



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTÉCNIA

**“SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus sp* PROCEDENTES DEL
TRACTO DIGESTIVO DEL CERDO COMO POSIBLES CEPAS
PROBIÓTICAS”**

Trabajo de Titulación:

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR: CARLOS ISRAEL CASTILLO GAVIDIA

DIRECTOR: Dr. GUIDO GONZALO BRITO ZÚÑIGA

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Carlos Israel Castillo Gavidia

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Carlos Israel Castillo Gavidia, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba 23 de noviembre de 2021

Carlos Israel Castillo Gavidia

0604596007

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTÉCNICA

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación tipo: Trabajo Experimental “**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus sp* PROCEDENTES DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CERDO COMO POSIBLES CEPAS PROBIÓTICAS**”, realizado por el señor **CARLOS ISRAEL CASTILLO GAVIDIA**, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del tribunal del trabajo de titulación. El mismo que cumple con los requisitos científico, técnicos, legales, en tal virtud el tribunal autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

**BYRON
LEONCIO
DIAZ
MONROY**
Firmado digitalmente por
BYRON LEONCIO
DIAZ MONROY
Fecha: 2021.12.01
20:51:21 -05'00'

2021-11-23

Dr. Guido Gonzalo Brito Zúñiga MsC.

**DIRECTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

**GUIDO
GONZALO
BRITO ZUÑIGA**
- 0601526098
Firmado digitalmente por
GUIDO GONZALO
BRITO ZUÑIGA -
0601526098
Fecha: 2021.12.02
07:41:20 -05'00'

2021-11-23

Ing. Luis Andrés Tello Flores

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ANDRES
TELLO FLORES**

2021-11-23

DEDICATORIA

La presente investigación le dedico a Dios por guiarme por el bien, sobre todo por darme las fuerzas y la sabiduría para alcanzar mi meta a pesar de muchas dificultades que se presentaron en mi camino. A mis padres por enseñarme los valores de la vida, por su paciencia, dedicación y por sus consejos que a lo largo de mi vida. A mi esposa por ese apoyo incondicional, por su apoyo y su gran carisma.

Carlos

AGRADECIMIENTO

A mis padres por su apoyo sin importar los errores que he cometido siempre estuvieron presentes.

A mi esposa por su paciencia y apoyo. Al Dr. Guido Brito director de tesis quien me supo guiar con eficiencia para llegar a la culminación de este trabajo.

Al Ing. Luis Tello asesor mi trabajo titulación, por su valiosa colaboración y supervisión del presente trabajo investigativo.

Carlos

TABLA DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1. El sistema digestivo del cerdo.....	3
1.2. El intestino.....	3
1.2.1. <i>Intestino delgado</i>	3
1.3. Caracterización de la microbiota intestinal en cerdos.....	4
1.4. Evolución de las poblaciones microbianas del tracto digestivo.....	5
1.5. Factores que influyen en el crecimiento y colonización de la flora intestinal.....	8
1.6. Factores que favorecen la alteración de la flora intestinal.....	8
1.7. Las bacterias ácido lácticas.....	9
1.8. Características del género <i>Lactobacillus</i>	9
1.9. Aislamiento de microorganismos.....	10
1.10. Métodos de identificación.....	10
1.10.1. <i>Tinción de Gram y morfología</i>	10
1.10.2. <i>Catalasa</i>	11
1.10.3. <i>Oxidasa positiva</i>	11
1.10.4. <i>Movilidad</i>	11
1.11. Microorganismos con efectos probióticos.....	12
1.12. Modo de acción de los probióticos.....	13

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	15
2.1. Localización y duración del experimento.....	15

2.2.	Unidades experimentales.....	15
2.3.	Materiales, equipos e instalaciones	15
2.3.1.	<i>Materiales</i>	15
2.3.2.	<i>Insumos de laboratorio</i>	16
2.3.3.	<i>Equipos</i>	17
2.3.4.	<i>Instalaciones</i>	17
2.4.	Tratamiento y diseño experimental	18
2.5.	Mediciones experimentales	18
2.6.	Técnicas estadísticas	18
2.7.	Metodología de la evaluación.....	18
2.7.1.	<i>Sacrificio de los animales</i>	19
2.7.2.	<i>Extracción del tracto gastrointestinal</i>	19
2.7.3.	<i>Recolección de las muestras</i>	19
2.7.4.	<i>Siembra</i>	19
2.7.5.	<i>Aislamiento de microorganismos.</i>	20
2.7.6.	<i>Conteos de Lactobacillus</i>	20
2.7.7.	<i>Conservación de cepas aisladas.</i>	20
2.7.8.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	21
2.7.8.1.	<i>Prueba de catalasa</i>	21
2.7.8.2.	<i>Prueba de oxidasa</i>	21
2.7.8.3.	<i>Prueba de tinción de Gram</i>	21
2.7.8.4.	<i>Prueba KOH</i>	22
2.7.8.5.	<i>Prueba de movilidad</i>	22
2.7.8.6.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	22
2.7.8.7.	<i>Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares.</i>	23

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..	24
3.1.	Concentración de Lactobacillus sp de las muestras obtenidas en tres porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon).....	24
3.1.1.	<i>21 días de edad</i>	24
3.1.2.	<i>40 días de edad</i>	25
3.2.	Caracterización de Lactobacillus sp mediante tinción Gram de muestras obtenidas de cerdos de las diferentes edades y de las tres porciones del intestino delgado..	27
3.2.1.	<i>Morfología de las cepas aisladas del intestino delgado del cerdo</i>	27
3.2.2.	<i>Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.</i>	28

3.2.3.	<i>Actividad acidificante (pH)</i>	29
3.2.4.	<i>Crecimiento en bilis de buey deshidratada</i>	30
3.2.5.	<i>Prueba de fermentación de azúcares</i>	31
CONCLUSIONES		33
RECOMENDACIONES		34
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Microorganismos que se usan como probióticos.....	12
Tabla 1-2: Condiciones meteorológicas de la zona.....	15
Tabla 2-2: Ingredientes de caldo rojo fenol	23
Tabla 1-3: Morfología de las cepas aisladas	27
Tabla 2-3: Identificación bioquímica de cepas aisladas.....	28
Tabla 3-3: Resultados de la prueba de fermentación de azúcares.....	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1: Clasificación de los filos (verde), géneros (amarillo) y especies (rojo)	5
Gráfico 2-1: Diagrama representativo de diferentes fases de la colonización del colon distal....	7
Gráfico 3-1: Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios	11
Gráfico 1-3: Ufc/g del intestino delgado de 21 días de edad	24
Gráfico 2-3: Ufc/g del intestino delgado de 40 días de edad	26
Gráfico 3-3: Prueba de acidificación de las bacterias aisladas	29
Gráfico 4-3: Crecimiento de cepas aisladas en bilis al 0,3%	30

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS
- ANEXO B:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS
- ANEXO C:** COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE CARNE
- ANEXO D:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL INTESTINO DELGADO DE LOS LECHONES DE 21 DÍAS
- ANEXO E:** ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL INTESTINO DELGADO DE LOS LECHONES DE 40 DÍAS
- ANEXO F:** T DE STUDENT PARA PRUEBA DE ACIDIFICACIÓN
- ANEXO G:** T DE STUDENT DEL CRECIMIENTO EN BILIS DE BUEY AL 0.3%.
- ANEXO H:** PESAJE DE AGARES Y LIMPIEZA DE EQUIPO
- ANEXO I:** DISECCIÓN DE INTESTINO DEL CERDO.
- ANEXO J:** PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y SIEMBRA DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN AGAR MRS
- ANEXO K:** AISLAMIENTO Y CONTEO DE CEPAS DE LACTOBACILLUS SP
- ANEXO L:** SELECCIÓN DE CEPAS MÁS TINCIÓN GRAM
- ANEXO M:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS BÁSICAS APLICADAS A CEPAS SELECCIONADAS
- ANEXO N:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue la selección, caracterización e identificación de las cepas de *Lactobacillus sp*, provenientes del tracto gastrointestinal del cerdo como posibles cepas probióticas. Para esta investigación se sacrificó 4 lechones de 21 días y 4 de 40 días, siendo todos de la misma raza, edad, explotación y el con el mismo tipo de alimentación. Después del sacrificio se realizó la extracción del tracto gastrointestinal para realizar una solución madre y desde allí comenzar con las a realizar las diluciones, luego se realizó siembra de los microorganismos en agar MRS con un pH 5, siendo incubadas las bacterias por 72 horas a 37°C, posteriormente se realizó el aislamiento de las bacterias encontradas en el intestino delgado de acuerdo a la morfología macroscópica como es la forma, el tamaño y el color para posteriormente realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias, después se procedió con las pruebas bioquímicas básicas como es catalasa, oxidasa, tinción Gram, peróxido de hidrógeno y las pruebas de caracterización como es la prueba de acidificación, fermentación de carbohidratos, crecimiento en bilis de buey y de movilidad, encontrándose 8 cepas en total, el recuento de las UFC/g fue de 10^6 en promedio, siendo todas las bacterias Bacilos positivos, catalasa, oxidasa y KOH negativos. En la prueba de acidificación a más horas más disminución pH, en el crecimiento en bilis al 0,3% todas sobrevivieron a dicha prueba en cuanto a la fermentación de carbohidratos fue quien nos ayudó a poder identificar a que especie pertenece, se concluyó que las cepas aisladas pueden ser utilizadas como probióticos y se recomienda aplicar otras pruebas bioquímicas como las API 50 CHL o en un PCR en tiempo real para una mejor caracterización de cada una de las bacterias aisladas del intestino delgado del cerdo.

