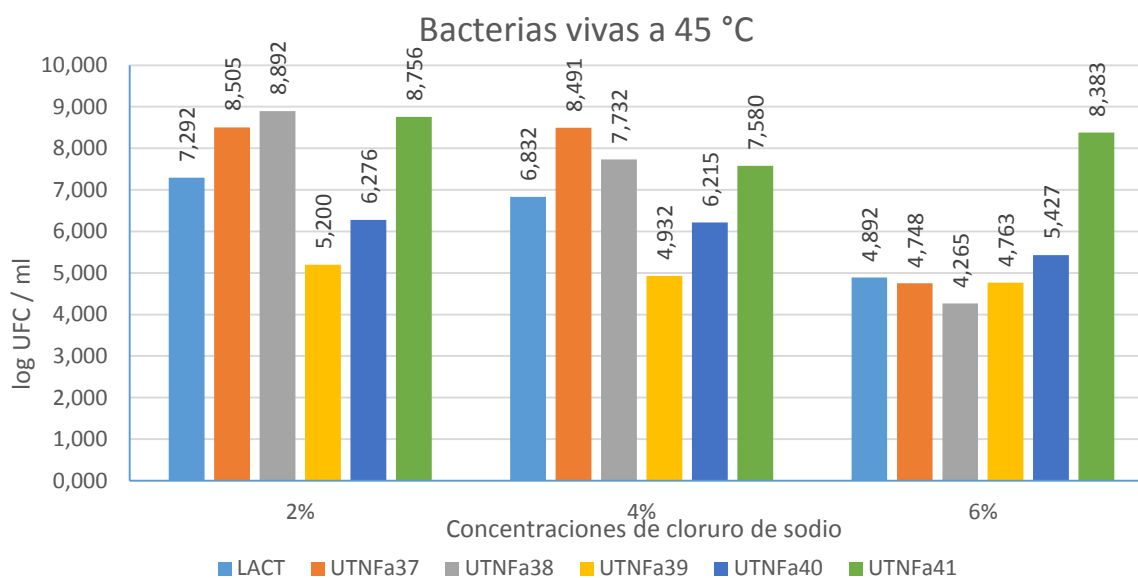
La tabla 54 muestra los resultados de las células que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en la temperatura de 45 °C, también se calculó la media y la desviación estándar presentando en la tabla 55.

**Tabla 54.** Datos log UFC/ml a diferentes concentraciones de NaCl a la temperatura de 45 °C

CEPA	2%	4%	6%
LACT	7.292	6.832	4.892
UTNFa37	8.505	8.491	4.748
UTNFa38	8.892	7.732	4.265
UTNFa39	5.200	4.932	4.763
UTNFa40	6.276	6.215	5.427
UTNFa41	8.756	7.580	8.383

**Tabla 55.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 45 °C

% NaCl	Media	S=
2%	7.487	1.507
4%	6.964	1.266
6%	5.413	1.502



**Gráfico 19.** Cantidad de biomasa en log UFC/ml de muestra a diferentes concentraciones de NaCl

Con la finalidad de determinar el número de BAL vivas al final del experimento, se realizó un recuento en placas y la medida de la población se expresa en log UFC/ml. El gráfico 19 presenta el recuento de las cepas resistentes a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio, en

relación a la temperatura de 45 °C de incubación; observándose a UTNFa38 la que presento mayor supervivencia al 2% de cloruro de sodio con una población de 8.892 log UFC/ml, a UTNFa37 al 4% de cloruro de sodio con una población de 8.491 log UFC/ml y al 6% de cloruro de sodio a la cepa UTNFa41 con una población de 8.383 log UFC/ml. La población promedio al 2% de cloruro de sodio fue de  $7.487 \pm 1.507$  log UFC/ml, al 4% de cloruro de sodio su valor medio fue de  $6.964 \pm 1.266$  log UFC/ml y al 6% de cloruro de sodio su valor medio fue de  $5.413 \pm 1.502$  log UFC/ml. Donde se determinó que la población sobreviviente a las diferentes concentraciones de cloruro de sodio por las cinco bacterias de interés es casi similar y a veces aún mayor al testigo comercial.

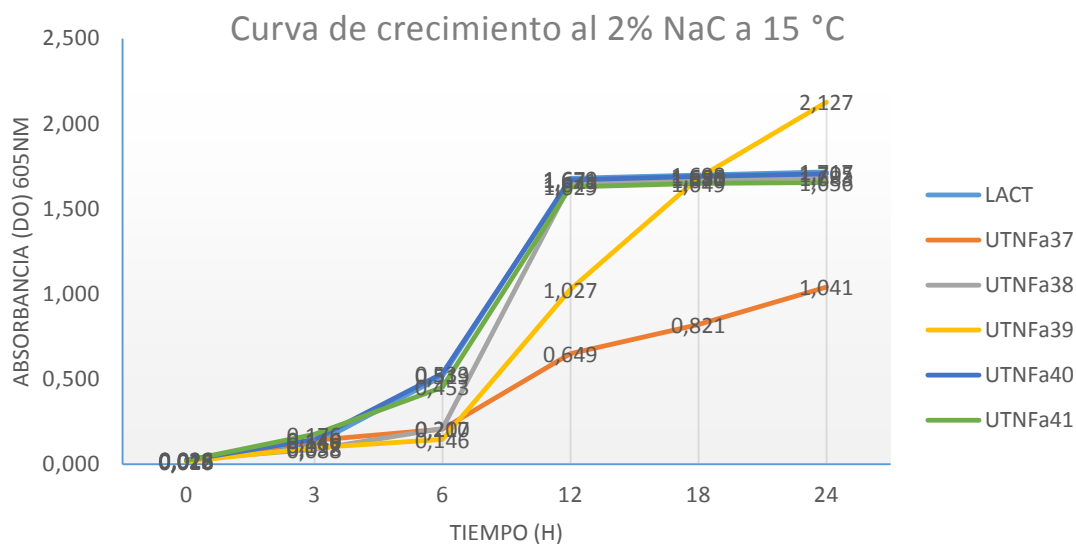
#### 4.3.4.3 Gráficas de las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 15 °C

Los datos obtenidos para las curvas de crecimiento se detalla en el Anexo 20, mientras que en la tabla 56 presenta las medias y las desviaciones estándar en los tiempos establecidos; con la finalidad de observar la variación producida mientras se desarrollan a estas condiciones.

**Tabla 56.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 15 °C

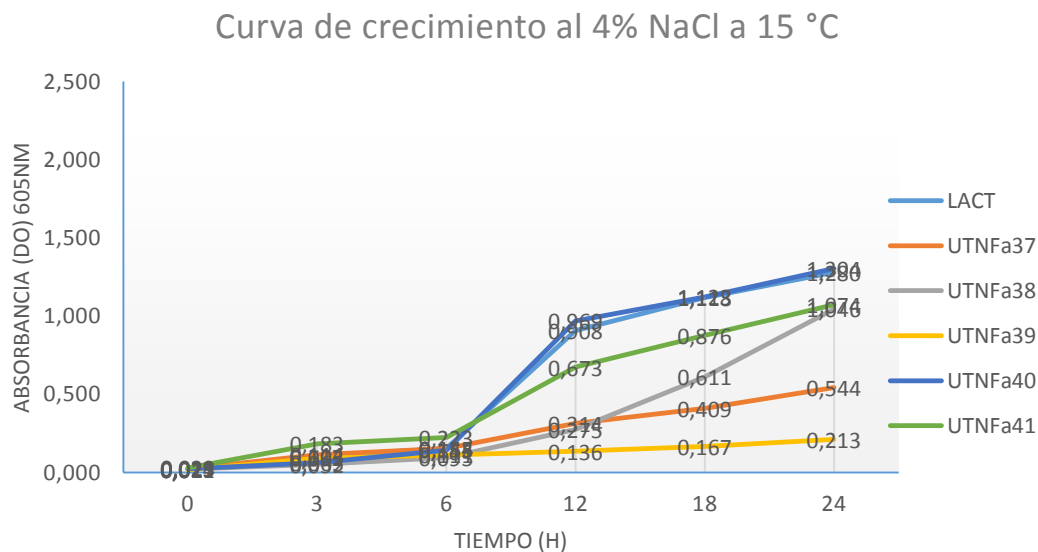
Tiempo h	2% NaCl		4% NaCl		6% NaCl	
	Media	S=	Media	S=	Media	S=
0	0.022	0.004	0.023	0.004	0.020	0.003
3	0.127	0.062	0.101	0.066	0.046	0.027
6	0.345	0.177	0.147	0.079	0.073	0.039
12	1.383	0.423	0.546	0.350	0.089	0.038
18	1.535	0.343	0.717	0.373	0.095	0.035
24	1.655	0.340	0.910	0.415	0.112	0.036





**Gráfico 20.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 2% de NaCl

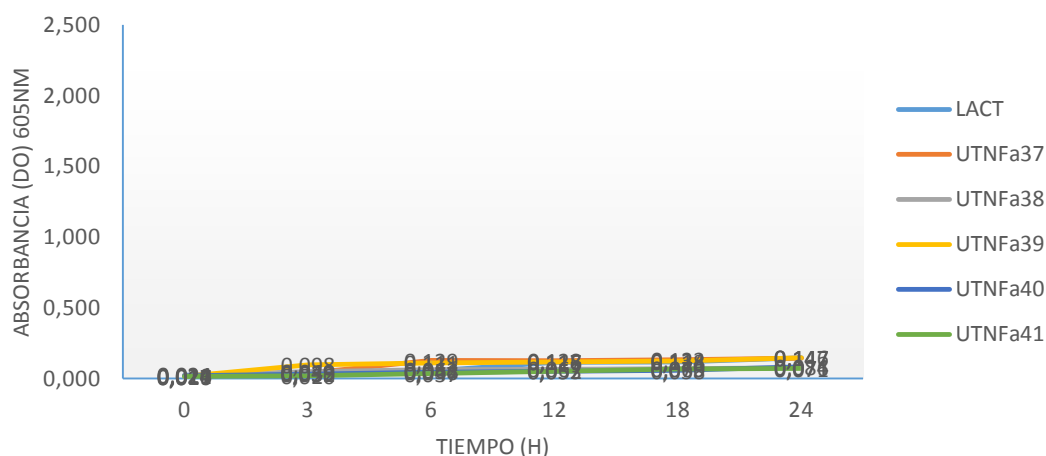
En el gráfico 20 se observa las curvas de crecimiento de las cepas en estudio al 2% de cloruro de sodio y a una temperatura de 15 °C, se aprecia su desarrollo en las diferentes fases de crecimiento, determinando que la mejor cepa a las 24 horas de incubación y a esta condición es la cepa UTN Fa39, con un valor de biomasa de 2.127 de DO a 605 nm; siendo la biomasa promedio  $1.655 \pm 0.340$  de DO a 605 nm.



**Gráfico 21.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 4% de NaCl

En el gráfico 21 se observa las curvas de crecimiento generada por las cepas al 4% de cloruro de sodio y una temperatura de 15 °C, se aprecia su desarrollo en diferentes fases de crecimiento. Observándose la fase de latencia hasta la sexta hora de incubación para todas las cepas incluido el testigo comercial y posteriormente inician su crecimiento. Determinando que la mejor cepa luego de 24 horas de incubación es la cepa UTNFa40, con una biomasa de 1.304 de DO a 605 nm; siendo la biomasa promedio de  $0.910 \pm 0.415$  de DO a 605 nm, estableciéndose que a las 24 horas las cepas aún permanecen en la fase exponencial sin pasar a la fase de estacionaria.

Curva de crecimiento al 6% NaCl a 15 °C



**Gráfico 22.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 15 °C y 6% de NaCl

En el gráfico 22 se observa la producción de biomasa no tan significativa de las BAL al 6% de cloruro de sodio incubada a una temperatura de 15 °C. Observándose que no se produce crecimiento durante las 24 horas de incubación, sin embargo las bacterias toleran al cloruro de sodio ya que se mantiene la población pero no se desarrollan por no ser adecuada la temperatura. Determinando que las mejores cepas a las 24 horas de incubación son UTNFa39 y el probiótico comercial, con un valor similar de 0.147 de DO a 605 nm; la biomasa promedio fue de  $0.112 \pm 0.036$  de DO a 605 nm.

En el experimento se observó que la cepa UTNFa39 presenta un leve incremento de la población a diferencia del resto de cepas que sobreviven pero no presentan aumento en la población, afirmando que el cloruro de sodio no permite desarrollar la biomasa. Según Fernández Olmos,

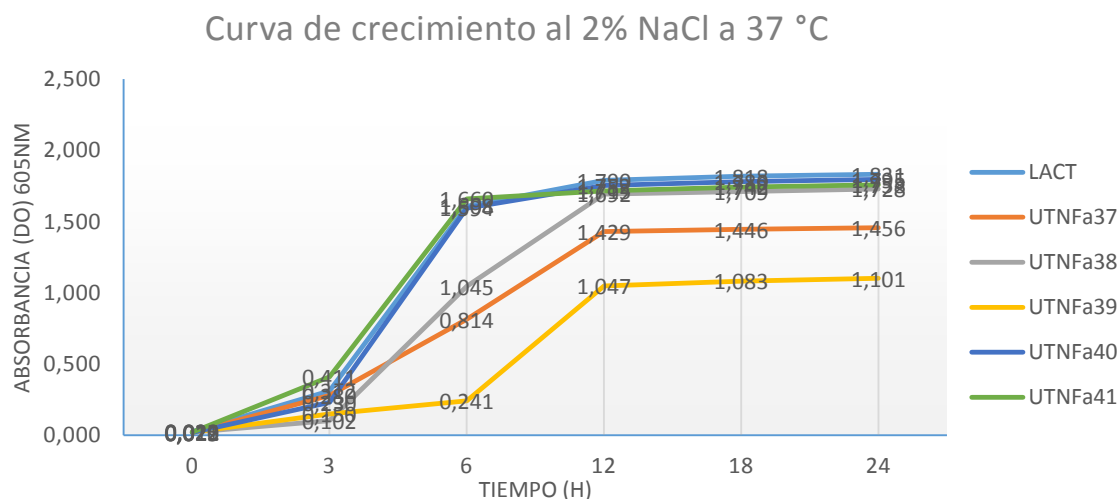
et al., (2010) sostiene que “dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros)”.

#### 4.3.4.4 Gráficas de las curvas de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 37 °C

Los datos obtenidos para las curvas de crecimiento se detallan en el Anexo 22, mientras que en la tabla 57 se presenta las medias y las desviaciones estándar en los tiempos establecidos; con la finalidad de observar la variación producida mientras las bacterias se desarrollan a estas condiciones.

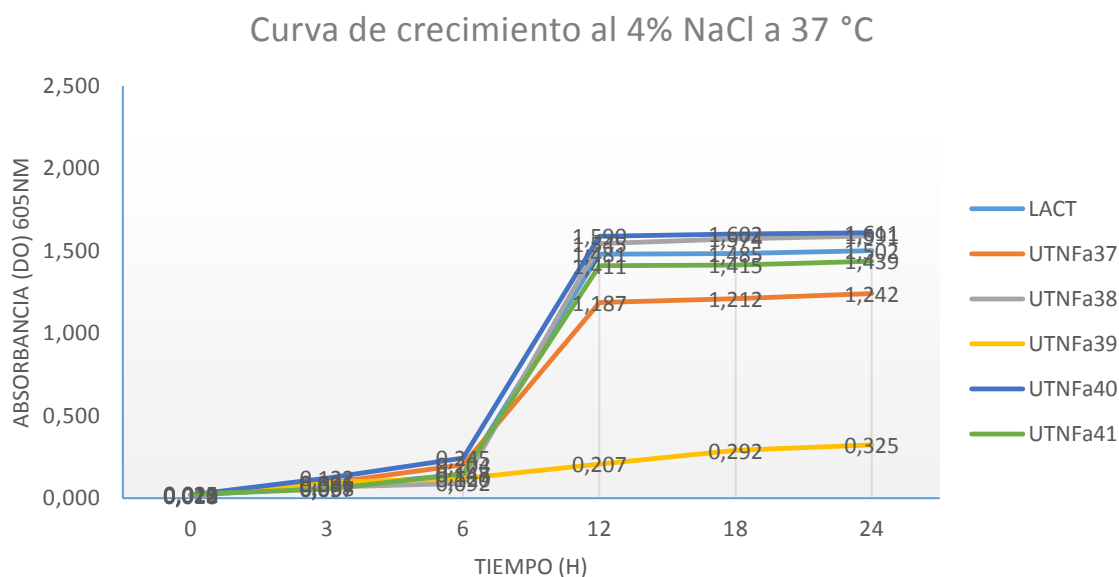
**Tabla 57.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 37 °C

Tiempo h	2% NaCl		4% NaCl		6% NaCl	
	Media	S=	Media	S=	Media	S=
0	0.021	0.002	0.021	0.002	0.022	0.002
3	0.247	0.138	0.083	0.057	0.066	0.042
6	1.160	0.557	0.159	0.084	0.083	0.043
12	1.571	0.270	1.237	0.497	0.440	0.364
18	1.596	0.267	1.263	0.471	0.516	0.373
24	1.611	0.266	1.285	0.463	0.644	0.366



**Gráfico 23.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 2% de NaCl

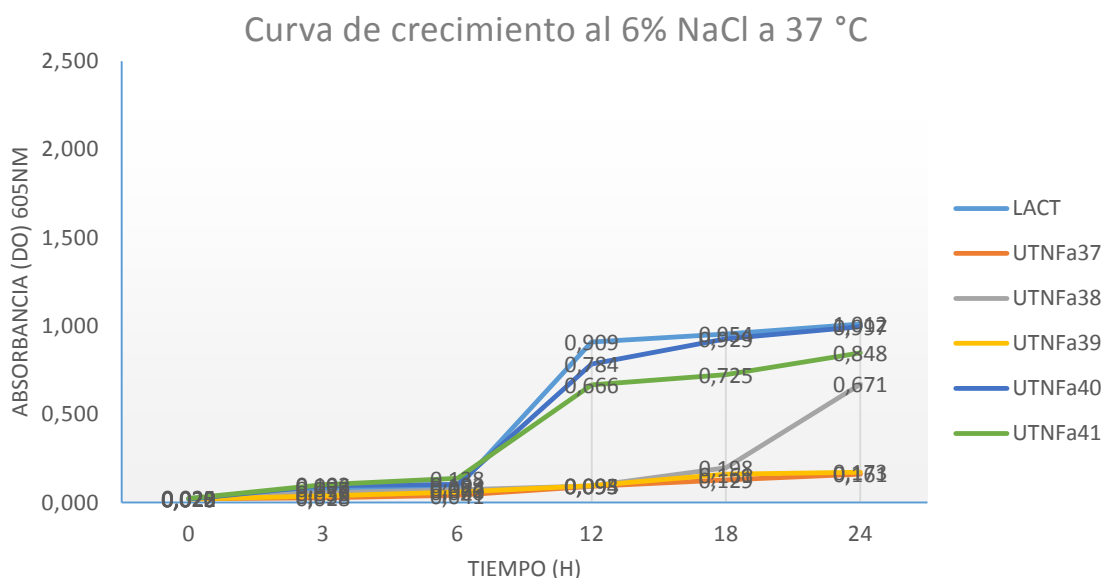
En el gráfico 23 se puede observar las curvas de crecimiento de las BAL que se desarrollaron al 2% de cloruro de sodio y una temperatura de 37 °C, se aprecia la fase exponencial hasta las 12 horas y permanecen hasta las 24 horas en la fase estacionaria. Determinando que las mejores cepas al final de la experimentación fueron UTNFa40, UTNFa41 y UTNFa38 que están próximos a la biomasa generada por el probiótico comercial, mientras que las cepas UTNFa37 y UTNFa39 toleran estas condiciones pero su biomasa está muy alejada al testigo comercial. De las cepas de interés la mejor fue UTNFa40 con una biomasa de 1.795 de DO a 605 nm, ya que su biomasa es la más próxima a del probiótico comercial que presenta un valor de 1.831 de DO a 605 nm. La biomasa promedio fue de  $1.611 \pm 0.266$  de DO a 605 nm al final de la experimentación, observando que las cepas obtienen un crecimiento de manera casi homogénea a esta condición.



**Gráfico 24.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 4% de NaCl

En el gráfico 24 se aprecia las curvas de crecimiento de las cepas en estudio al 4% de cloruro de sodio y a una temperatura de 37 °C, se observa su desarrollo en las diferentes fases de crecimiento, apreciando la fase de latencia hasta la sexta hora para todas las cepas y posteriormente inician su crecimiento acelerado en el caso de las cepas UTNFa40, UTNFa38, LACT, UTNFa41 y UTNFa37 hasta las 12 horas y permanecen en la fase estacionaria hasta las 24 horas; mientras que UTNFa39 produce biomasa de manera muy lenta en comparación con

las cinco cepas antes mencionadas hasta el final de la experimentación. Determinándose a UTNFa40 como la mejor cepa con una biomasa de 1.611 de DO a 605 nm que es aún mayor al testigo comercial 1.502 de DO a 605nm. La biomasa promedio fue de  $1.285 \pm 0.463$  de DO a 605 nm al final de la experimentación.



**Gráfico 25.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 37 °C y 6% de NaCl

En el gráfico 25 se observa las curvas de crecimiento desarrolladas por las BAL en estudio al 6% de cloruro de sodio y una temperatura de 37 °C, se aprecia su desarrollo en diferentes fases de crecimiento. Observándose la fase de latencia hasta la sexta hora en las cepas LACT, UTNFa40 y UTNFa38 que posteriormente inician su crecimiento, mientras que la cepa UTNFa38 inicia su crecimiento acelerado a partir de las 18 horas. Las cepas UTNFa37 y UTNFa39 toleran y producen biomasa de manera muy baja en comparación con el testigo comercial. Determinando que la mejor cepa de interés a esta condición fue UTNFa40 con una biomasa de 0.997 de DO a 605 nm, ya que está más próxima en biomasa al probiótico comercial con 1.012 de DO a 605 nm. Obteniéndose una biomasa promedio de  $0.644 \pm 0.366$  de DO a 605 nm al final de la experimentación, estableciéndose que a las 24 horas las cepas aún permanecen en la fase estacionaria sin pasar a la fase de declive.

La mejor cepa de interés en las condiciones de 37 °C de incubación y diferentes concentraciones de cloruro de sodio fue la cepa UTNFa40, siendo la que mayor producción de biomasa generó

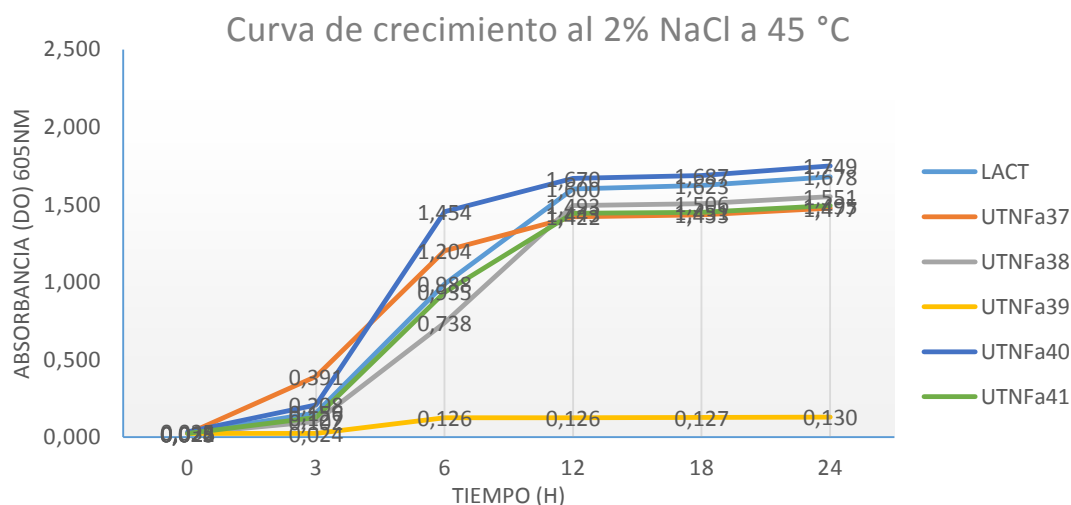
en el menor tiempo, mientras que las cepas UTNFa37, UTNFa38 y UTNFa41 toleran al cloruro de sodio y presentan una considerable producción de biomasa, la cepa UTNFa39 no se desarrolla con buen potencial debido a que la temperatura de incubación no es adecuada.

#### 4.3.4.5 Gráficas de las curvas de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en relación con la temperatura de 45 °C

Los datos obtenidos para las curvas de crecimiento se detallan en el Anexo 20, mientras que en la tabla 58 se calculó las medias y las desviaciones estándar en los tiempos establecidos; con la finalidad de observar la variación producida mientras se desarrollan a estas condiciones.

**Tabla 58.** La media y la desviación estándar de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y 45 °C

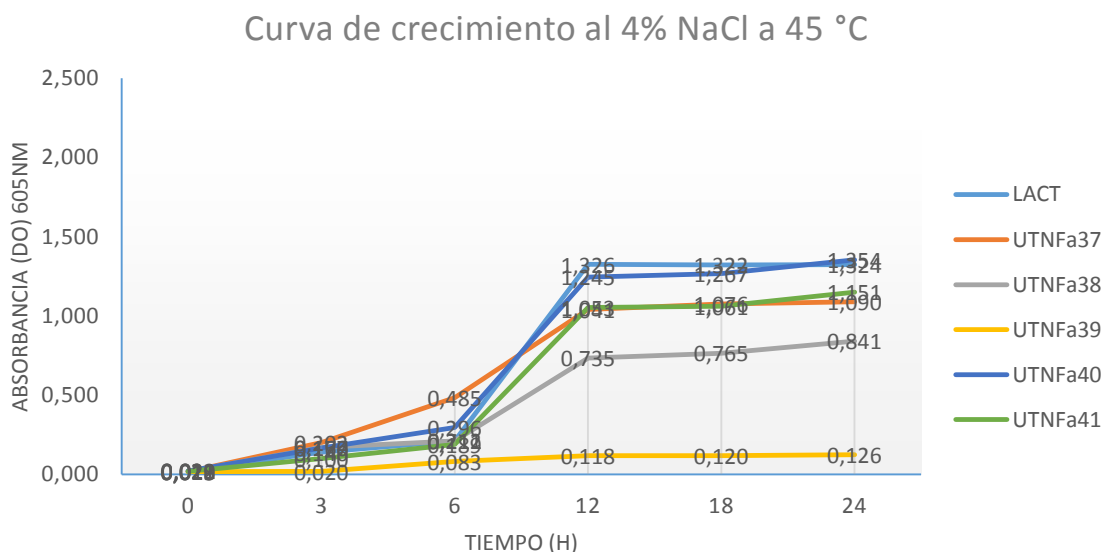
Tiempo h	2% NaCl		4% NaCl		6% NaCl	
	Media	S=	Media	S=	Media	S=
0	0.026	0.008	0.020	0.002	0.022	0.002
3	0.168	0.129	0.133	0.092	0.035	0.017
6	0.907	0.469	0.246	0.141	0.048	0.030
12	1.292	0.545	0.920	0.422	0.072	0.062
18	1.304	0.550	0.935	0.423	0.082	0.066
24	1.346	0.569	0.981	0.431	0.104	0.070



**Gráfico 26.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 2% de NaCl

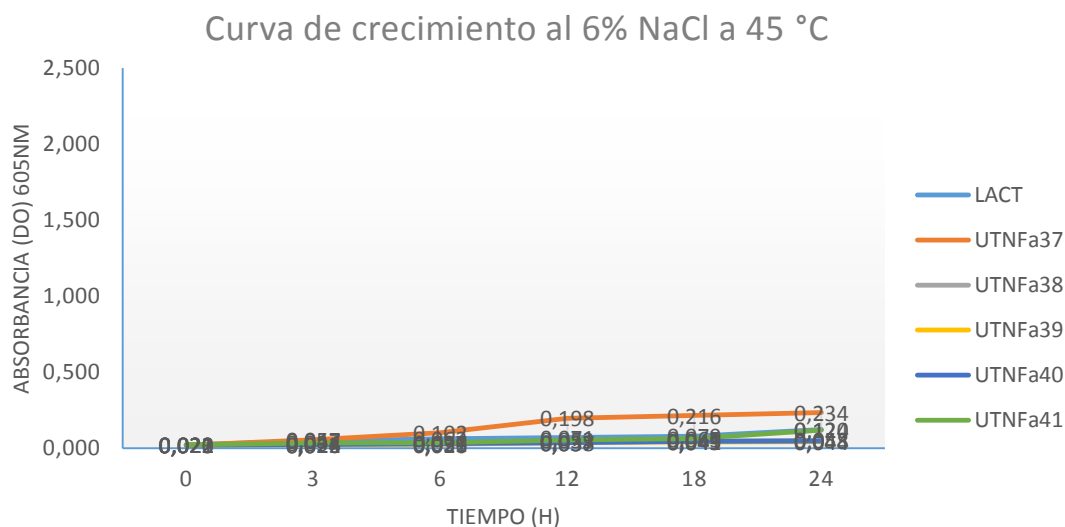
En el gráfico 26 se observa las curvas de crecimiento producidas por las cepas en estudio al 2% de cloruro de sodio y la temperatura de 45 °C, se aprecia la fase de latencia hasta la tercera hora

para todas las cepas. Las BAL UTNFa40, LACT, UTNFa38, UTNFa41 y UTNFa37 inician su crecimiento acelerado a partir de la tercera hora y llega a su máximo crecimiento a las 12 horas y permanecen en esta hasta las 24 horas; exceptuando la cepa UTNFa39 que no produce una considerable cantidad de biomasa comparada con las anteriores, debido a que la temperatura no es adecuada para su desarrollo. Determinando que la mejor cepa a las 24 horas de incubación fue UTNFa40, con un valor de 1.749 de DO a 605 nm que fue mayor al del probiótico comercial 1.024 de DO a 605 nm; siendo la biomasa promedio de todas las BAL al final de la experimentación de  $1.346 \pm 0.569$  de DO a 605 nm.