Palabras claves: <MICROBIOLOGÍA>, <LACTOBACILLUS SP>, <CERDOS>, <BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS INTESTINO DELGADO>, <PROBIOTICOS>.



2160-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

This research carried out the selection, characterization and, identification of lactobacillus sp strains from the gastrointestinal tract of pigs as possible probiotic strains. This study slaughtered four piglets of 21-day-old and four piglets of 40-day-old which were of the same breed, age, farm, and type of feeding. The gastrointestinal tract from the piglets slaughtered was extracted to make a stock solution and carry out the dilutions. The microorganisms were sown in MRS agar at pH five and, the bacteria were incubated for 72 hours at 37°C. The isolation of the bacteria found in the small intestine was carried out according to the macroscopic morphology such as the shape, size and, color, and later the colony-forming units were counted. Basic biochemical tests such as catalase, oxidase, Gram staining, hydrogen peroxide, and characterization tests such as acidification, carbohydrate fermentation, growth in ox bile, and motility were performed, finding eight strains in total. The average CFU/g count was 106, giving positive with all bacteria Bacillus; catalase, oxidase, and KOH negative. The acidification test showed at more hours plus pH decrease, the growth in bile at 0.3% all survived this test; the carbohydrate fermentation identified the species to which it belongs. This study concluded that the isolated strains can be used as probiotics and recommended applying other biochemical tests such as API 50 CHL or real-time PCR for a better characterization of each bacteria isolated from the small intestine of pigs.

060275845 Firmado
digitalmente por
0602758450
O MARIA MARIA
GUADALUP GUADALUPE
E ESCOBAR ESCOBAR MURILLO
MURILLO Fecha: 2021.11.30
23:36:45 -05'00'

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe la necesidad de aumentar la productividad y mejorar los costos de producción en las explotaciones porcinas. Estas necesidades llevaron al uso indiscriminado de antibióticos a niveles subterapéuticos como promotores de incremento, con el propósito de reducir la incidencia de diferentes componentes que toleran las constantes situaciones de estrés en los animales que tienen la posibilidad de provocar desestabilidad en la microbiota intestinal, lo cual impactaría de manera negativa en la salud y productividad de los animales.

Actualmente ante la prohibición de los antibióticos como promotores del crecimiento en la Unión Europea y la creciente demanda por parte de los consumidores de una mayor calidad y seguridad alimentaria, los probióticos pueden jugar un papel muy activo en la alimentación porcina, como sustancias estimulantes del crecimiento y de la mejora en la salud animal, siendo unas sustancias bien vistas por parte de los consumidores. (Quiles Sotillo, 2007.p.2)

El uso inadecuado de antibióticos para contrarrestar problemas gastrointestinales en lechones al destete, ha conllevado a desencadenar resistencia cruzadas y como tal la disminución de la efectividad de los medicamentos. Los antibióticos utilizados en dosis de ataque, ejercen un efecto favorable en el tracto digestivo de lechones sobre microorganismos patógenos, responsables de los desórdenes intestinales; además, las bacterias patógenas compiten con el huésped por nutrientes afectando el desempeño de los animales. (Probi et al., 2020.,p.14)

Una de las fuentes de obtención de *Lactobacillus* es el tracto gastrointestinal de animales; la cantidad y la variedad de las especies van a depender de la alimentación que reciba dicho animal desde los primeros días de su nacimiento. Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción, tanto extensivos como en forma silvestre, la colonización del aparato digestivo ocurre en forma espontánea adquiriendo la microbiota del entorno que le rodea. En un animal sano cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y se desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedero (Jaimes y Zulay, 2011.p.19)

Las bacterias ácido lácticas (BAL), forman parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales y actúan como probióticos. Comparten características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común; son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, son negativos a la oxidasa y catalasa. Asimismo, como principal producto de la fermentación de carbohidratos generan ácido láctico(2,7), crecen a diferentes temperaturas y alta concentración de sal, toleran pH ácido o alcalino y son principales microorganismos utilizados como probióticos (Mogoll et al., [sin fecha],p.1).

Hoy en día se buscan compuestos que aumenten la inmunidad del huésped y no tengan efectos secundarios o residuales en los productos subproductos de origen animal; es aquí donde los

probióticos, prebióticos y simbióticos tienen una gran oportunidad por su efecto modulador de la microbiota del tracto gastrointestinal, que genera efectos positivos en el animal.

Por los antecedentes expuestos con anterioridad es que se plantean los siguientes objetivos:

- Aislar cepas de *Lactobacillus sp* procedentes del tracto digestivo del cerdo como posibles cepas probióticas
- Caracterizar e identificar cepas de *Lactobacillus sp* procedentes del tracto digestivo del cerdo como posibles cepas probióticas
- Proyectar en base a los resultados obtenidos, la futura y posible utilización de las cepas en el diseño, producción y uso de productos probióticos o simbióticos para la alimentación animal.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. El sistema digestivo del cerdo

El sistema digestivo del lechón tiene la facilidad de cambiar el material vegetativo y animal en sustancias asimilables de forma sencilla en digestibles. Su composición anatómica y fisiológica son iguales a los humanos. El sistema gastrointestinal puede ser considerado como un tubo que comienza en la boca y finaliza en el ano. En ciertos casos su aspecto podría ser analizada como externo al cuerpo humano. La parte de la boca se abre en el centro de la faringe, el cual es la zona más común para el paso tanto de sustancias alimenticias como de aire. Una válvula de tejido nombrado paladar blando se moviliza de forma automática para asegurar la apertura en la tráquea o una vez que se traga. Las amígdalas del cerdo permanecen situadas en el fragmento del paladar blando. El esófago es el soranbo que transportar el alimento a partir de la faringe al estómago (CIAP, 2014, p. 1)

El sistema digestivo completo es subjetivamente sencillo en términos de los órganos implicados, que permanecen conectados en un tubo constante musculo- membranoso a partir de la boca al ano. No obstante, este sistema de diversas facetas involucra muchas funcionalidades interactivas complicadas (Martínez y Moreno, 2014 citado por (Arce, 2017,p ,21).

1.2. El intestino

El largo del intestino varía de 22 a 25 m en un animal adulto. Se distribuye en dos partes muy bien diferenciadas anatómica y funcionalmente: El intestino delgado (18-20 metros) y el intestino grueso (4-5 metros) (Arce, 2017,p. 23).

1.2.1. *Intestino delgado*

Se sigue el estómago a través del duodeno (de 60 cm) y seguir con el yeyuno y el íleon que representa una importante sección de la longitud. Esta masa intestinal está situada en la parte derecha del abdomen (Arce, 2017.,p. 23).

. Duodeno: engloba alrededor del 5% de longitud total con tamaño aproximado de 30 centímetros cuenta con conductos hacia el páncreas y el hígado, correspondencia con un engrosamiento de la

pared debido a la presencia de glándulas que liberan bicarbonato sódico para neutralizar el pH del contenido procedente del estómago (Moran, 2018 citado por Antonio, 2017,p.22).

Yeyuno: es la continuidad del duodeno localizada en tramos en forma de asa y no alargada. La importante función que efectúa es la asimilación de nutrientes (Moran, 2018 citado por Antonio, 2017,p.22).

Íleon: es la última parte del intestino delgado. Se une con el intestino grueso, formando la válvula ileocecal. Su función también es la asimilación de nutrientes que no se adsorbieron en el yeyuno (Agencia Japonesa de Cooperación Internacional, 2017 citado por Antonio, 2017,p. 23)

1.3. Caracterización de la microbiota intestinal en cerdos

La microbiota intestinal es importante para actividades biológicas que el hospedero carece o requiere potenciar, como son el metabolismo de nutrientes, el buen desarrollo de la fisiología del sistema digestivo y la estimulación del sistema inmunitario (Backhed et al. 2005 citado por (Mena, 2019,p.13).

En el intestino del cerdo se hallan cerca de 100 billones de bacterias (1.000 especies). Este grupo de bacterias se llama microbiota. En cada etapa de producción del animal, esta microbiota es distinto. No solo cambia dependiendo de la edad del animal, sino que en cada tramo del intestino vamos a encontrar diferencias tanto cualitativas como cuantitativas. Es decir, estamos ante una estructura extremadamente compleja que se ve alterada fácilmente por numerosos factores (Del y Natural, 2020.,p.12).

Un tracto gastrointestinal que funciona de manera óptima es claramente importante para el metabolismo general, la fisiología, el estado de la enfermedad y el rendimiento de los cerdos en todas las etapas de crecimiento y desarrollo. La importancia de las bacterias en el tracto gastrointestinal de los animales es ampliamente reconocida como sustancial. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la composición y distribución de la población microbiana en el tracto intestinal inferior de los animales. Debido a que la mayoría de las especies bacterianas en los intestinos de cerdo no se han cultivado, ha sido difícil analizar la diversidad bacteriana mediante métodos de cultivo convencionales (Hyeun, et al., 2011 citado por Del y Natural, 2020,p.12).

En un cerdo sano, se conoce que los filos más prevalentes son Firmicutes y Bacteroidetes. Dichos 2 filos suponen más del 90% poblacional. Los géneros más prevalentes de Firmicutes son los Clostridiales (la mayor parte son bacterias comensales que no ocasionan patogenicidad como *Clostridium butyricum*) y los Bacilli. En el caso de Bacteroidetes son *Bacteroides* y *Prevotella*. Se debe considerar que aun cuando dichos 2 filos representen un elevado porcentaje de la microbiota intestinal, hay otros filos de particular trascendencia como Proteobacteria, la cual incluye a todas las enterobacterias (*E. coli*, *Salmonella* ...) Actinobacteria, Spirochaetes y Verrucomicrobia (Del y Natural, 2020.,p. 12).

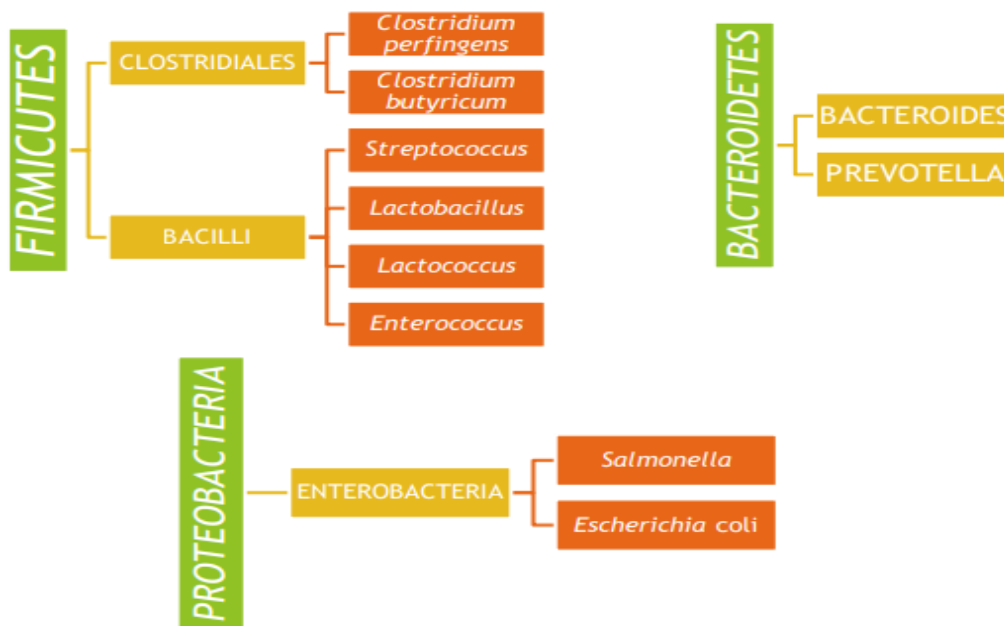


Gráfico 1-1: Clasificación de los filos (verde), géneros (amarillo) y especies (rojo) más representativos

Fuente: (Del y Natural, 2020.,p. 13).

1.4. Evolución de las poblaciones microbianas del tracto digestivo

La población microbiana digestiva no es estable durante la vida del cerdo, más bien, va cambiando hasta su edad adulta en donde se mantiene estable (Odamaki *et al.*, 2016, p. 90). Existen cambios que se ven influenciados por factores como: la población microbiana de la madre, el medio ambiente o la alimentación entre otros factores y, aunque, la microbiota tiene una gigantesca capacidad de resiliencia, existen cambios que pueden cambiar o modificar la composición de la misma (Miranda-Hevia, 2018.,p. 17).

Los lechones recién nacidos reciben gran parte de su microbiota intestinal de su madre y del medio ambiente en el que permanecen durante sus primeros días de vida (Quilodrán-Vega *et al.*, 2016; Sommer, 2015; Chen *et al.*, 2018). Algunos investigadores dicen que, el tracto digestivo de los cerdos que a un no nacen es estéril, en estos últimos tiempos se ha dicho en diversos estudios que la esterilidad del meconio y del líquido amniótico al aislarse, mediante cultivo, o identificarse, a través de su material genético, bacterias comensales o patógenas en gestaciones fisiológicas (Bearfield *et al.*, 2002; Buduneli *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2008; Satokari *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Mshvildadze *et al.*, 2010; Gosalbes *et al.*, 2013, citado por Miranda-Hevia, 2018.,pp. 17-18).

Existe, por consiguiente, un flujo de bacterias a partir del intestino de la madre hacia las crías, por vía sistémica. En un primer instante este flujo podría ser cualitativo y cuantitativo, tanto en el número de especies como en su concentración, al pasar por medio de la placenta al intestino prenatal. En un segundo plano, el paso de bacterias sería superior, especialmente por medio del

calostro y la leche materna (Jiménez-Quintana, 2010, pp. 187-193), mediante la ruta enteromamaria (Langa-Marcano, 2006 ; Miranda-Hevia, 2018, p. 18).

La translocación a partir del intestino hacia los tejidos extra del intestino es un fenómeno fisiológico benéfico dirigido por las células dendríticas, que captan las bacterias por medio de las regiones de oclusión para introducirlas en la lámina propia sin perder la totalidad del epitelio intestinal (Rescigno *et al.*, 2001; Miranda-Hevia, 2018, p. 18).

Esta translocación está vinculada a una estimulación del sistema inmunitario, la composición del sistema inmunológico neonatal o también como vía de comunicación materno-filial, esto explicaría los problemas extra intestinales que poseen muchos probióticos (Guerra *et al.*, 2007; Miranda-Hevia, 2018, p. 18).

Además de la población microbiana por la vía uterina y láctea, una parte de las bacterias presentes en la microbiota de los cerdos durante los primeros minutos de vida vienen de la microbiota del canal del parto de la madre, la cual, que colonizara el intestino lechón del durante su nacimiento, también, las bacterias existentes en las heces y piel de la madre (Guerra *et al.*, 2007; Miranda-Hevia, 2018, p. 18).

En las primeras 12 horas de nacidos los lechones ya se pueden realizar un aislamiento de bacterias como *E. coli*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en el intestino delgado mientras que otras bacterias como las anaerobias y Bacteroides pueden tardar un par de días en presentarse (Tajima & Aminov, 2015, pp. 47-75).