**Gráfico 27.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 4% de NaCl

El gráfico 27 presenta las curvas de crecimiento generadas por las cepas en estudio al 4% de cloruro de sodio y la temperatura de 45 °C, se aprecia la fase de latencia hasta la sexta hora de incubación para todas las cepas e inician su crecimiento acelerado las cepas LACT, UTNFa40, UTNFa41, UTNFa37 y UTNFa38 hasta la hora 12 y permanecen en la fase estacionaria hasta las 24 horas; mientras que la cepa UTNFa39 no presenta una producción de biomasa significativa. Determinando que la mejor cepa a las 24 horas de incubación fue UTNFa40, con una biomasa de 1.749 de DO a 605 nm que fue mayor al testigo comercial LACT 1.024 de DO a 605 nm. Las BAL dieron como biomasa promedio  $0.981 \pm 0.431$  de DO a 605 nm.



**Gráfico 28.** Curva de crecimiento a la temperatura de incubación de 45 °C y 6% de NaCl

En el gráfico 28 se aprecia que la generación de biomasa al 6% de cloruro de sodio y a temperatura de 45 °C no es significativa ni para las BAL ni para el testigo, se observa que la fase de latencia para todas las cepas permaneció hasta las 24 horas y únicamente UTN Fa37 presentó un leve crecimiento de biomasa con 0.234 de DO a 605 nm, inclusive LACT tuvo una biomasa muy baja con 0.124 de DO a 605 nm. Obteniéndose una biomasa promedio de  $0.104 \pm 0.070$  de DO a 605 nm al final de la experimentación, determinando que las cepas tienden a tolerar a estas condiciones pero con un bajo incremento de biomasa.

Analizando de manera global el comportamiento de las cepas de interés (BAL) en relación a la cepa comercial (Testigo) se observa que la mayor producción de biomasa a las condiciones de 2% y 4% de cloruro de sodio obtuvo la cepa UTN Fa40, mientras que a la condición de 6% de cloruro de sodio la mejor cepa en generar biomasa fue UTN Fa37; estableciendo que en el desarrollo de la biomasa de esta cepa no hubo incidencia de los factores cloruro de sodio y temperatura. De igual manera se encontró que la temperatura de incubación y el cloruro de sodio sí influye en la producción de biomasa de la cepa UTN Fa39.



## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

Es la primera investigación que muestra la presencia de bacterias ácido lácticas en frutos silvestres nativos recolectados en la estación experimental La Favorita de la UTN.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de tinción Gram (+), catalasa (-), producción de sulfuro (-), indol (-), movilidad (-) y producción de CO<sub>2</sub> de glucosa (+); se clasificó a las cepas fenotípicamente en los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Siendo estas pruebas básicas e indispensables en la identificación de bacterias ácido lácticas.

El ensayo bioquímico de tolerancia a bilis muestran que las cinco cepas en estudio son tolerantes al 0.3% bilis, obteniéndose un valor promedio en la supervivencia de 9.148 log UFC/ml, siendo muy similar con el probiótico comercial de 9.352 log UFC/ml; concluyendo que estas cepas sobreviven y se desarrollan en medios que contienen bilis ya que utilizan los componentes como nutrientes para su crecimiento.

Los resultados del ensayo bioquímico en condiciones ácidas, indica que las cepas tienen la capacidad de sobrevivir en un rango de pH ácido de 2.5 a 4.5. Obteniéndose un valor promedio de supervivencia de 2.238 log UFC/ml en la condición más ácida (pH de 2.5), resultando un valor favorable al ser comparado con el probiótico comercial que sobrevive en la cantidad de

1.619 log UFC/ml; por lo que se concluye que las cinco cepas de estudio sobrevivirían a las condiciones acidas extremas en el tracto gastrointestinal.

De acuerdo con los resultados de evaluación del crecimiento a las diferentes temperaturas de incubación, se concluye que las cinco cepas crecen a la temperatura de 37 °C; pero que también crecen a las temperaturas extremas (15 y 45 °C), lo que indica que las bacterias cumplen un requisito más para ser consideradas como probióticos.

En la investigación las cinco cepas en estudio toleran diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2-6%) y diferentes temperaturas de incubación (15, 37 y 45 °C), del análisis de resultados se concluye que las cinco cepas sobreviven inclusive en concentración alta (6% de NaCl), ya que presentan valores promedios de supervivencia a 15 °C de 7.385 log UFC/ml, a 37 °C de 7.690 log UFC/ml y a 45 °C el valor de 5.413 log UFC/ml, siendo similares al probiótico comercial de lo que se deduce que las cinco cepas soportarían tanto en la digestión, en la viabilidad de tratamientos térmicos así como también procesos de producción ya que cumplen con los requisitos imprescindibles a ser considerados microorganismos probióticos.

De acuerdo con los análisis funcionales, la cepa denominada UTNFa37 tiene las mejores características probióticas, debido a su alta tolerancia a: ácidos, bilis, temperaturas y cloruro de sodio.

De los resultados del estudio *in vitro* se concluye que las bacterias de interés, presentan características probióticas deseables; demostradas por su capacidad para tolerar la bilis a una concentración fisiológica y altas condiciones ácidas, con lo cual se acepta la Hi: “las cepas aisladas de frutos silvestres nativos tienen capacidad probiótica”.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

De las conclusiones planteadas en base a las variables establecidas en la presente investigación sobre la evaluación de la capacidad probiótica de las cepas obtenidas a partir de frutos silvestres nativos, se permite sugerir las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios similares al presente con otras cepas obtenidas de frutos nativos de otros sectores para evaluar sus características probióticas y obtener un banco de microorganismos que puedan ser una valiosa fuente de diversidad genética.
- Se recomienda realizar un estudio genotípico para la identificación precisa de las cepas de bacterias a nivel de especie.
- Se recomienda determinar la viabilidad de las cepas en estudio a diferente temperatura de almacenamiento, para su futuro uso en la industria farmacológica y alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, N., & Prakash, A. (2013). Environmental Biotechnology Lab, Department of Zoology, Dayalbagh educational Institute, Agra-282005 . *Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Products and Their Antimicrobial Activity against Staphylococcus aureus*, 39-42.
- Aguirre Rodríguez, A. C., & Moreno Cardozo, J. H. (2012). Biotechnological Aspects in the Selection of the Probiotic Capacity of Strains. En A. C. Aguirre Rodríguez, & J. H. Moreno Cardozo, *Probiotics* (págs. 583-598). Colombia: INTECH.
- Álvarez-Olmos, M., & Oberhelman, R. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. En M. Álvarez-Olmos, *Clin Infect Dis* (págs. 1567-1576).
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J., & Martínez-Henández, D. (2004). Probióticos. *REV ESP QUIMIOTERAP*, 131-139.
- Aquiahuatl Ramos, M. d., Volke Sepúlveda, T., Prado Barragán, L. A., Shirai Matsumoto, K., Ramírez Vives, F., & Salazar González, M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general. En M. d. Aquiahuatl Ramos, *Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general* (págs. 12-78). Meéxico, D.F: Printed in Mexico.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, Y., & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género lactobacillus extraídas del tracto intestinal de animas de granja. *Revista Científica FCV-LUZ Vol. XX*, 161-169.
- Beasley, S. (2004). Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*, 6.
- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., & Raffatellu, M. (2013). Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harb Perspect Medicine*, 1-16.
- Beltrán, G., Cuamacas, D., & Rosero, B. (2009). Mirada Ecológica de la flora y fauna de la estación experimental La Favorita. En G. Beltrán, *Mirada Ecológica* (págs. 7,1-47). Ibarra: Imprenta Universitaria.
- Buruleanu, L. C., Bratu, M. G., Manea, L., Avram, D., & Nicolescu, C. L. (2013). Fermentation of vegetales juice by Lactobacillus Acidophilus LA-5. *Intech open science*, 173-194.
- Cerón, C. (2013). *Manual de botánica sistemática, etnobotánica y metodos de estudio del Ecuador*. Quito: Editorial Univeritaria UCE.

- Cultimed. (2014). Programa completo de productos. En I. C. Técnica, *Manual Básico de Microbiología* (págs. 139-190). Panreac.
- Dairy Foundation, B. (1997). The probiotic effects of lactic acid bacteria. *Nutrition research*, 1-6.
- De la Rosa Fraile, M., Prieto Prieto, J., & Navarro Marí, J. M. (2011). Microbiología en ciencias de la salud Conceptos y aplicaciones Tercera edición. En M. De la Rosa Fraile, J. Prieto Prieto, & J. M. Navarro Marí, *Microbiología en ciencias de la salud Conceptos y aplicaciones Tercera edición* (págs. 16, 1-47). Barcelona, España: Elsevier España, S.I.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balsey, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Quito: Quito y Aarhus.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*, 130.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied microbiology*, 966-975.
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En E. Cercenado, & R. Cantón, *Procedimientos en Microbiología Clínica* (págs. 4-52). Madrid: EIMC.
- Fordes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2009). Bailey y Scott Diagnóstico Microbiológico. En B. A. Fordes, D. F. Sahm, & A. S. Weissfeld, *Bailey y Scott Diagnóstico Microbiológico 12a Edición* (págs. 73-74). Madrid, España: Médica Panamericana.
- Génova, C. I. (2005). La identificación bacteriana. *Preparadores de oposiciones para la enseñanza*, 20.
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *INTECH*, 197-216.
- Hoque, M. Z., Akter, F., Hossain, K. M., Rahman, M. M., Billah, M. M., & Islam, K. D. (2010). Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp. From Selective Regional Yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 39-46.
- INAMHI. (2014). *Intituto Nacional de Metereología e Hidrología*. Quito.

- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Karimi Torshizi, M. A., Aminafshar, M., & Maohamadi, M. (2012). Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour buttermilk in Iran. *European journal of food research and review*, 79-92.
- Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2006). Koneman Diagnóstico microbiológico 6a Edición. En E. W. Koneman, *Koneman Diagnóstico microbiológico 6a Edición* (págs. 185-186). Madrid España: Médica Panamericana.
- Lee, Y., & Salminen, S. (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. Second Edition ed. A John Wiley y Sons I, Publication, Editor. New Jersey.
- Martins, F., Ferreira, F., Penna, F., Rosa, C., Drummond, R., Neves, M., & Nicol, J. (2005). Estudio do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces Cerevisiae* a través de testes in vitro. *Revista de Biologia e Ciencias da terra*, 11(2):79-89.
- Microbiología. (2015). Bloque II. Tema I: Bacterias lácticas. *Seguridad e Higiene*, 1-3.
- Modificado de atlas, R. (1995). Principles of microbiology. En *Principles of microbiology*. ST Louis: Mosby.
- Nuez, F. (2010). *La agrobiodiversidad y el proceso sociocultural antes de la "Revolución Verde"*. Barcelona: Fundación Miguel Agustín.
- Pedersen, C., Jonsson, H., Lindberg, E., & Roos, S. (2004). Microbiological characterization of wet wheat distillers grain, with focus on isolation of Lactobacilli with potential as probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70,1522-1527.
- Peréz Conesa, D. (2003). Adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral. *Tesis Doctoral*, 62, 1-333.
- Powthong, P., & Suntornthiticharoen, P. (2013). Anticardiac and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from chicken intestine, entrails of swine, and soil against gastrointestinal and urogenital pathogens. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 1-18.
- Ramirez-Chavarin, M. L., Wachter, C., Eslava-Campos, C. A., & Perez Chabela, M. L. (2013). Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolate from cooked meat products. En M. L. Ramirez-Chavarin, *International Food Research Journal* (págs. 991-1000). México: Iztapalapa.
- Real Academia Española. (miercoles de Octubre de 2015). *Real Academia Española*. Obtenido de Diccionario de la lengua española: <http://dle.rae.es/?id=IXxev3t&o=h>

- Rios, M. (1993). *Plantas útiles en el noroccidente de la provincia de pichincha Segunda edición*. Quito: Abya-Yala.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. A. (2009). Tinción y observación de microorganismos. *Universidad Tecnológica Nacional*, 1-9.
- Schrezenmeir, J. M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics - approaching a definition. *Probiotics, prebiotics and symbiotics - approaching a definition*, 1,73:361-4.
- Thomas, K. C., Hynes, S. H., & Ingledew, M. W. (2002). Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. 1616-1623.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología 9a Edición. En G. J. Tortora, *Introducción a la Microbiología 9a Edición* (pág. 137). Madrid, España: Médica Panamericana, S.A.
- UTN, L. d. (2014). *Estación Experimental La Favorita Bioprospección de Cepas Bacterianas*. Ibarra.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphastic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. En P. Vandamme, *Polyphastic taxonomy* (págs. 60: 407-438).
- Victoria-León, T., Totosaus, A., Guerrero, I., & Pérez-Chabela, M. L. (2006). Efectos de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *CYTA Journal of Food*, 135-141.
- Vishwa Vidyapeetham, U. A. (26 de Octubre de 2015). *VALUE @ Amrita*. Obtenido de Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education: <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>

## ANEXOS

### CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS FRUTOS

#### ANEXO 1. Clasificación taxonómica de los frutos silvestres nativos

Tabla 59. Fruto 1

<i>Cherry; Sacha Tarqui</i>	
<b>Reino</b>	no identificado
<b>Phylum</b>	no identificado
<b>Clase</b>	no identificado
<b>Orden</b>	no identificado
<b>Familia</b>	no identificado
<b>Género</b>	no identificado
<b>Especies</b>	no identificado
Fuente:	



Gráfico 29. Fruto Sacha Tarqui o Cherry

Tabla 60. Fruto 2

<i>Hamelia axillaris Sw.</i>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida - Dicotiledóneas
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Rubiales
<b>Familia</b>	Rubiaceae - familia de Madder
<b>Género</b>	Hamelia Jacq. - Hamelia Hamelia axillaris Sw. -
<b>Especies</b>	Balsamillo
Fuente: (Cerón, 2013)	



Gráfico 30. Fruto Hamelia axillaris Sw

Tabla 61. Fruto 3

<i>Cordia cylindrostachya</i>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Boraginaceae
<b>Género</b>	Cordia
<b>Especies</b>	Cordia cylindrostachya
Fuente: (Cerón, 2013)	



Gráfico 31. Fruto Codrdia cylindrostachya



**Tabla 62.** Fruto 4

***Bactris gasipaes Kunth***

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Monocotyledoneae
<b>Orden</b>	Arecales
<b>Familia</b>	Arecaceae
<b>Género</b>	Bactris
<b>Especies</b>	Bactris gasipaes Kunth

Fuente: (Cerón, 2013)



**Gráfico 32.** Fruto Bactris gasipaes kunth

**Tabla 63.** Fruto 5

***Solanum quitoense Lam.***

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	Solanum
<b>Especies</b>	Solanum quitoense