Las primeras colonizaciones son por parte de aerobios y anaerobios facultativos los cuales permiten disminuir la concentración de oxígeno y el potencial redox en el tracto gastrointestinal, creando las condiciones necesarias para la colonización por parte de bacterias anaerobios más estrictos (*Clostridium*, *Eubacterium*). Sin embargo, para muchos autores el medio anaerobio se establece fácilmente al momento del nacimiento y las bacterias anaerobias mayoritariamente superan en números a las anaerobias facultativas (Gosalbes *et al.*, 2013; Miranda-Hevia, 2018, p. 19).

Las colonizaciones de Lactobacilos existentes en las heces fecales de la madre estarán también presentes en la flora intestinal del tracto digestivo de los cerdos, indicando que las heces de la madre son la mayor fuente de bacterias para la población de la microbiota del tracto digestivo de lechones lactantes (Gosalbes *et al.*, 2013, p. 198- 211).

Según (Swords *et al.* 1993 ; Miranda-Hevia, 2018, p. 19) la población microbiana del tracto gastrointestinal del lechón puede dividirse en 3 fases:

En la primera fase , la flora intestinal del colon está constituida en su mayoría por microorganismos aeróbicos o anaeróbicos facultativos, siendo un 80 % de las bacterias totales (Swords *et al.*, 1993; Roca-Canudas, 2008, p. 3).

Durante los siguientes días, la cantidad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas disminuyen paulatinamente siendo reemplazadas por bacterias anaeróbicas estrictas.

Este es el motivo para que, algunos investigadores hayan propuesto que las bacterias que

colonizan el tracto gastrointestinal durante sus primeras horas de vida son las responsables de reducir del potencial redox del intestino y de la formación de un medio más favorable para una posterior colonización de las bacterias anaeróbicas. (Conway, 1995; Stewart, 1997; Roca-Canudas, 2008, p. 3).

Los lactobacilos son quienes dominan en esta fase, pudiendo constituir un 8-10% del total de la flora intestinal (Swords *et al.*, 1993; Roca-Canudas, 2008, p. 3).

En la segunda fase de la colonización del tracto digestivo, la cual inicia al igual que periodo de lactación. En esta fase se existirá una continua substitución de bacterias aeróbicas por bacterias anaeróbicas (Swords *et al.*, 1993; Roca-Canudas, 2008, p. 3).

Los grupos bacterianos que más se encuentran fueron *Clostridium spp*, *Eubacterium spp*, *Fusobacterium spp*, *Propionibacterium spp*, además también, bacterias anaeróbicas del grupo *streptococci*. Sin embargo, bacterias como *Bacteroides spp* son casi nulas encontrarlas, al inicio del destete comienza la tercera fase de colonización del tracto gastrointestinal, la cual se caracteriza por el cambio de algunas bacterias anaeróbicas Gram-positivas por bacterias anaeróbicas Gram-negativas del género *Bacteroides spp* (Swords *et al.*, 1993; Roca-Canudas, 2008, p. 3). La tercera etapa, empieza con el destete, en el que los lechones, que poseen en este instante un sistema inmunitario inmaduro, se ven sometidos a un fundamental estrés provocado por la división de la mamá y el cambio del ambiente en el cual se hallan. Además hay un cambio brusco en la ingesta, de alimentos, pasando de una dieta láctea a una dieta sólida, producido que coopera al aumento de la variedad de la microbiota realizando que ésta se asemeje cada vez más a la estructura de los animales adultos (Inoue *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2017; Miranda-Hevia, 2018, p. 19).

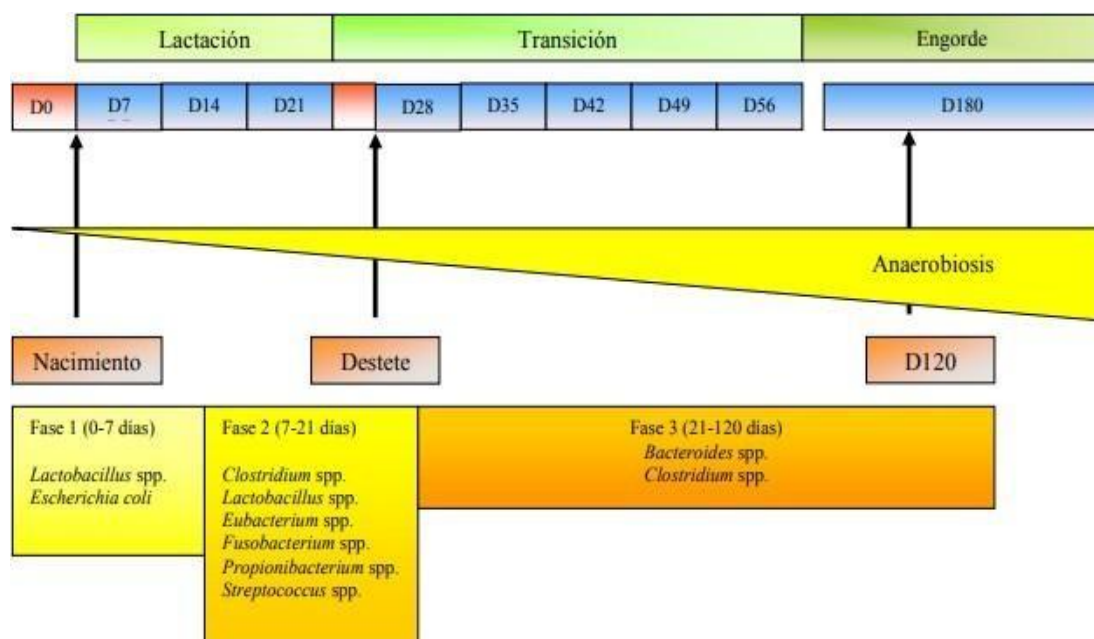


Gráfico 2-1: Diagrama representativo de las diferentes fases de la colonización del colon distal de los cerdos

Fuente: (Swords *et al.*, 1993; Roca-Canudas, 2008, p. 4).

1.5. Factores que influyen en el crecimiento y colonización de la flora intestinal

Los elementos que principalmente contribuyen a la colonización de la flora intestinal del lechón se detallan a continuación: (Quiles y Hevia, 2003, p. 9).

- ✓ **Dieta:** la composición de los nutrientes y los productos secundarios de su digestión pueden alterar la composición de la flora microbiana del intestino y su actividad metabólica. El aumento bacteriano del intestino grueso está a expensas de los nutrientes no digeridos y de las secreciones del intestino. Por lo tanto, la composición de la dieta y el tipo de sustrato que llega al intestino grueso puede fomentar el crecimiento de un determinado tipo de bacteria en detrimento de otros. (Quiles y Hevia, 2003, p. 9)
- ✓ **Límites Fisiológicos:** como por ejemplo el pH, potencial de óxido-reducción y la concentración de oxígeno en las diferentes partes del tubo digestivo, tiene su influencia en el crecimiento y multiplicación de la flora intestinal (Quiles y Hevia, 2003, p. 9)
- ✓ **Secreciones Biliares:** la existencia de las secreciones biliares tienen un incremento bacteriano, primordialmente de las fidibobacterias Otros Componentes: como la velocidad de tránsito del alimento, el sistema inmunológico del lechón y la existencia de distintas enzimas, (Quiles y Hevia, 2003, p. 9)

1.6. Factores que favorecen la alteración de la flora intestinal

Los factores más comunes que alteran la microbiota en los cerdos son: el uso de antibióticos, sulfamidas y antiparasitarios o bien el querer controlar a los animales en condiciones de estrés tales como: condiciones del medio ambiente, vacunaciones, cambios de lotes, ciertas prácticas de desempeño, destetes tempranos, densidades altas (Quiles y Hevia, 2003, p. 9-10).

Otras causas que pueden distorsionar la flora son: los cambios bruscos en la ingesta de alimentos o calidad del agua (tanto en las características físico-químicas como microbiológicas), la vida de microorganismos patógenos, la implementación abusiva de desinfectantes, etc. El primer síntoma de la división del equilibrio de la flora intestinal es la diarrea, debido a la debilidad de las defensas del intestino que permiten a los microorganismos patógenos implantarse, pegarse y proliferar en las células epiteliales del intestino, para luego propagarse. Implica una disminución en la absorción de agua y de sustancias nutritivas, y dependiendo del nivel de deshidratación y desequilibrio electrolítico dependerá la gravedad del caso (Quiles y Hevia, 2003, p. 9-10).

Una vez que las disfunciones del artefacto digestivo son leves tenemos la posibilidad de recurrir al procedimiento únicamente con probióticos, sin embargo, una vez que el cuadro patológico se agrava (heces excesivamente líquidas y a lo largo de un largo tiempo, heces sanguinolentas, incremento de temperatura del cuerpo, agotamiento de los animales, etcétera.) se podría acudir a la utilización de fármacos, para afrontar a la infección. Tienen la posibilidad de hacer una acción

conjunta, secundando al procedimiento farmacológico con la utilización de probióticos para repoblar otra vez la flora intestinal, sin embargo, no constantemente debido a que se podría haber visto en varios estudios con cierta resistencia (Quiles y Hevia, 2003, p. 10).

1.7. Las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas se han utilizadas desde hace miles de años para la preparación o transformación de alimentos. En la actualidad, las bacterias ácido lácticas juegan un rol muy importante como potencial biotecnológico, debido a su presencia en diversos de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo y animal. Estas bacterias no solo apoyan al desarrollo de las propiedades organolépticas de los alimentos, sino que al mismo tiempo producen ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, gracias a su gran capacidad , que beneficia su proliferación en el alimento y su capacidad bioconservadora (Samaniego *et al.*, 2004; citado por Aguavil, 2012, p. 3).

Las bacterias de ácido láctico son un grupo heterogéneo de organismos Gram positivos (eslabones o bacilos) no esporulados que se caracterizan por un metabolismo fermentativo del azúcar, en el que el ácido láctico es el producto principal (Herrero, et al., 1996). Pueden ser anaeróbicas, microaerófilas o aerotolerantes, también catalasa y oxidasa negativas. Crecen en un rango extendido de pH que puede oscilar de 3.2 a 9.6, pero en su mayoría crecen de 4 a 4.5 (Murillo y Pullupaxi, 2019.,p. 40)

Los miembros de este conjunto se caracterizan morfológicamente por ser bacilos largos o cortos, aun cuando además cocos que se separan como bacilos, sólo en un plano, generan cadenas o tétradas de manera eventual y filamentos, falsamente denominados ramificados. Son Gram-positivos y principalmente no motiles. A partir de la perspectiva fisiológico, tienen un metabolismo exclusivamente fermentativo, puesto que desde la glucosa generan altas concentraciones de ácido láctico y otros metabolitos como ácidos orgánicos, etanol y CO₂ (Saloff-Coste 1994, citado por Rondón et al., 2008, p. 14-15).

Dentro de las BAL se encuentran más de 12 géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weisella* (Holzapfel et al., 2001; & Rondón et al., 2008, p. 15).

1.8. Características del género *Lactobacillus*

Según Kandler (1986) indica que, según su taxonomía, los del género *Lactobacillus* se ubican dentro de la Familia de las Lactobacillaceae, que se caracteriza por:

Logran observarse continuamente bacilos cortos o coco-bacilos por lo que generalmente forman vínculos, aunque principalmente se muestran células en forma de bacilos largos y extendidos (Probi et al., 2020.,p. 10)

Referente a su temperatura óptima de aumento, tienen la posibilidad de ser mesófilos o termófilos. Acostumbran crecer entre 20°C y 53°C, aun cuando su temperatura óptima es de 30-40°C. El pH ideal oscila entre 5,5 y 6,2. Son anaerobios aerotolerantes y la capacidad de aumento se ve reflejado en atmosfera microaerofila con un 5-10% de CO₂. A partir de la perspectiva fenotípico y atendiendo a sus características metabólicas, tienen la posibilidad de clasificar en 3 equipos en funcionalidad de la presencia o la inexistencia de los enzimas fructosa-1,6- di fosfato aldolasa y fosfoacetolasa (Kandler y Weiss, 1986): homofermentativos forzados, homofermentativos facultativos y heterofermentativos. (Del y Natural, 2020.,p. 14)

1.9. Aislamiento de microorganismos

El aislar un microorganismo desde una muestra involucra que este está vivo. No obstante, la interpretación de las pruebas de aislamiento microbiano debe ser interpretada con cautela. (Valladares, 2010). El aislamiento de un microorganismo no implica justamente su papel como patógeno en un proceso de la enfermedad, puede rara vez tratarse de flora saprofita o un representante vacunal. (Valladares, J. 2010). El microorganismo aislado puede pedir de una tipificación siguiente, como una tipificación antigénica, la demostración de elementos de virulencia, etc. Así mismo, la falta aislamiento del microorganismo no implica claramente que éste no sea la causa de la enfermedad. En bacteriología se aplican medios enriquecidos y selectivos artificiales, pruebas bioquímicas y en algunos casos identificación por medio de antiseros. Los resultados se expresan como género y especie bacteriana aislada y en ocasiones su cantidad relativa (Valladares, J. 2010 citado por Drucker y Oster, 2015.,p.25).

1.10. Métodos de identificación.

1.10.1. Tinción de Gram y morfología

La identificación morfológica es el paso fundamental para el aislamiento de colonias bacterianas, mediante la observación de forma, consistencia, y color, (Figuras 1 y 2); En el caso de la tinción Gram permite obtener una clasificación generalizada en dos grandes grupos mediante su forma. Las Gram positivas (+) y las Gram negativas (-) proporcionan también un control de pureza de la colonia bacteriana, donde la gran mayoría de bacterias Gram (-) resultan ser patógenas, mientras que las Gram (+) no proporcionarían un peligro para el ser humano, en el que se encuentran las bacterias ácido-lácticas (Fernández & Garcia, 2010, citado por Martínez y Steven, 2019.,p.24)

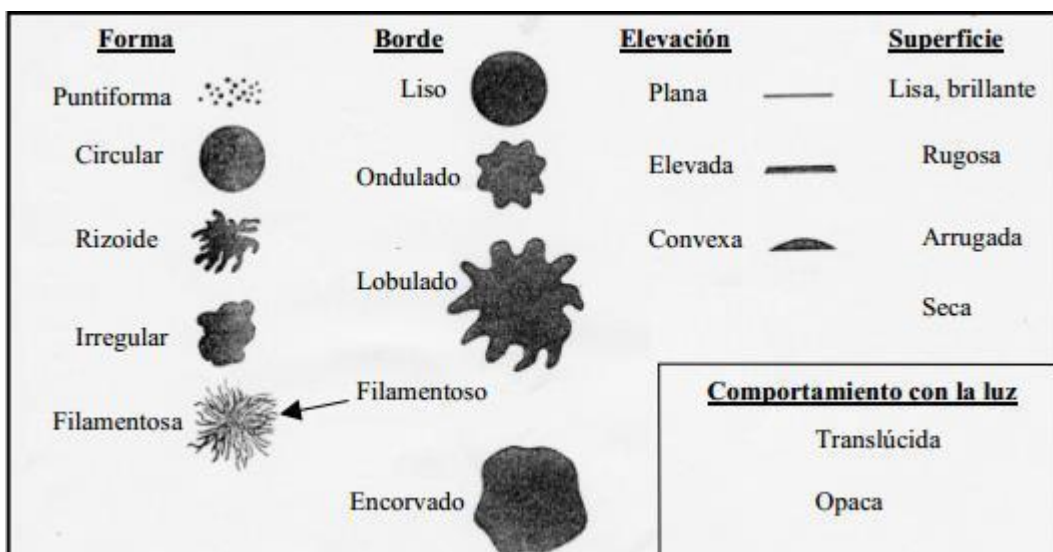


Gráfico 3-1: Caracterización morfológica de las bacterias en cultivos primarios
Fuente: Martínez y Steven, 2019.,p.24.