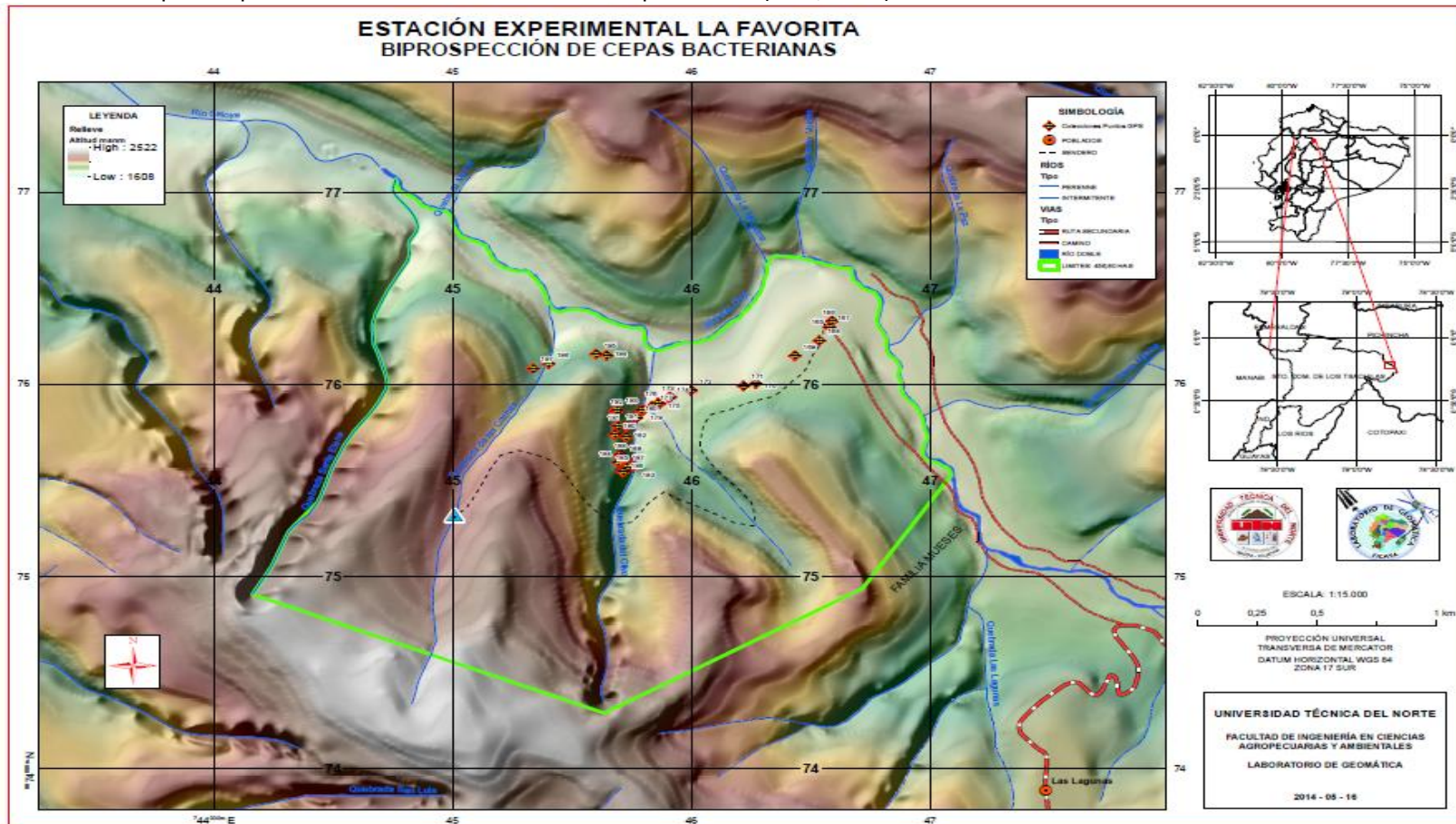
Fuente: (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balsey, 2008)



**Gráfico 33.** Fruto Solanum quitoense Lam

## ANEXO 2. Mapa geográfico de la estación experimental

Gráfico 34. Mapa con puntos de muestras de la estación Experimental (UTN, 2014)



### **ANEXO 3.** Procedimiento para Tinción Gram

En la preparación del frotis, se añade una gota de agua estéril en el portaobjeto, por lo tanto coger con un asa un poco de la muestra o caldo MRS y frotar bien en el agua hasta homogenizar. Procediendo a secar, para la tinción se cubre el frotis de la muestra problema con 2 gotas de cristal violeta durante 60 segundos. Por consiguiente lavar cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Otro de los pasos es eliminar el exceso de agua y cubrir el frotis con 2 gotas de lugol por 30 segundos y se lava con precaución el frotis con agua, se inclina el portaobjetos aplicando gota a gota el decolorante alcohol cetona hasta que no fluya más colorante y lavando de manera inmediata con agua. Por último se aplica 2 gotas de safranina durante 30 segundos, lavando de nuevo con agua; ayudando a quitar el exceso de agua procediendo a el secado al aire o con la llama del mechero Aquiahuatl Ramos, et al., (2012).

### **ANEXO 4.** Procedimiento para la determinación de la actividad de catalasa

Preparar peróxido de hidrogeno al 30%, de esta solución poner una gota de agua sobre un portaobjetos; suspender o frotar una colonia obtenida y ver la reacción.

### **ANEXO 5.** Procedimiento para Test de SIM

Según Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) para el test de SIM es inocular por picadura hasta el fondo de los tubos, cada uno con agar SIM (sulfuro, indol y motilidad). Siendo estos incubados a 35 °C durante 24 a 48 horas y pasando a realizar observaciones a las 24 horas.

### **ANEXO 6.** Procedimiento para evaluar la producción de gas CO<sub>2</sub> de glucosa

Preparar MRS caldo con el 1% de glucosa, e inocular cada bacteria aislada por 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas llevar todas las muestras a la cámara de flujo laminar y el asa calentar (hasta rojo), e introducir rápidamente el asa en cada tubo, observando si presenta formaciones de burbujas alrededor del asa caliente. Evaluar la formación de gas mediante la formación de

burbujas en el medio. Para de esta manera separa las formadoras de gas ante las que no forman el gas. Si un organismo prueba su heterofermentativa, las burbujas de CO<sub>2</sub> evolucionaran cerca del asa Aquiahuatl Ramos, et al., (2012).

#### **ANEXO 7.** Protocolos para evaluar la tolerancia a bilis

En otros estudios para analizar el crecimiento de las bacterias en bilis se utiliza dos tipos de sales biliares (extracto de bilis porcina y ácido taurocólico). Cada cepa se inocula en MRS caldo y se incuba a 35° ± 2° C durante 24 horas. Después de la incubación inicial, 100 µl de cada suspensión se inocula en 10 ml de MRS caldo complementado con 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 o 2.0% de extracto de bilis porcina, y se incuba a 35° ± 2 °C durante 7 horas. El crecimiento se controló cada hora y se midió la absorbancia a 600 nm Pedersen, Jonsson, Lindberg, & Roos, (2004); Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013).

Para evaluar la tolerancia a las sales biliares, se prepara un medio de cultivo adecuado para el microorganismo a ser evaluado y se complementa con sales biliares (bilis Oxgall DIFCO®) obteniendo diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, y 0.3% (p/v)). A partir de entonces, es inoculado con una suspensión previamente obtenida del microorganismo equivalente a 10<sup>8</sup> ufc/ml. Las muestras se incuban en condiciones ideales para cada microorganismo. Al completar el período de incubación, la biomasa se cuantifica a través de la técnica de recuento en placa Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, (2012).

Preparar MRS caldo y complementar con bilis de vacuno (0.3%). Cada cepa se inocula en MRS caldo y se incuba a 37 C durante 24 horas. Después de la incubación inicial, se toma 50µl de cada suspensión y se inocula en 5 ml de MRS caldo con 0.3 % de bilis durante 4 horas. El crecimiento se controla cada 30 minutos y se mide la absorbancia a 605 nm. Al completar el periodo de incubación, la biomasa se cuantifica a través de la técnica de recuento en placa.

## **ANEXO 8. Protocolos para evaluar la tolerancia a pH**

La tolerancia a pH se evalúa ajustando el medio de cultivo a diferentes intervalos de pH (2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, y 5.0) con HCl 1N. Cada tubo se inocula con una suspensión del microorganismo a ser evaluado en una concentración previamente obtenida de  $10^8$  ufc/ml. Las muestras se incuban a condiciones de 37 °C para cada microorganismo. Una vez hecho completo el período de incubación, los recuentos de placas se llevaron a cabo a través de la técnica de recuento en placa Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, (2012).

Según Ramirez-Chavarin, et al., (2013) evaluaron la tolerancia de cepas a niveles de pH bajos siguiendo el método de Ehrmann, et al., (2002). En pocas palabras, cada cepa es inoculada en MRS caldo, y se incuban a  $35^{\circ} \pm 2$  °C durante 24 horas. Estos se inoculan en Medio de cultivo MRS fresco y de nuevo se incuban a  $35^{\circ} \pm 2$  °C durante 24 horas. Después de la incubación, se centrifugan a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, la biomasa se enjuaga dos veces con solución PBS estéril [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10.9 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.2 g/L), NaCl (90 g/L), pH 7.2], pH ajustado a 7.2 y luego se re suspendió en PBS.

Cada cepa se diluye a 1/10 en PBS y pH ajustado a 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 antes de incubar durante 1, 2 y 4 horas. Las cepas se inoculan luego en medio MRS, se incuban en condiciones anaerobias a  $35^{\circ} \pm 2$  °C durante 24 horas, y la supervivencia cuantificado por conteo en placa. De acuerdo con lo reportado por Victoria-León, Totosaus, Guerrero, & Pérez-Chabela, (2006), crecimiento abundante fue considerado por encima de 300 ufc/ml.

Preparar medio de cultivo MRS caldo, distribuir 5 ml en tubos de ensayo. Inocular una colonia de las placas que contienen las bacterias puras caracterizadas e incubar a las temperaturas adecuadas para cada microorganismo por 24 horas. La segunda siembra se realiza tomando 500 µl de la primera siembra incubando a 37 °C por el tiempo de 4-5 horas, verificando el crecimiento con la densidad óptica de 1 DO a 605nm. Esto ayudó a controlar la biomasa con la cual se realizó el experimento.

Centrifugar la segunda siembra, se centrifuga a 5800 rpm por 3 minutos, ayudando a separar el sobrenadante y las colonias de bacterias. Estas bacterias fueron trasvasadas al medio PBS. El PBS o medio tampón fosfato salino está compuesto por: 8g de NaCl, 0.2 KCl, 1.44 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un litro. Esta solución se prepara en diferentes frascos para ser fijados los diferentes pH, tales como: el normal de 7.4 y ácidos de 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 con ayuda del ácido clorhídrico al 0.1N y 1N. Distribuir la cantidad de 5ml en tubos dl pH normal y de los medios ácidos la cantidad de 4.5ml en cada tubo.

En los tubos con medio PBS con 7.4 de pH colocar las colonias centrifugadas, homogenizar y proceder con la siembra a los medios ácidos. Pipetear la cantidad de 500µl a cada uno de los tubos que contienen los diferentes medios ácidos e incubar a la temperatura de 37 °C por un periodo de 3 horas.

Sembrar en placas para el recuento de colonias. La primera siembra fue de la primera solución de PBS a pH normal; se realiza diluciones. De la última dilución se tomó 100µl sembrar por vertido y dispersar con una varilla de dispersión por toda la placa. Las placas incubar a las temperaturas óptimas de crecimiento por 24 horas.

La siembra del resto de medios ácidos se realizó durante el periodo de 1, 2 y 3 horas. Para cada una de las siembras se realizó la técnica de diluciones para facilitar el recuento, la técnica por vertido y dispersión en la siembra. Las placas incubar a las temperaturas óptimas de crecimiento durante 24 horas. El conteo de las placas se realizó con la ayuda del contador de colonias.

#### **ANEXO 9.** Protocolo para el crecimiento a diferentes temperaturas

Para la determinación del crecimiento en varias temperaturas, se utiliza el caldo MRS esta se inocula con una sola colonia fresca del cultivo BAL durante la noche y se incuba a 25°, 37°, y 45 °C durante 24h. La prueba fue realizada por triplicado y cuya finalidad de la prueba es dar las condiciones necesarias para que estas cepas puedan crecer en biomasa Powthong & Suntornthiticharoen, (2013).

Preparar MRS caldo, inocular la colonia aislada e incubar a 37 °C durante 24 horas. El crecimiento se verificó al medir la absorbancia a 605nm. De la primera siembra se transfiere a medio MRS caldo la cantidad de 50 µl e incubar a 15°, 37° y 45 °C por 24 horas. La absorbancia se tomó durante el lapso de tiempo establecido (0, 3, 6, 12, 18 y 24 horas). Para realizar la curva de crecimiento respectiva.

#### **ANEXO 10.** Protocolo para evaluar la tolerancia a cloruro de sodio

Para la determinación de la tolerancia a NaCl de las BAL, el MRS caldo se ajusta con diferentes concentraciones 2, 4, 6% (p/v) de NaCl. Después de la esterilización, cada tubo de ensayo se inocula con una colonia de la noche anterior del cultivo de BAL fresco y se incuba a 30 °C. El crecimiento fue evaluado a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas. La prueba se realiza por triplicado Powthong & Suntornthiticharoen, (2013).

Es el experimento combinado, ayudando a determinar el factor que inhibe el crecimiento de las bacterias.

Preparar MRS caldo e inocular colonias aisladas en el medio e incubar a las temperaturas óptimas durante 24 horas. De la primera siembra transferir 50 µl al medio MRS con NaCl al 2, 4 y 6% en relación a la cantidad de medio preparado. Al ser distribuido en los tubos membretados se procede a incubar a las condiciones de temperatura de 15°, 37° y 45° C por el lapso de tiempo de 24 horas. La medición de la absorbancia se realiza en los tiempos de 0, 3, 6, 12, 18 y 24 horas a 605 nm.

Al final del periodo de incubación se procede a realizar la siembra en placas. Al igual que los anteriores experimentos se realiza diluciones en agua destilada llegando a finalizar en una sexta dilución y se procede a inocular 100 µl por vertido y distribuido por la placa con la ayuda de una varilla de vidrio. Se incubó a las temperaturas óptimas de crecimiento por 24 horas y se llevó acabo el recuento.

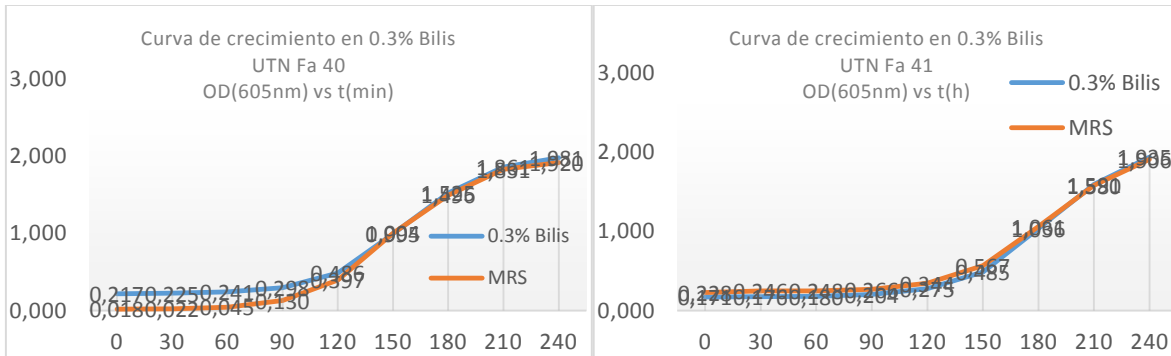
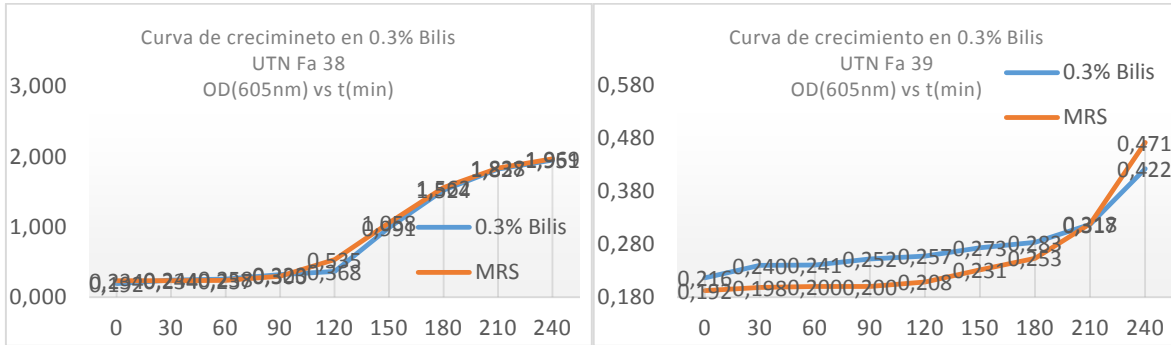
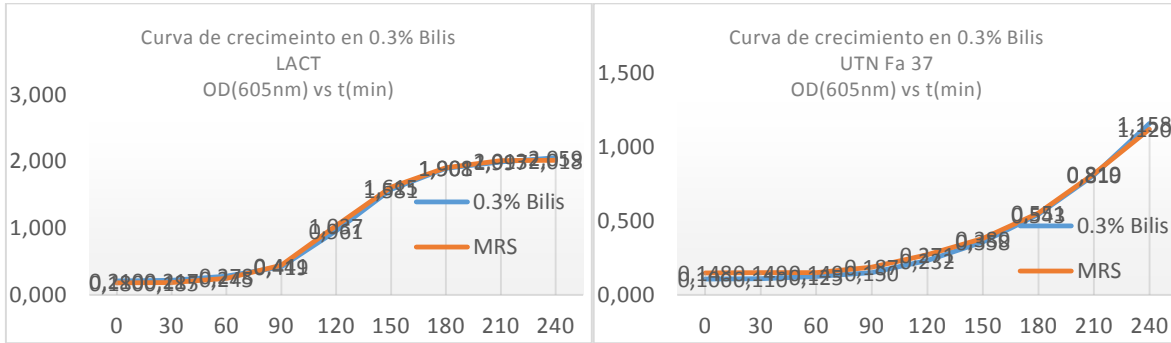
**ANEXO 11.** Datos individuales de las bacterias evaluadas a la tolerancia en bilis

**Tabla 64.** Datos promediados de la densidad óptica (DO) a 605 nm de 5 ml de cultivo

Cepa	Tiempo		0.3% Bilis Media DO bilis	Cepa	Tiempo		0.3% Bilis Media DO bilis
	(min)	MRS			(min)	MRS	
LACT 2.204	0	0.180	0.210	UTNFa39 1.286	0	0.192	0.216
	30	0.185	0.217		30	0.198	0.240
	60	0.245	0.278		60	0.200	0.241
	90	0.441	0.419		90	0.200	0.252
	120	1.037	0.961		120	0.208	0.257
	150	1.615	1.581		150	0.231	0.273
	180	1.908	1.901		180	0.253	0.283
	210	2.013	1.997		210	0.318	0.317
UTNFa37 1.684	0	0.148	0.106	UTNFa40 2.099	0	0.018	0.217
	30	0.149	0.110		30	0.022	0.225
	60	0.149	0.125		60	0.045	0.241
	90	0.187	0.150		90	0.130	0.298
	120	0.271	0.232		120	0.397	0.486
	150	0.380	0.358		150	1.004	0.995
	180	0.551	0.543		180	1.496	1.525
	210	0.819	0.810		210	1.831	1.861
UTNFa38 2.096	0	0.234	0.192	UTNFa41 2.221	0	0.228	0.171
	30	0.234	0.244		30	0.246	0.176
	60	0.237	0.258		60	0.248	0.180
	90	0.300	0.323		90	0.266	0.204
	120	0.535	0.368		120	0.344	0.275
	150	1.058	0.991		150	0.567	0.485
	180	1.562	1.524		180	1.061	1.036
	210	1.838	1.827		210	1.580	1.591
240	1.969	1.951	240	1.906	1.935		



**ANEXO 12. Gráficas individuales de las bacterias evaluadas a la tolerancia en bilis**



**ANEXO 13.** Datos de las cepas en diferentes pH para la ADEVA

**Tabla 65.** Datos logarítmicos de las unidades formadoras de colonias (log UFC/ml)

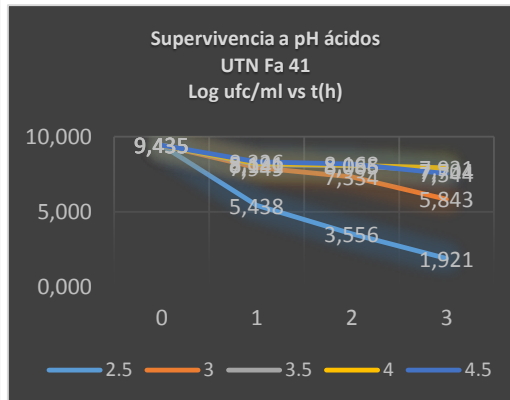
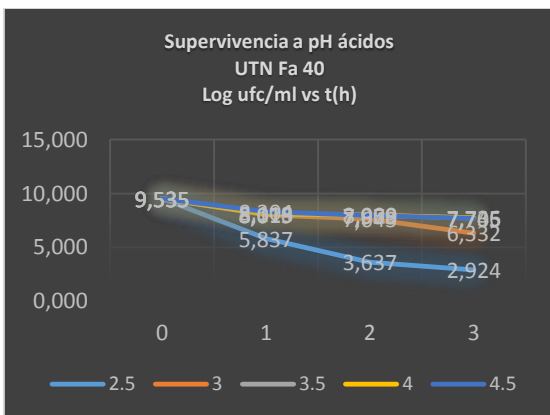
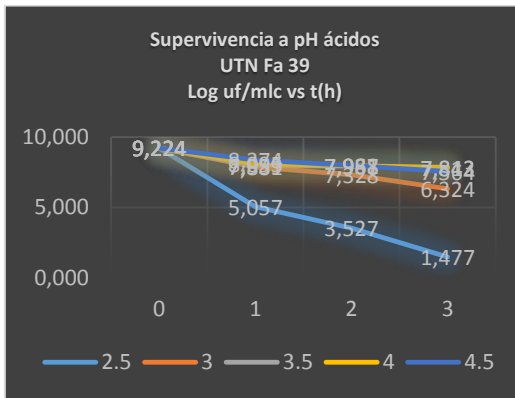
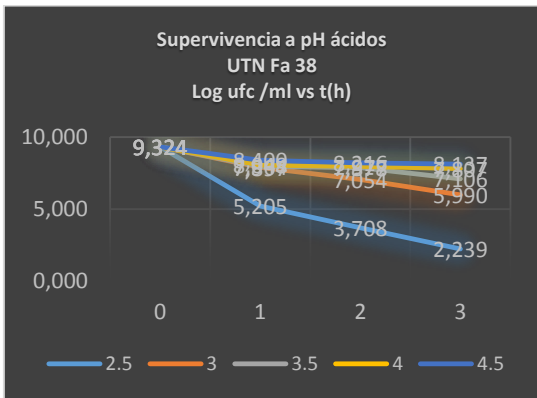
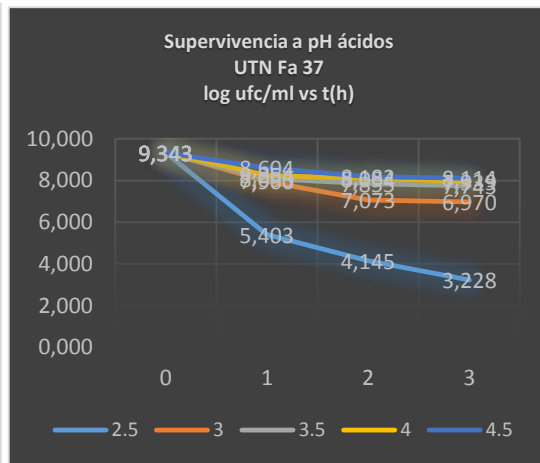
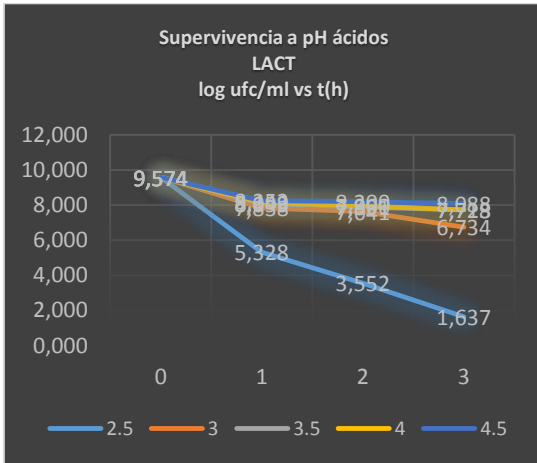
Cepas	pH	Repeticiones			Sumatoria	log UFC Media
		I log UFC	II log UFC	III log UFC		
LACT	2.5	1.477	1.778	1.602	4.857	1.619
	3	6.739	6.729	6.733	20.201	6.734
	3.5	7.709	7.719	7.725	23.154	7.718
	4	7.723	7.720	7.728	23.170	7.723
	4.5	8.093	8.090	8.079	24.263	8.088
UTNFa37	2.5	3.223	3.233	3.228	9.684	3.228
	3	6.972	6.970	6.968	20.911	6.970
	3.5	7.742	7.748	7.738	23.228	7.743
	4	7.941	7.937	7.939	23.816	7.939
	4.5	8.107	8.107	8.127	24.342	8.114
UTNFa38	2.5	2.230	2.279	2.204	6.713	2.238
	3	6.000	5.978	5.991	17.969	5.990
	3.5	7.093	7.104	7.121	21.318	7.106
	4	7.799	7.814	7.807	23.420	7.807
	4.5	8.124	8.152	8.134	24.410	8.137
UTNFa39	2.5	1.301	1.602	1.477	4.380	1.460
	3	6.322	6.330	6.320	18.973	6.324
	3.5	7.809	7.812	7.815	23.435	7.812
	4	7.843	7.841	7.847	23.530	7.843
	4.5	7.568	7.580	7.544	22.692	7.564
UTNFa40	2.5	2.908	2.940	2.924	8.772	2.924
	3	6.322	6.340	6.332	18.995	6.332
	3.5	7.734	7.739	7.736	23.208	7.736
	4	7.745	7.744	7.746	23.234	7.745
	4.5	7.724	7.699	7.690	23.113	7.704
UTNFa41	2.5	1.954	1.845	1.954	5.754	1.918
	3	5.845	5.833	5.851	17.529	5.843
	3.5	7.699	7.704	7.709	23.112	7.704
	4	7.928	7.934	7.930	23.793	7.931
	4.5	7.556	7.531	7.544	22.632	7.544
Sumatoria		191.233	191.832	191.544	574.609	6.385

**ANEXO 14.** Datos de las cepas en diferentes pH para las gráficas de supervivencia

**Tabla 66.** Datos logarítmicos para la curva de supervivencia en medios ácidos log UFC/ml

Cepa	T (h)	DO media	CONTROL log UFC media	2.5 log UFC media	3 log UFC media	3.5 log UFC media	4 log UFC media	4.5 log UFC media
LACT	0		9.574	9.574	9.574	9.574	9.574	9.574
	1	1.05		5.328	7.838	8.093	8.149	8.252
	2			3.552	7.641	7.891	7.960	8.200
	3			1.637	6.734	7.718	7.723	8.088
UTNFa37	0		9.343	9.343	9.343	9.343	9.343	9.343
	1	1.059		5.403	7.960	8.093	8.254	8.604
	2			4.145	7.073	7.855	8.094	8.182
	3			3.228	6.970	7.743	7.939	8.114
UTNFa38	0		9.324	9.324	9.324	9.324	9.324	9.324
	1	1.016		5.205	7.897	7.964	8.048	8.400
	2			3.708	7.054	7.878	7.977	8.216
	3			2.239	5.990	7.106	7.807	8.137
UTNFa39	0		9.224	9.224	9.224	9.224	9.224	9.224
	1	1.037		5.057	7.881	7.959	8.095	8.374
	2			3.527	7.328	7.937	7.968	7.981
	3			1.477	6.324	7.812	7.843	7.564
UTNFa40	0		9.535	9.535	9.535	9.535	9.535	9.535
	1	0.999		5.837	8.015	8.079	8.118	8.304
	2			3.637	7.643	7.978	8.000	7.959
	3			2.924	6.332	7.736	7.745	7.705
UTNFa41	0		9.435	9.435	9.435	9.435	9.435	9.435
	1	1.057		5.438	7.949	8.141	8.191	8.326
	2			3.556	7.334	8.066	8.085	8.168
	3			1.921	5.843	7.704	7.931	7.544