1.10.2. *Catalasa*

Se trata de una adaptación de los microorganismos al H₂O₂ (Peróxido de hidrogeno) que, aunque no es un radical libre es poco reactivo. La enzima catalasa es de vital importancia en los organismos, para la eliminación del H₂O₂ intracelular, protegiendo a las especies aeróbicas o reactivas del oxígeno por ser un residuo, de las especies anaeróbicas resultando negativo en una prueba ya que no se podrá evidenciar el burbujeo (Kraeva & Horáková, 2017, citado por Martínez y Steven, 2019.,p.26)

1.10.3. *Oxidasa positiva*

La prueba de oxidasa permite la identificación de la enzima oxidasa, debido a la reacción con el citocromo oxidasa, que activa el citocromo por la presencia de oxígeno generado de la descomposición oxígeno-agua, dependiendo mucho de la especie bacteriana las especies aerobias serán las que por lo general darán positivo a esta prueba, mientras que la gran mayoría de bacterias anaerobias darán un resultado negativo y las bacterias anaeróbicas estrictas que carecen de la enzima, por lo que generan oxidasa negativos (Kraeva & Horáková, 2017, citado por Martínez y Steven, 2019.,p.27).

1.10.4. *Movilidad*

La bacteria habitualmente tiene una pared celular y uno o varios flagelos que utilizan para movilizarse en el medio donde se encuentran, esta facilidad de moverse les proporciona un alto

beneficio ya que pueden trasportarse hacia lugares más comodos para su desarrollo, donde las condiciones o las fuentes de alimento son mayores. (Pino, F. 2012 citado por Drucker y Oster, 2015.,p.28) El agar es el representante solidificante y a esta concentración le da al medio la propiedad de ser semisólido, condición primordial para identificar movilidad, que se prueba por el enturbiamiento del medio o por aumento que difunde más allá de la línea de siembra (Pino, F. 2012, citado por Drucker y Oster, 2015.,p.28).

1.11. Microorganismos con efectos probióticos

Existen distintos tipos de bacterias considerados como probióticos que son benéficas para cualquier especie animal entre ellos estan los Lactobacillus los cuales se encargan de descomponer los principios nutritivos que no han sido digeridos en otras partes del tubo digestivo, dentro de estas especies están algunas cepas de Lactobacillus como: Lactobacillus Casei, Lactobacillus Rhamnosus, Lactobacillus Acidophilus, Bifidobacterium Bifidus, Bifidobacterium Longum, etc. Un segundo grupo estaría formado por las bifidobacterias, responsables de la síntesis de vitaminas sobre todo las del grupo B, las levaduras encargadas del mantenimiento de la estabilidad intestinal y otras bacterias pertenecientes a varios géneros que intervienen en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal (Batista, 2006; Roca-Canudas, 2008, p. 3).

Tabla 1-1: Microorganismos que se usan como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>bifidobacterium</i>	<i>Lactococos</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i> y otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. cremosis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetylactis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>
<i>L. rhamnosus</i> <i>GG</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>L. lactis</i>			<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>				<i>S. boulardii</i>
<i>L. kefir</i>	<i>B. longum</i>				<i>Leuconostoc</i>
<i>L. brevis</i>					
<i>L. reuteri</i>					
<i>L. helveticus</i>					
<i>L. plantarum</i>					
<i>L. johsonii</i>					

Fuente: (Álvarez y Oberhelman 2001 ; citado por Probi et al., 2020 ,p.8).

Para que un organismo pueda ser considerado Probiótico debe:(Cortez, Rodrigo & Aranguren, 2014, p .5)

Ser habitante normal del tracto gastrointestinal

No ser patógeno, ni tóxico

Tener un tiempo corto de reproducción

Ser estables al contacto con bilis de buey, jugo gástrico, enzimas y oxígeno

Tener la capacidad para fijarse a la mucosa intestinal

Mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal

Producir sustancias antimicrobianas

Son varios los efectos benéficos que se pueden mencionar, pero dentro de los principales tenemos, (Rondón et al., 2008, p. 8).

Modifican la población microbiana intestinal

Estimulan el sistema inmunológico

Intervienen en los procesos metabólicos,

Previenen la colonización por patógenos

Incrementan la producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

Reducen la absorción de sustancias tóxicas como NH₃, aminos, indol, mercaptanos y sulfito

Disminuyen el colesterol en sangre

Sintetizan vitaminas -especialmente vitaminas K y del complejo B-

Mejoran la absorción de minerales

1.12. Modo de acción de los probióticos

Un impacto fundamental de los probióticos es la optimización en la ganancia de peso vivo y la eficiencia en la conversión alimenticia, esto se debería al incremento en la disponibilidad de aminoácidos y una gran digestibilidad de las fuentes energéticas y proteicas , así como una mayor de la digestibilidad de la fibra, por acción de las vías fermentativas en el intestino grueso (Cole, 2010 ; & Almeida, 2017,p. 27).

Por tanto, se afirma que la principal acción de los organismos probióticos es mantener el balance de la microflora entérica a favor de las especies no patógenas compitiendo con las bacterias patógenas por los sitios de adherencia a la pared del tracto gastrointestinal (Chávez, Los probióticos en la nutrición porcina, 2015)

Los probióticos actúan, principalmente, a tres niveles según (Quiles Sotillo, 2007,p.10-11)

Mejoran el desarrolló y aumenta el índice de conversión, al ayudar en la absorción del calcio y la ganancia promedio diaria.

Aumentan la microflora autóctona, favoreciendo la duplicación de bacterias beneficiosas y controlando el equilibrio bacteriano intestinal. De esta manera, actúan como profilácticos de colibacilosis y otros trastornos digestivos relacionados con el desequilibrio de la relación lactobacilos/coliformes. Específicamente, se encuentran a nivel del íleon, con una mayor relación de bacterias ácido lácticas/coliformes y, en menor medida, a nivel del ciego y del colón proximal. Los probióticos pueden cambiar el metabolismo bacteriano intestinal directamente a través de sus propias actividades metabólicas o bien de forma indirecta desplazando o influenciando las funciones metabólicas de las bacterias patógenas.

Efectúan la pre digestión de factores tóxicos y anti nutrientes del pienso, como el ácido fítico, glucosinolatos, lecitinas, etc.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

El desarrollo de la presente investigación se realizará en los laboratorios de: Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la Provincia de Chimborazo, localizada en la región central de la serranía ecuatoriana; la misma que tendrá una duración de 60 días, cuyas condiciones meteorológicas se reportan en la tabla 1.2.

Tabla 1-2: Condiciones meteorológicas de la zona

VALORES PROMEDIO	
Heliofilia (: h.luz ⁻¹)	165,1
Temperatura (°C)	13,8
Precipitaciones (mm/año)	465,0
Humedad Relativa (%)	63,2
Altitud (msnm)	2820

Fuente: Estación Agrometeorológica de la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH. (2016).

2.2. Unidades experimentales

Toda la información será recopilada y analizada de las muestras que se obtendrán de las porciones intestinales (yeyuno, duodeno, íleon) de cuatro cerdos de 21 días y cuatro cerdos de 40 días de edad de raza Landrace del proyecto de la Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de cerdos y evaluación de su efectoprobiótico en esta especie.

2.3. Materiales, equipos e instalaciones

2.3.1. *Materiales*

- ✓ Gradillas
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Espátulas
- ✓ Asa de siembra

- ✓ Fundas de Stomach
- ✓ Frascos térmicos
- ✓ Mesa de disección
- ✓ Cámara
- ✓ Materiales de oficina
- ✓ Kuler
- ✓ Pipetas de vidrio
- ✓ Mecheros
- ✓ Mesa de disección.
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Vaso termo resistente
- ✓ Varillas de agitación magnética
- ✓ Pipetas de 10 ml
- ✓ Pipetas de 5 ml
- ✓ Puntas de 1 ml
- ✓ Cajas petri vidrio
- ✓ Cajas petri plástico
- ✓ Probeta de 10 ml
- ✓ Probeta de 100 ml
- ✓ Tubos Burham
- ✓ Pinzas
- ✓ Piseta
- ✓ Porta objetos
- ✓ Pera de succión
- ✓ Vidrio reloj
- ✓ Espátula
- ✓ Desecador
- ✓ Guantes
- ✓ Cofia
- ✓ Uniforme
- ✓ Mandil

2.3.2. *Insumos de laboratorio*

- ✓ Agar MRS
- ✓ Medio Sim
- ✓ Caldo MRS

- ✓ Peptona
- ✓ Tiras de oxidasa
- ✓ Glicerol
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Bilis deshidratada
- ✓ Rojo fenol
- ✓ Azúcares para fermentación (lactosa, glucosa, maltosa, manitol y fructosa)
- ✓ Agar nutriente
- ✓ Lugol
- ✓ Safranina
- ✓ Alcohol cetona
- ✓ Yodo
- ✓ Peróxido de hidrógeno
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alcohol
- ✓ Amonio cuaternario.