**ANEXO 15. Gráficas de la supervivencia individual en diferentes pH ácidos**



**ANEXO 16.** Datos individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación para el ADEVA

**Tabla 67.** Datos de la medición de la densidad óptica (DO) a 605nm de 5 ml de cultivo para la ADEVA

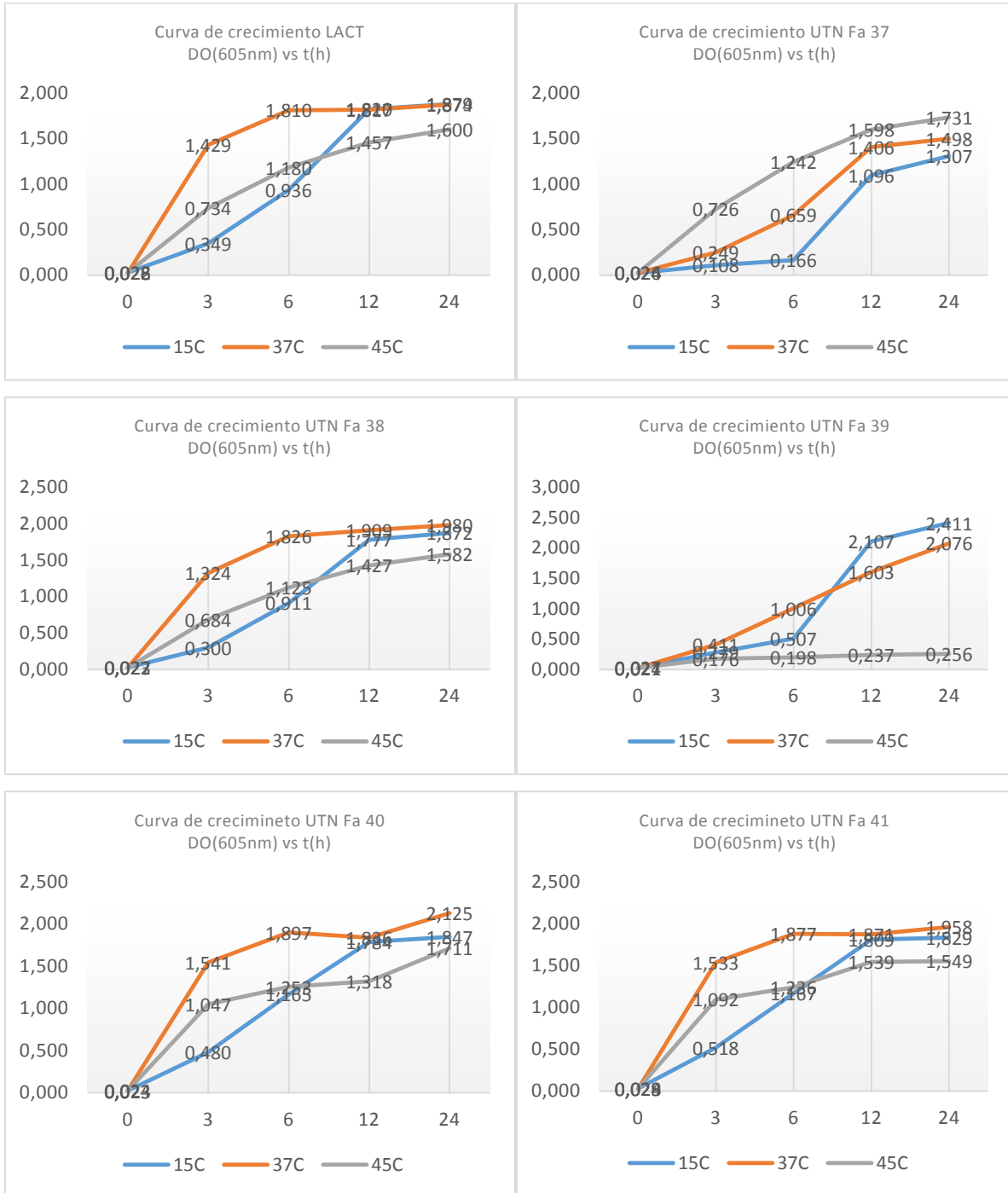
Cepa	Temperatura	Repeticiones			Sumatoria	Media
		I	II	III		
		DO 605nm	DO 605nm	DO 605nm		
LACT	15 °C	1.877	1.876	1.886	5.638	1.879
	37 °C	1.822	1.881	1.917	5.621	1.874
	45 °C	1.602	1.624	1.574	4.801	1.600
UTNFa37	15 °C	1.296	1.293	1.332	3.920	1.307
	37 °C	1.512	1.495	1.485	4.493	1.498
	45 °C	1.720	1.726	1.745	5.192	1.731
UTNFa38	15 °C	1.890	1.839	1.887	5.615	1.872
	37 °C	1.986	1.967	1.987	5.941	1.980
	45 °C	1.564	1.607	1.574	4.746	1.582
UTNFa39	15 °C	2.433	2.407	2.394	7.233	2.411
	37 °C	2.010	2.122	2.096	6.229	2.076
	45 °C	0.249	0.262	0.256	0.768	0.256
UTNFa40	15 °C	1.841	1.868	1.832	5.540	1.847
	37 °C	2.158	2.156	2.060	6.375	2.125
	45 °C	1.740	1.742	1.649	5.132	1.711
UTNFa41	15 °C	1.844	1.831	1.814	5.488	1.829
	37 °C	1.954	1.956	1.962	5.873	1.958
	45 °C	1.571	1.594	1.482	4.648	1.549
Sumatorias		31.070	31.247	30.933	93.251	
Media		1.726	1.736	1.719		1.737

**ANEXO 17.** Datos individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación para las curvas de crecimiento

**Tabla 68.** Datos promediados de la medición de la DO a 605 nm de 5 ml de cultivo

Cepa	tiempo	15 °C media	37 °C media	45 °C media
LACT		0	0.028	0.022
	2.259	3	0.349	1.429
		6	0.936	1.810
		12	1.820	1.817
		24	1.879	1.874
UTNFa37		0	0.024	0.026
	1.882	3	0.108	0.249
		6	0.166	0.659
		12	1.096	1.406
		24	1.307	1.498
UTNFa38		0	0.027	0.022
	2.238	3	0.300	1.324
		6	0.911	1.826
		12	1.777	1.909
		24	1.872	1.980
UTNFa39		0	0.024	0.021
	2.511	3	0.279	0.411
		6	0.507	1.006
		12	2.107	1.603
		24	2.411	2.076
UTNFa40		0	0.024	0.023
	2.275	3	0.480	1.541
		6	1.165	1.897
		12	1.784	1.836
		24	1.847	2.125
UTNFa41		0	0.029	0.024
	2.315	3	0.518	1.533
		6	1.167	1.877
		12	1.809	1.871
		24	1.829	1.958

**ANEXO 18.** Gráficas individuales de las bacterias en medio MRS a diferentes temperaturas de incubación



**ANEXO 19.** Datos de la experimentación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación a diferentes temperaturas de incubación

**Tabla 69.** Datos de la DO a 605 nm al final del experimento

CEPA	TEMPERATURA	% NaCl	Repeticiones DO			Sumatorias	Medias
			I	II	III		
LACT	T 15 °C	2%	1.729	1.715	1.707	5.150	1.717
		4%	1.169	1.357	1.314	3.840	1.280
		6%	0.147	0.143	0.150	0.441	0.147
Sumatoria			3.045	3.215	3.171	9.430	
LACT	T 37 °C	2%	1.816	1.841	1.837	5.493	1.831
		4%	1.333	1.664	1.508	4.505	1.502
		6%	1.043	0.993	0.999	3.036	1.012
Sumatoria			4.192	4.498	4.344	13.033	
LACT	T 45 °C	2%	1.651	1.679	1.704	5.035	1.678
		4%	1.391	1.262	1.318	3.971	1.324
		6%	0.125	0.117	0.130	0.373	0.124
Sumatoria			3.168	3.059	3.153	9.379	
Sumatoria			10.404	10.771	10.667	31.841	
UTNFa37	T 15 °C	2%	0.753	1.078	1.293	3.123	1.041
		4%	0.557	0.544	0.530	1.631	0.544
		6%	0.147	0.145	0.144	0.437	0.146
Sumatoria			1.457	1.767	1.967	5.190	
UTNFa37	T 37 °C	2%	1.455	1.474	1.440	4.368	1.456
		4%	1.242	1.257	1.228	3.727	1.242
		6%	0.157	0.165	0.161	0.484	0.161
Sumatoria			2.854	2.896	2.829	8.578	
UTNFa37	T 45 °C	2%	1.478	1.476	1.475	4.430	1.477
		4%	1.085	1.090	1.094	3.269	1.090
		6%	0.201	0.281	0.220	0.703	0.234
Sumatoria			2.765	2.848	2.790	8.402	
Sumatoria			7.075	7.510	7.585	22.169	
UTNFa38	T 15 °C	2%	1.673	1.694	1.683	5.049	1.683
		4%	1.040	1.051	1.046	3.137	1.046
		6%	0.076	0.077	0.075	0.229	0.076
Sumatoria			2.789	2.822	2.804	8.414	
UTNFa38	T 37 °C	2%	1.754	1.714	1.716	5.183	1.728
		4%	1.620	1.617	1.537	4.774	1.591
		6%	0.674	0.669	0.670	2.014	0.671



Sumatoria			4.048	4.000	3.923	11.970	
UTNFa38	T 45 °C	2%	1.556	1.513	1.582	4.652	1.551
		4%	0.843	0.837	0.843	2.523	0.841
		6%	0.055	0.051	0.052	0.159	0.053
Sumatoria			2.455	2.402	2.478	7.334	
Sumatoria			9.291	9.223	9.204	27.717	
UTNFa39	T 15 °C	2%	2.105	2.146	2.130	6.380	2.127
		4%	0.244	0.191	0.203	0.638	0.213
		6%	0.144	0.154	0.143	0.442	0.147
Sumatoria			2.493	2.491	2.476	7.459	
UTNFa39	T 37 °C	2%	1.105	1.097	1.103	3.304	1.101
		4%	0.324	0.325	0.326	0.975	0.325
		6%	0.173	0.174	0.170	0.518	0.173
Sumatoria			1.602	1.596	1.599	4.796	
UTNFa39	T 45 °C	2%	0.129	0.131	0.130	0.391	0.130
		4%	0.124	0.127	0.126	0.377	0.126
		6%	0.045	0.043	0.043	0.132	0.044
Sumatoria			0.299	0.302	0.300	0.900	
Sumatoria			4.393	4.388	4.374	13.154	
UTNFa40	T 15 °C	2%	1.713	1.714	1.690	5.116	1.705
		4%	1.203	1.421	1.288	3.912	1.304
		6%	0.086	0.082	0.084	0.253	0.084
Sumatoria			3.002	3.217	3.062	9.280	
UTNFa40	T 37 °C	2%	1.795	1.793	1.797	5.384	1.795
		4%	1.556	1.624	1.654	4.834	1.611
		6%	0.992	1.019	0.979	2.991	0.997
Sumatoria			4.343	4.436	4.430	13.208	
UTNFa40	T 45 °C	2%	1.821	1.659	1.766	5.247	1.749
		4%	1.357	1.357	1.349	4.063	1.354
		6%	0.049	0.046	0.049	0.145	0.048
Sumatoria			3.228	3.063	3.165	9.455	
Sumatoria			10.572	10.715	10.656	31.942	
UTNFa41	T 15 °C	2%	1.654	1.670	1.644	4.967	1.656
		4%	1.033	1.127	1.063	3.223	1.074
		6%	0.072	0.070	0.071	0.214	0.071
Sumatoria			2.759	2.867	2.778	8.403	
UTNFa41	T 37 °C	2%	1.749	1.768	1.758	5.274	1.758
		4%	1.441	1.439	1.436	4.316	1.439
		6%	0.850	0.846	0.847	2.544	0.848

Sumatoria			4.040	4.053	4.041	12.133	
UTNFa41	T 45 °C	2%	1.494	1.494	1.495	4.484	1.495
		4%	1.152	1.149	1.152	3.453	1.151
		6%	0.118	0.119	0.121	0.359	0.120
Sumatoria			2.765	2.763	2.769	8.296	0.961
Sumatoria			9.563	9.682	9.587	28.831	
Sumatoria			51.296	52.287	52.071	155.654	

---

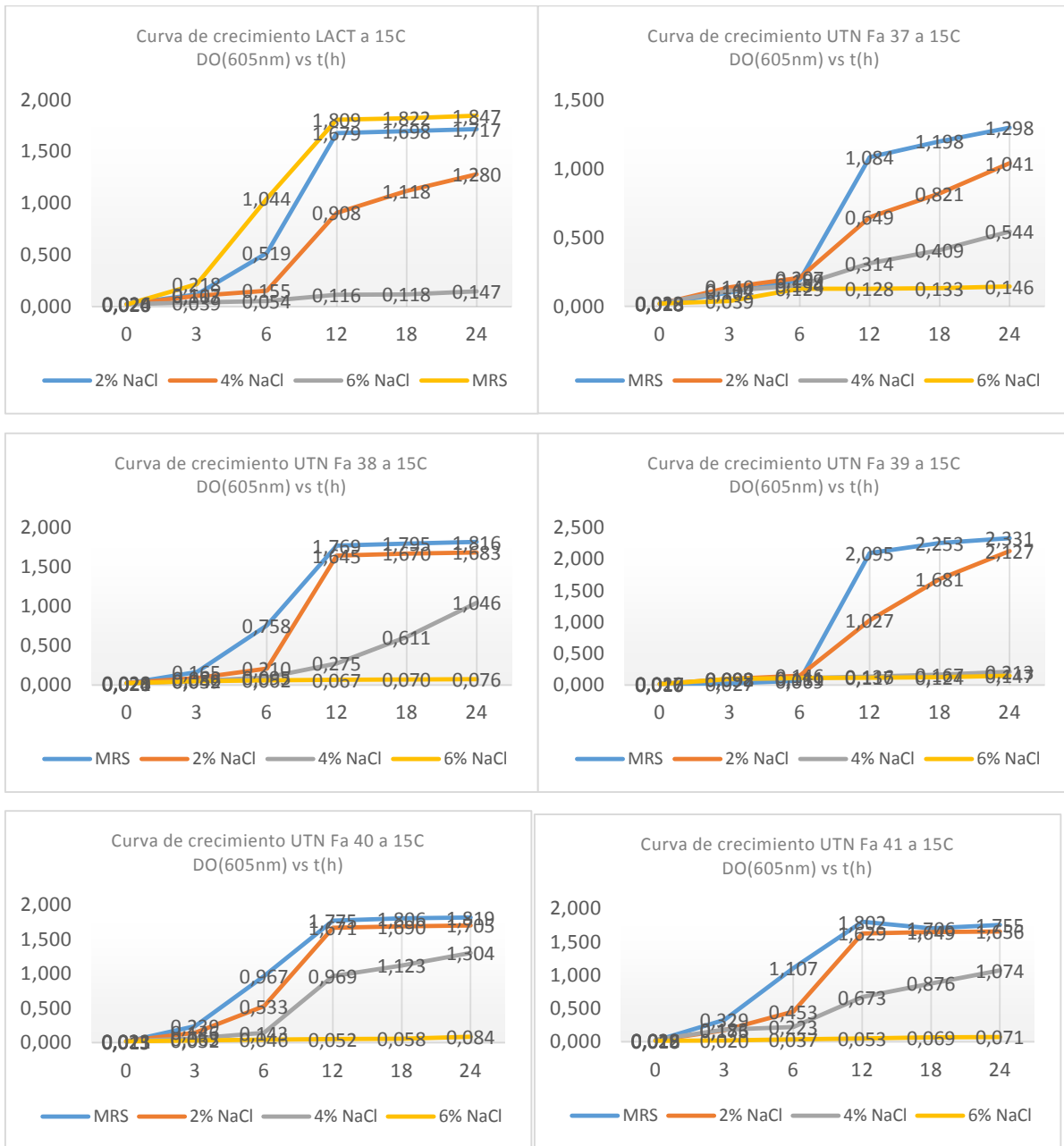
**ANEXO 20.** Datos promedios de la medición de la densidad óptica a 605 nm de 5 ml de cultivo de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación a diferentes temperaturas de incubación

**Tabla 70.** Experimento de diferentes concentraciones de NaCl a diferentes temperaturas de incubación

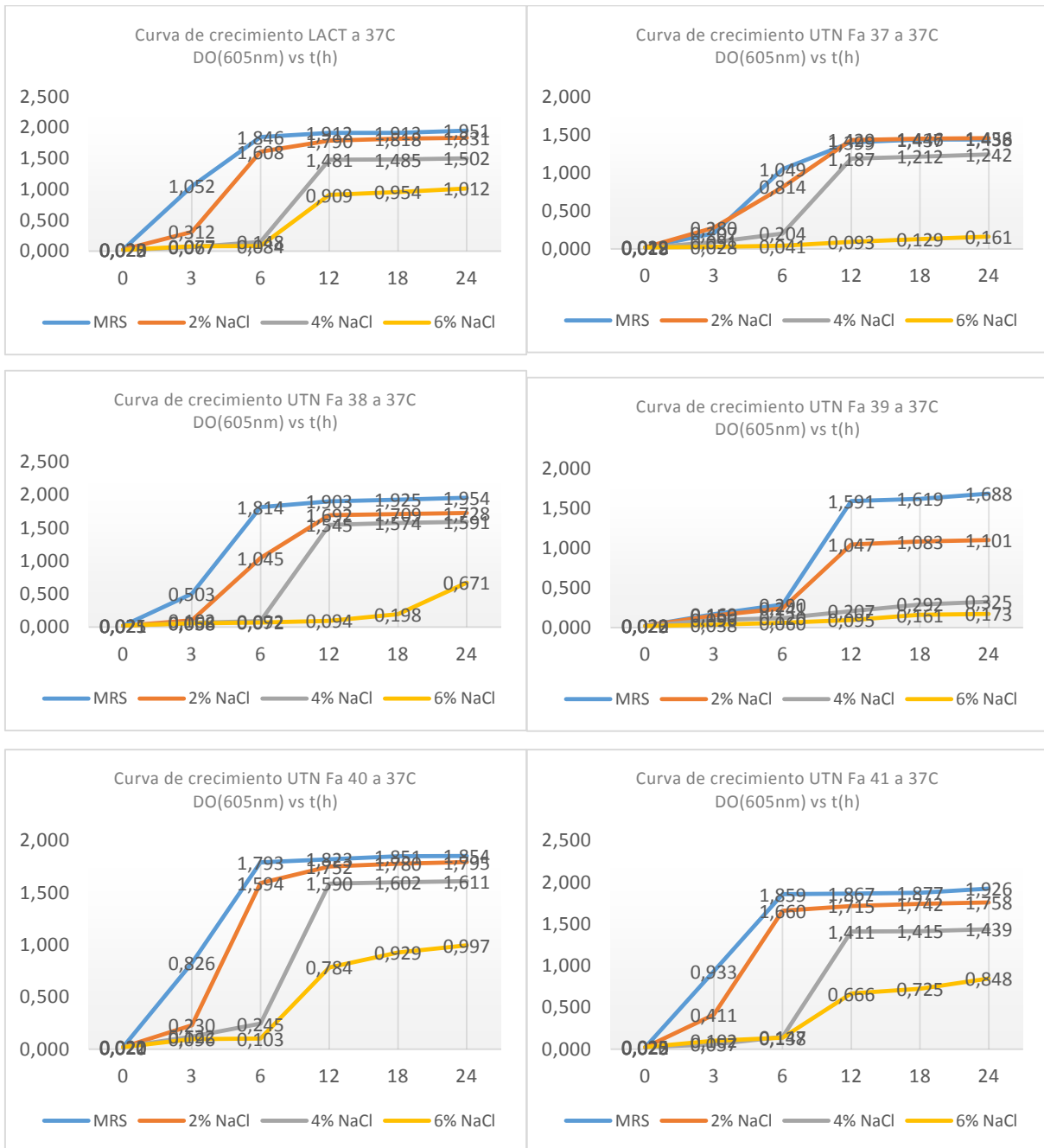
CEPA	T (h)	Experimento					Experimento					Experimento		
		MRS	T 15 °C			MRS	T 37 °C			MRS	T 45 °C			
			2% NaCl	4% NaCl	6% NaCl		2% NaCl	4% NaCl	6% NaCl		2% NaCl	4% NaCl	6% NaCl	
Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media		
LACT	0	0.020	0.026	0.024	0.024	0.025	0.025	0.020	0.022	0.023	0.026	0.022	0.022	
	3	0.218	0.117	0.103	0.039	1.052	0.312	0.067	0.077	0.256	0.156	0.140	0.047	
	6	1.044	0.519	0.155	0.054	1.846	1.608	0.148	0.084	1.207	0.988	0.211	0.062	
2.052	12	1.809	1.679	0.908	0.116	1.912	1.790	1.481	0.909	1.446	1.600	1.326	0.071	
	18	1.822	1.698	1.118	0.118	1.913	1.818	1.485	0.954	1.495	1.623	1.322	0.079	
	24	1.847	1.717	1.280	0.147	1.951	1.831	1.502	1.012	1.528	1.678	1.324	0.124	
UTNFa37	0	0.018	0.018	0.023	0.020	0.022	0.019	0.018	0.022	0.018	0.022	0.018	0.021	
	3	0.102	0.140	0.114	0.039	0.207	0.280	0.091	0.028	0.389	0.391	0.202	0.057	
	6	0.189	0.207	0.154	0.129	1.049	0.814	0.204	0.041	1.319	1.204	0.485	0.102	
1.516	12	1.084	0.649	0.314	0.128	1.399	1.429	1.187	0.093	1.590	1.422	1.041	0.198	
	18	1.198	0.821	0.409	0.133	1.437	1.446	1.212	0.129	1.594	1.433	1.076	0.216	
	24	1.298	1.041	0.544	0.146	1.438	1.456	1.242	0.161	1.633	1.477	1.090	0.234	
UTNFa38	0	0.020	0.028	0.021	0.024	0.021	0.021	0.021	0.025	0.021	0.024	0.021	0.020	
	3	0.165	0.088	0.052	0.049	0.503	0.102	0.068	0.056	0.251	0.102	0.170	0.024	
	6	0.758	0.210	0.095	0.062	1.814	1.045	0.092	0.072	1.322	0.738	0.212	0.026	
2.11	12	1.769	1.645	0.275	0.067	1.903	1.692	1.545	0.094	1.647	1.493	0.735	0.037	
	18	1.795	1.670	0.611	0.070	1.925	1.709	1.574	0.198	1.673	1.506	0.765	0.049	
	24	1.816	1.683	1.046	0.076	1.954	1.728	1.591	0.671	1.721	1.551	0.841	0.053	
UTNFa39	0	0.020	0.016	0.017	0.017	0.023	0.022	0.022	0.020	0.020	0.023	0.019	0.022	
	3	0.027	0.098	0.092	0.098	0.169	0.150	0.096	0.038	0.110	0.024	0.020	0.022	
	6	0.069	0.146	0.111	0.111	0.290	0.241	0.120	0.060	0.117	0.126	0.083	0.029	
1.684	12	2.095	1.027	0.136	0.117	1.591	1.047	0.207	0.095	0.129	0.126	0.118	0.038	
	18	2.253	1.681	0.167	0.124	1.619	1.083	0.292	0.161	0.142	0.127	0.120	0.041	
	24	2.331	2.127	0.213	0.147	1.688	1.101	0.325	0.173	0.147	0.130	0.126	0.044	
UTNFa40	0	0.015	0.023	0.023	0.021	0.021	0.020	0.022	0.020	0.019	0.035	0.021	0.021	
	3	0.239	0.146	0.063	0.032	0.826	0.230	0.122	0.096	0.528	0.208	0.167	0.026	
	6	0.967	0.533	0.143	0.046	1.793	1.594	0.245	0.103	1.154	1.454	0.296	0.031	
2.023	12	1.775	1.671	0.969	0.052	1.823	1.752	1.590	0.784	1.305	1.670	1.245	0.037	
	18	1.806	1.690	1.123	0.058	1.851	1.780	1.602	0.929	1.310	1.687	1.267	0.045	
	24	1.819	1.705	1.304	0.084	1.854	1.795	1.611	0.997	1.345	1.749	1.354	0.048	
UTNFa41	0	0.018	0.022	0.029	0.016	0.020	0.022	0.025	0.023	0.021	0.025	0.020	0.023	

	3	0.329	0.176	0.183	0.020	0.933	0.411	0.057	0.102	0.497	0.127	0.100	0.034
	6	1.107	0.453	0.223	0.037	1.859	1.660	0.147	0.138	1.247	0.935	0.189	0.037
2.045	12	1.802	1.629	0.673	0.053	1.867	1.715	1.411	0.666	1.562	1.443	1.053	0.053
	18	1.706	1.649	0.876	0.069	1.877	1.742	1.415	0.725	1.572	1.451	1.061	0.065
	24	1.755	1.656	1.074	0.071	1.926	1.758	1.439	0.848	1.583	1.495	1.151	0.120

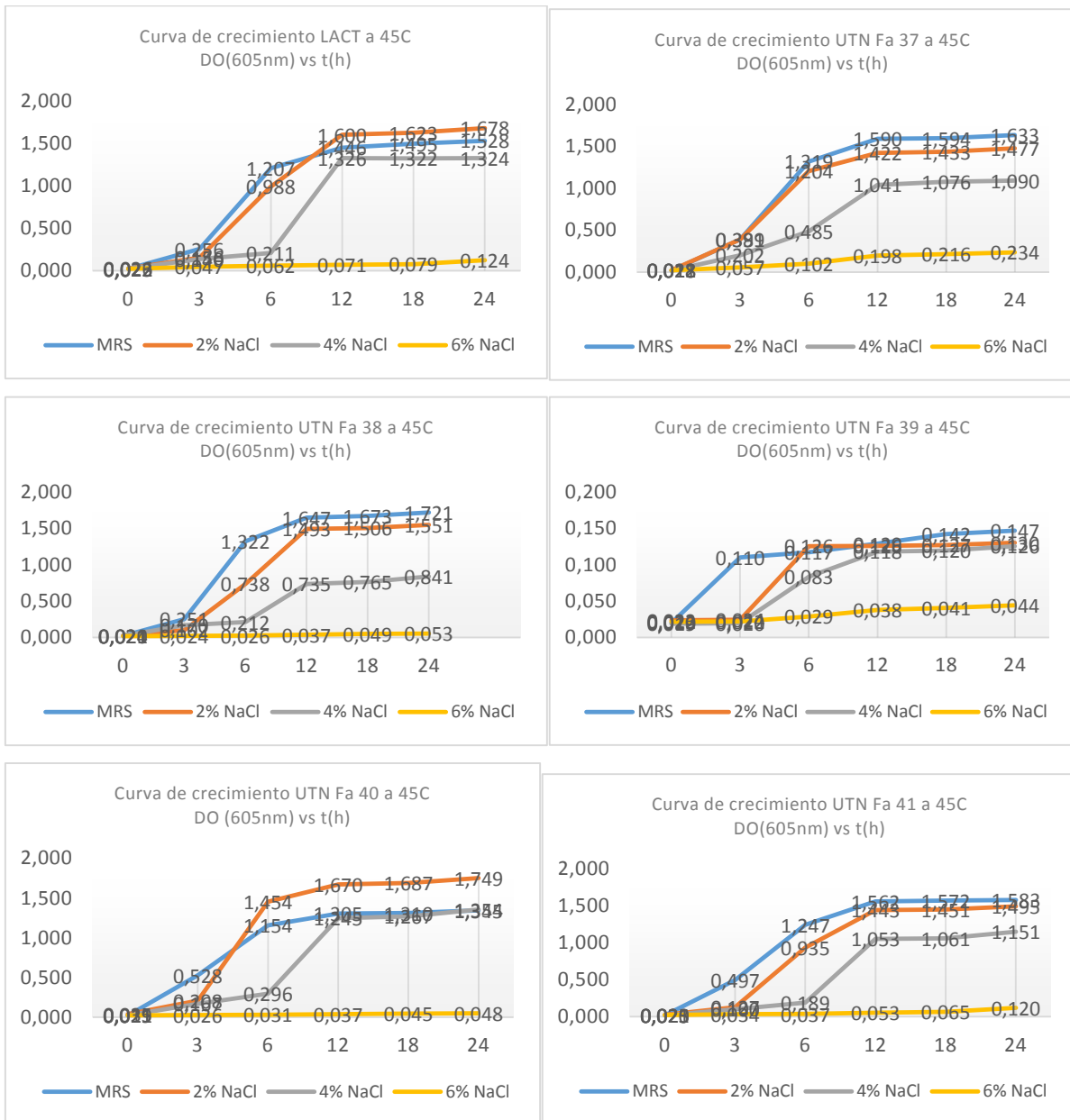
**ANEXO 21. Gráficos individuales a 15 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio**



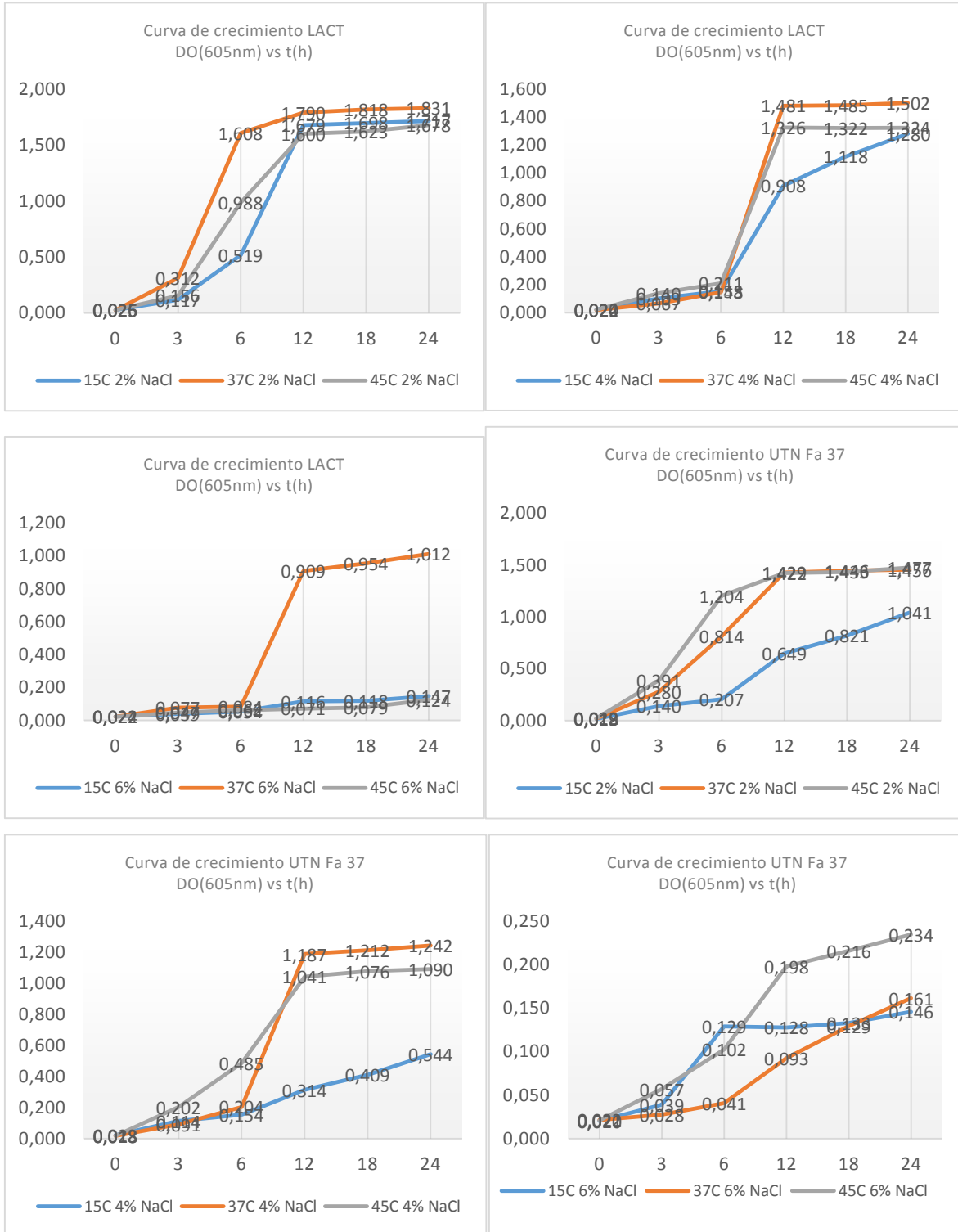
**ANEXO 22. Gráficos individuales a 37 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio**