2.3.3. Equipos

- ✓ Autoclave
- ✓ Stomachec
- ✓ Microscopio
- ✓ Estufa
- ✓ Estufa de cultivo bacteriano anaeróbico
- ✓ Agitador magnético
- ✓ Balanza Electrónica
- ✓ Computadora
- ✓ Cámara fotográfica.
- ✓ Bortex
- ✓ Cámara de flujo laminar
- ✓ Lámpara de desinfección

2.3.4. Instalaciones

Laboratorios de: Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.4. Tratamiento y diseño experimental

No se utilizará diseño experimental.

2.5. Mediciones experimentales

Concentración de *Lactobacillus* sp de las muestras obtenidas en tres porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) de los cerdos de 21 y 40 días de edad:

- ✓ UFC/g duodeno, yeyuno íleon. (21 días)
- ✓ UFC/g duodeno, yeyuno íleon. (40 días)

Caracterización de *Lactobacillus* sp mediante tinción Gram de muestras obtenidas de los cerdos de las diferentes edades y de las tres porciones del intestino delgado.

- ✓ Gram positiva
- ✓ Gram negativa

Caracterización bioquímica de las diferentes especies de *Lactobacillus* sp.

- ✓ Catalasa
- ✓ Oxidasa
- ✓ Peróxido de potasio
- ✓ Prueba de movilidad
- ✓ Prueba de acidificación
- ✓ Fermentación de carbohidratos
- ✓ Crecimiento en bilis de buey deshidrata

2.6. Técnicas estadísticas

Estadística descriptiva: media, desviación estándar, varianza, porcentajes e histogramas de frecuencias.

2.7. Metodología de la evaluación

En la presente investigación se utilizará el siguiente procedimiento:

2.7.1. Sacrificio de los animales

Los animales para sacrificio deben ser evaluados por una inspección ante-mortem, posteriormente se realiza el sacrificio por acuchillado. El cuchillo debe estar limpio y afilado y suficientemente largo para la especie y el tamaño del animal. El animal deberá estar colgado de sus extremidades inferiores para inmovilizarlo y facilitar el corte de ambas arterias carótidas, o los vasos de las que se derivan (cerca al corazón). Después del acuchillado, se debe dejar que el animal se desangre hasta la muerte antes que se faene o se estimule eléctricamente. Los tiempos mínimos son 25 segundos después del acuchillado de cerdos. (FAO, 2007, pp. 9-10).

2.7.2. Extracción del tracto gastrointestinal

Una vez sacrificados los animales se procederá a trasladarlos a un lugar limpio y desinfectado, posteriormente se realizará un corte transversal en la cavidad abdominal que permitirá exponer los diferentes aparatos y órganos del cerdo, de esta manera se efectuará la extracción del tracto gastrointestinal para poder obtener las muestras de intestino delgado de donde se pretende encontrar las bacterias del genero *Lactobacillus* sp. (FAO, 2007, pp. 9 -10).

2.7.3. Recolección de las muestras

El procedimiento de preparación de las diluciones de las muestras fue realizado de la cual estable, pesar 10g de la muestra y colocar en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada previamente esterilizada, agitar el envase hasta su homogenización, dilución 1:10. Transferir 1 mL de la dilución anterior a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, obteniendo de esta manera la dilución 1:100, (Mecánica et al., 2015, p. 25).

2.7.4. Siembra

Para la siembra se utilizó Agar MRS el prepara 70 gramos del Agar MRS y se disuelve en 1000 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en el autoclave a 121oC por 15 minutos, (Francisco Galindo Montero, 2016, p. 23)

Las siembras se realizan en la cámara de flujo laminar, con todos los objetos necesarios completamente esterilizados para evitar cualquier tipo de contaminación en el momento de la siembra de las cepas (Francisco galindo Montero, 2016, p. 23).

2.7.5. Aislamiento de microorganismos.

Seleccionar las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las BAL de las placas que fueron utilizadas para el recuento en agar MRS. Tomar cada colonia con el asa de inoculación y sembrar en 5 mL de caldo MRS esterilizado. Incubar a 37°C por 24h. Luego del periodo de incubación, tomar una muestra con el asa y sembrar por el método de agotamiento por estría en agar MRS, pH 5.4. Incubar las placas en posición invertida a 37°C por 72h en condiciones aérobicas, (Mecánica et al., 2015, p. 28).

2.7.6. Conteos de *Lactobacillus*

El conteo de unidades formadoras de colonia es un proceso que se basa brevemente en: tomar un mililitro de una muestra y depositarlo usando para ello una pipeta en un tubo conteniendo 9 ml de una solución estéril, después de lo cual se lleva a vortex por 8 segundos, posterior a esto, 1 ml de este tubo se remueve y se introduce en un segundo tubo conteniendo también 9 ml de solución estéril. Este procedimiento se repitió hasta que la muestra estuviera diluida suficientemente (Peña et al., 2011, p. 8).

Una vez sembradas las placas se llevan a incubar a 37°C durante 48 h para el recuento de las bacterias mesófilas (Peña et al., 2011, p. 8).

Recuento en placa a las 72 horas

Para el conteo, se escogió las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, para ello se colocaron la placa petri invertida con la superficie de vidrio hacia arriba. Con un contómetro manual se hizo el recuento de las colonias presentes en la placa, asimismo se observó la morfología de las colonias de bacterias como: forma, tamaño, borde, consistencia, color. Se utilizó la siguiente fórmula para realizar el conteo en placas:

Fórmulas para conteo de UFC

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

UFC/ml ó UFC/g = No. de colonias por placa X el factor de dilución / ml de la muestra sembrada (Ruíz, 2012,p.4).

2.7.7. Conservación de cepas aisladas.

Para el almacenamiento a largo plazo, los cultivos puros de BAL se conservaron en caldo MRS que contenían glicerol al 30% (v/v) a -20° C.

Procedimiento

Se realizó el cultivo overnight a 33°C en caldo MRS de las colonias bacterianas aisladas. Se mezclaron volúmenes iguales de cultivo overnight y de glicerol al 30%, previamente esterilizado a 121°C y 1 atm de presión. Luego de colocar las cepas BAL aisladas sobre el glicerol, se agita de manera constante para lograr una mezcla uniforme. Al final se distribuye 1mL la mezcla en tubos Eppendorf, para su conservación en un ultracongelador a -20°C, (Mecánica et al., 2015, p. 32).

2.7.8. Pruebas bioquímicas

2.7.8.1. Prueba de catalasa

Se realizó un frotis sobre un portaobjetos limpio, posteriormente se adicionó entre 1 y 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %, se observó la presencia o ausencia de efervescencia para comprobar la existencia de catalasa. Las bacterias ácido lácticas son catalasa negativa.(Jaimes and Zulay 2011, p. 52).

2.7.8.2. Prueba de oxidasa

Tomar una colonia con el asa de inoculación y depositarla sobre una tira de oxidasa. La cepa es catalasa positiva cuando hay un viraje del color blanco de la tira a morado, caso contrario se reporta como catalasa negativa.(Mecánica, et al, 2015, p. 29).

2.7.8.3. Prueba de tinción de Gram

La técnica de la tinción de Gram fue desarrollada en 1884, por el bacteriólogo danés, Christian Gam, ésta técnica permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de coloración. Los organismos que retienen el color violeta se designan como Gram-positivas y aquellos que pierden el color violeta después de la decoloración con alcohol (acetona), y se tiñen con el siguiente colorante (safranina) y aparecen como rojos, se denominan Gram-negativas. Una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es realmente importante, ya que nos puede dar una idea clara de una primera clasificación de las bacterias en estudio(Francisco Galindo Montero, 2016, p. 24).

Después de 72 horas en la incubadora a 37oC, se observa notablemente el crecimiento de cada una de las cepas en los diferentes pH, por lo que fue necesario realizar una Tinción de Gram y observar en un microscopio, para comprobar o diferenciar cada una de las cepas(Francisco Galindo Montero, 2016, p. 25)

2.7.8.4. Prueba KOH

Esta prueba es un método rápido de confirmación de la tinción Gram. La ausencia de formación de hilo mucoso nos informa de la resistencia de la pared bacteriana a la solución alcalina, de modo que si la prueba KOH nos da resultado negativo (no hay hilo mucoso), la bacteria será Gram positiva, y viceversa. (De, 2011, p. 28).