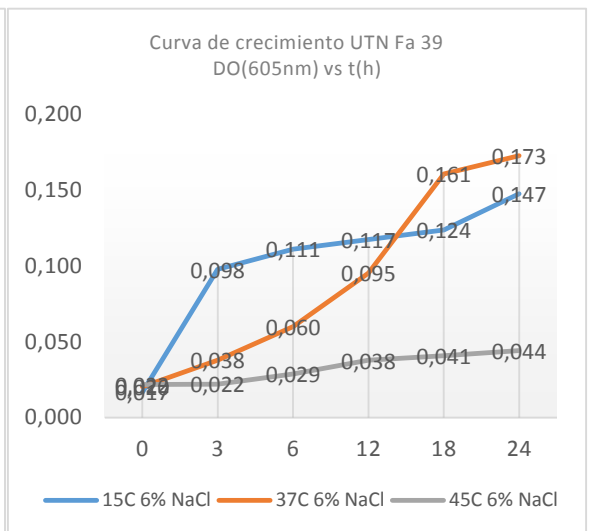
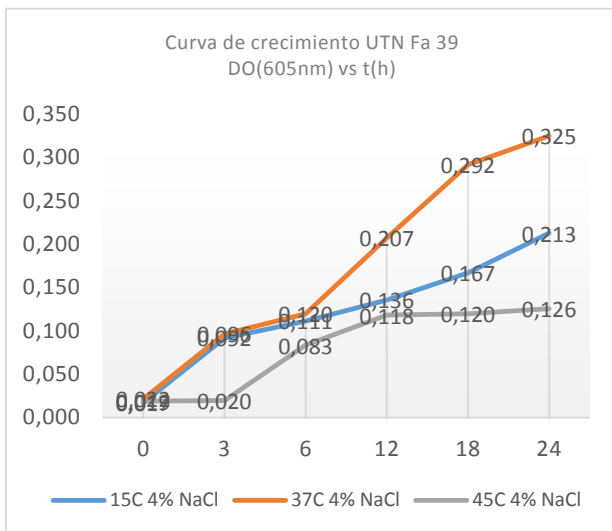
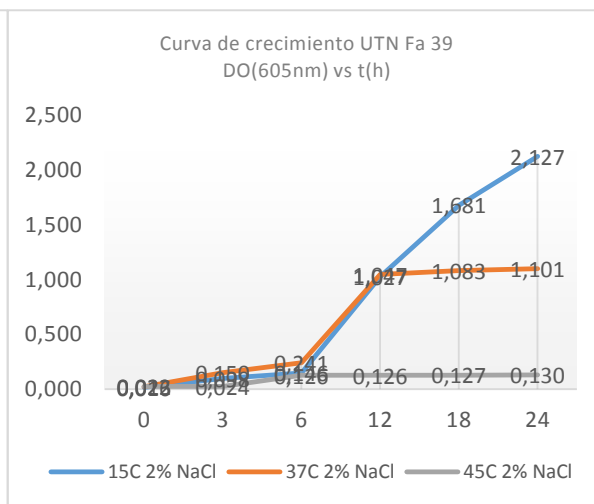
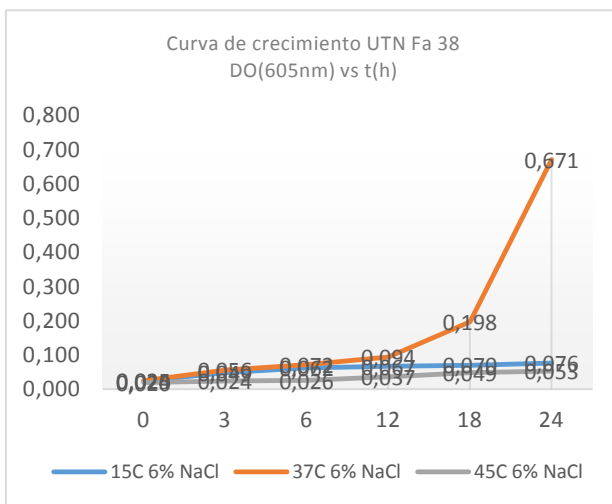
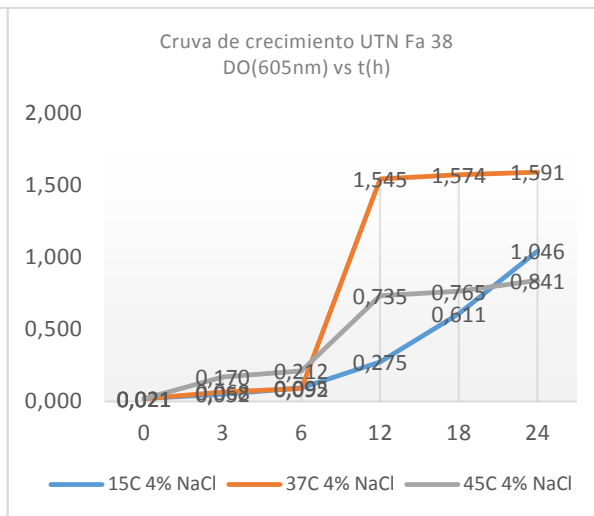
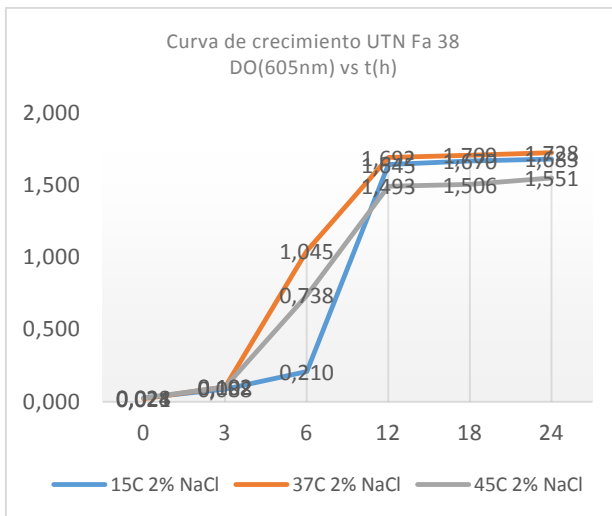
**ANEXO 23. Gráficos individuales a 45 °C y diferentes porcentajes de cloruro de sodio**

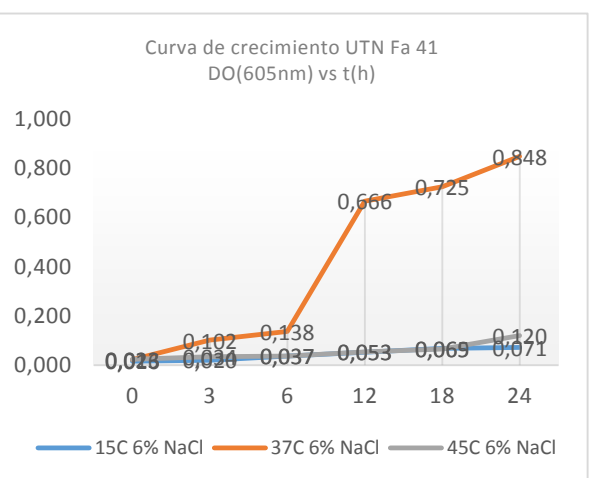
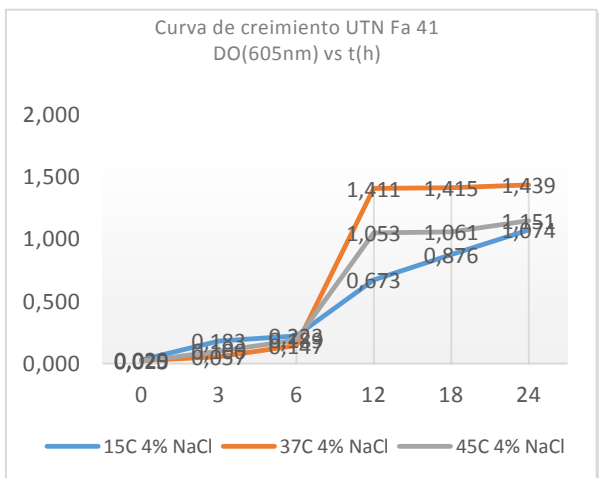
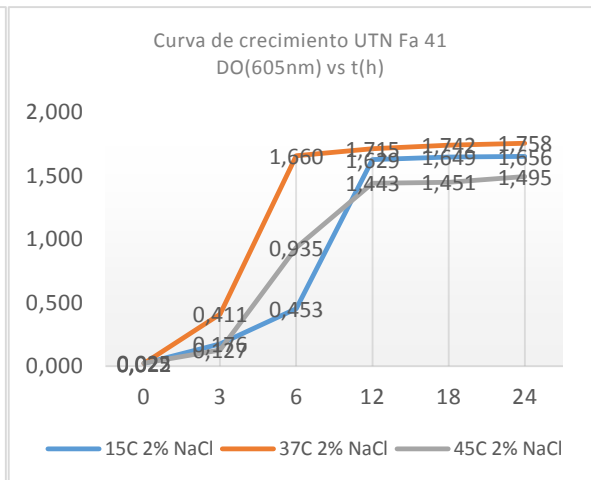
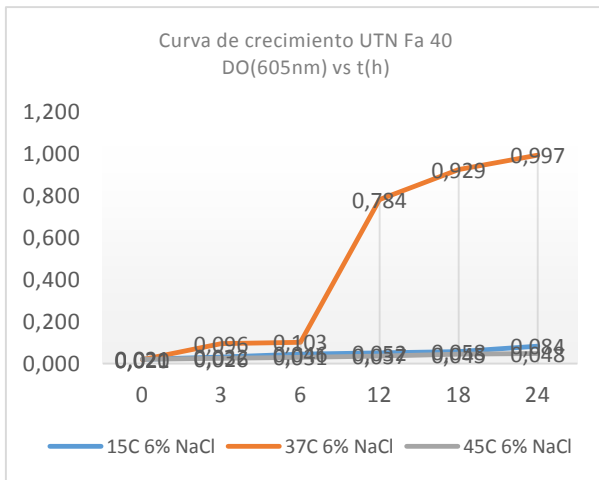
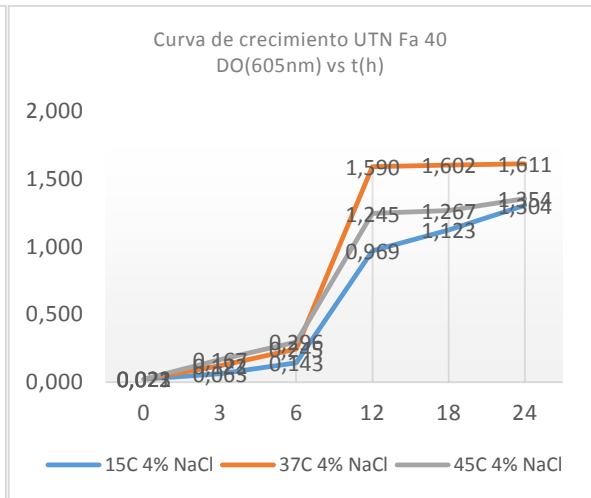
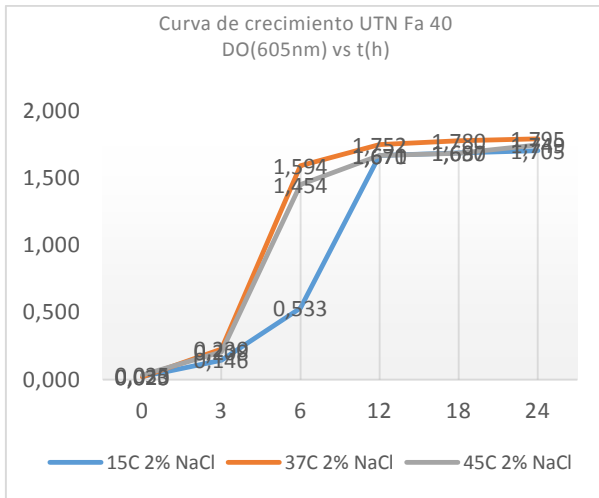


**ANEXO 24.** Gráficos individuales a diferentes temperaturas y diferentes porcentajes de cloruro de sodio









## **ANEXO 25.** Glosario de términos

**Antagonista:** dicho de un compuesto, capaz de disminuir la actividad de otro, tal como una hormona, un neurotransmisor, una enzima, un medicamento, etc.

**ARN:** molécula de ácido ribonucleico que transmite la información  
Molécula de ácido ribonucleico que transmite la información genética delADN para ser traducida durante la síntesis de proteínas.

**Axénico:** dicho de un cultivo o de un microorganismo, que se desarrolla en un ambiente donde no hay ningún otro organismo vivo. También conocido como cepa, que contiene un solo tipo de microorganismo con la misma composición genética.

**BAL:** bacterias ácido lácticas.

**Catabolizar:** acción de destruir músculos.

**Citocromos:** proteína coloreada que contiene hierro y participa en la fotosíntesis y en los procesos de respiración celular.

**Dactilar:** perteneciente a los dedos.

**Fenotípico:** perteneciente o relativo al fenotipo. Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

**Filogenéticas:** parte de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos.

**Genotípico:** perteneciente o relativo al genotipo. Conjunto de los genes de un individuo, de acuerdo con su composición alélica.

**Hidrolíticas:** reacción química en la que el agua reacciona doblemente con otro compuesto, pasando el hidrógeno a uno de los compuestos y el hidroxilo a otro.

**Hidrolizan:** desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.

**Inhibir:** suspender transitoriamente una función o actividad del organismo mediante la acción de un estímulo adecuado.

**Inocular:** introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad.

**Intergénicos:** regiones de ADN genómico situadas entre los genes. Contienen elementos reguladores y ADN repetitivo, pero en su mayor parte es de función desconocida.

**DO:** densidad óptica o absorbancia.

**Ribosómicas:** pertenecientes o relativo a los ribosomas. Orgánulo celular en el que tiene lugar la síntesis de proteínas.

**Screening:** proceso de identificación en el proyecto.

**SIM:** medio de cultivo para determinación de sulfuro indol motilidad de bacterias.

**TGI:** tracto gastrointestinal.

**Tolerancia:** acción y efecto de tolerar. Resistir, soportar, especialmente un alimento o una medicina.

**Triptófano:** aminoácido esencial en la nutrición humana, uno de los veinte aminoácidos incluidos en el código genético (codón UGG). Se clasifica entre los aminoácidos apolares, también llamados hidrófobos. Es esencial para promover la liberación del neurotransmisor

serotonina, involucrado en la regulación del sueño y el placer. Su punto isoeléctrico se ubica a pH=5,89.

**Tween:** clase de compuestos utilizados especialmente como emulsionantes y agentes tensioactivos. Son derivados de ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

**UFC:** unidad formadora de colonia.