Material y reactivos

Hidróxido de potasio (KOH) de Panreac (181521.1211). • Portaobjetos de vidrio

Procedimiento experimental

El método utilizado es similar al de la catalasa. Se recoge por raspado una colonia de la placa de agar con la cepa crecida y se lleva a un portaobjetos. Se le añade una gota de KOH al 3% y se observa la aparición de hilo mucoso, (De, 2011, p. 28).

2.7.8.5. Prueba de movilidad

Se observa la movilidad las cepas en el medio semisólido Sim.

Procedimiento.

Con la aguja de inoculación se toma una cepa fresca de un medio de cultivo sólido. Sembrar en línea recta por punción profunda en medio Sim, tratando de abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, en aerobiosis, (Mecánica et al., 2015, p. 30).

Las cepas móviles producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra, mientras que en las cepas inmóviles el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. (Mecánica et al., 2015, p. 30).

2.7.8.6. Prueba de fermentación de azúcares

Se formuló caldo rojo fenol que sirve de base para evidenciar la fermentación del carbohidrato glucosa, ya que posee el indicador, rojo fenol, (Mecánica et al., 2015, p. 30).

Formulación de caldo rojo fenol

El caldo base fue formulado para lograr la fermentación de un carbohidrato individual, en este caso de la glucosa. Los ingredientes se detallan en el cuadro 3 El caldo rojo fenol posee un color naranja-rojizo y un pH final de 7.4, que se ajustó con NaOH 2N, (Mecánica et al., 2015, p. 30).

Tabla 2-2: Ingredientes de caldo rojo fenol

Ingrediente	Cantidad
Peptona	12 g
Extracto de carne	1 g
NaCl	5 g
Rojo Fenol	0.018 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml

Fuente : (Mecánica, et al, 2015.,p.42).

Realizado por: Castillo C, 2021.

Procedimiento

Colocar 10 ml del caldo rojo fenol en un tubo de ensayo estéril que contiene en su interior un tubo Durham con la abertura hacia abajo. Auto clavar los tubos de ensayo a 121 °C por 15 minutos, sin exceder éste tiempo ya que el carbohidrato puede sufrir la reacción de Maillard. Con el asa de inoculación tomar una cepa aislada e inocularla en el caldo. Incubar a 32°C los tubos con los aislados de M17 y a 37° los aislados de MRS, por 48h. Si hay fermentación del carbohidrato el medio se tornará amarillo y si hay producción de gas durante la incubación de los cultivos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en el interior de los tubos Durham, reportando así la prueba como positiva (Mecánica et al., 2015, p. 30).

2.7.8.7. Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares.

En la evaluación de la tolerancia de estas cepas a pH ácido luego de activar el microorganismo, se tomaron 100 µl del cultivo y se inoculó en caldo MRS ajustado a pH 2,0 con HCL 6 M y se incubó por 2 h a 37 °C. En la determinación de la tolerancia a sales biliares de las cepas evaluadas se tomaron 100 µl del cultivo fresco y se inoculó en caldo MRS enriquecido con sales biliares (0,3%), (pH: 7,0) se incubó por 2 h a 37 °C. La confirmación de células viables se realizó con el procedimiento descrito anteriormente (Vitro et al., 2010, p. 131).

Determinación del porcentaje de células viables. El conteo de células viables se realizó por el método de conteo en placa en agar MRS. Fueron incubados a 37 °C 48 h determinando el número unidades formadoras de colonias. El porcentaje de supervivencia fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación, (Vitro et al., 2010, p. 131).

Porcentaje de supervivencia

$$(\%) = \log\text{UFCN1} \div \log\text{UFCN0} * 100$$

Donde N1 representa el total de células viables después de los tratamientos y N0 representa el número inicial de BAL inoculada (Vitro et al., 2010, p. 131).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Concentración de *Lactobacillus* sp de las muestras obtenidas en tres porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon)

3.1.1. 21 días de edad

Los resultados conseguidos en la presente investigación, en la concentración de las unidades formadoras de colonias en los cerdos de 21 días de edad, en el duodeno existe una media de 9.2175×10^6 UFC/g con una desviación estándar de ± 6.74 , en cuanto al yeyuno tiene una media de 9.64×10^6 UFC/g y una desviación estándar de ± 2.24 y en el íleon obtuvimos una media de 9.191071×10^6 UFC/g con una desviación estándar de ± 1.44 como se observa en el gráfico 5.3

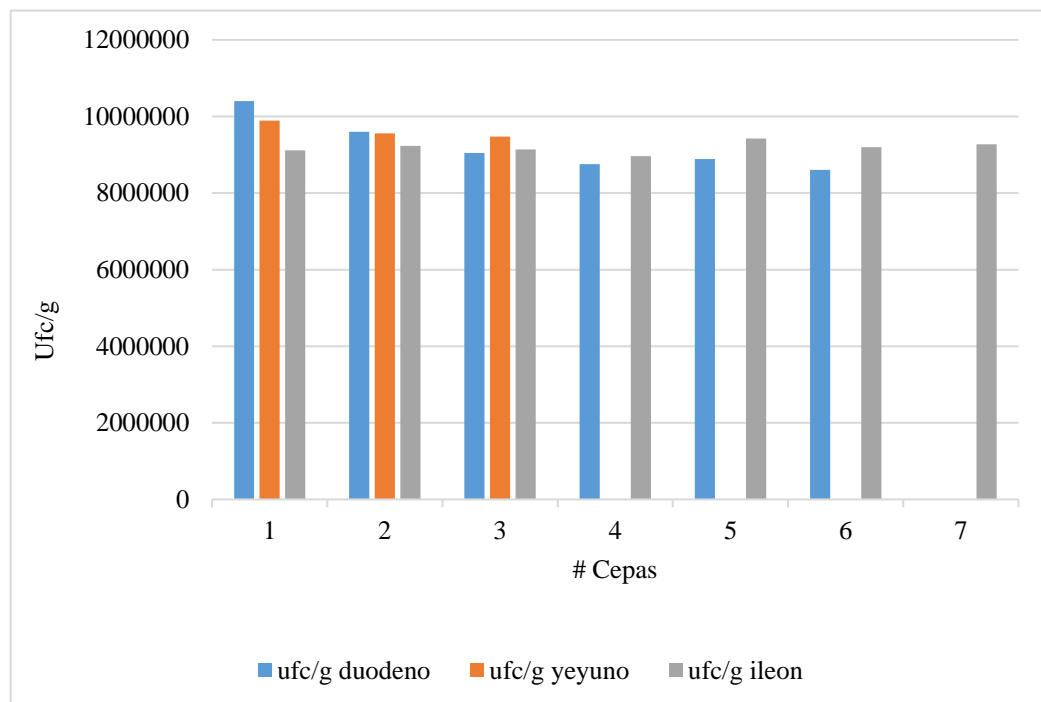


Gráfico 1-3: Ufc/g del intestino delgado de 21 días de edad
Realizado por: Castillo C, 2021.

Según (Sayan et al., 2018.,p.) menciona que, en el duodeno de lechones se encontró 5,41 Log₁₀ ufc comparativamente con nuestros propios resultados de la concentración de unidades formadoras de colonias del duodeno son mayores debido a diferentes factores como la crianza, dieta y medio

ambiente, además, que en el intestino delgado es menos conveniente debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y gracias a la existencia de oxígeno como afirma (Mena, 2019.,p. 47).

(Kalita et al., 2021.,p.138) dice que, en los lechones de 20 días se encontró en el yeyuno una concentración de 6,04 Log10 ufc, respectivamente siendo estos resultados mayores a los encontrados en el yeyuno , las razones más conocidas son el manejo, crianza, dieta y medio ambiente, también, que el intestino delgado es menos favorable debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y debido a la presencia de oxígeno como menciona (Mena, 2019.,p. 47) en sus estudios.

Al realizar la comparación de los datos obtenidos por (Kalita et al., 2021.,p.138) en lo que se refiere a la concentración de las unidades formadoras de colonias del íleon se reporta que se encontró 7.66 Log10 UFC, los valores de la presente investigación son inferiores esto se debe al manejo, crianza, dieta y medio ambiente, igualmente, que el intestino delgado es menos favorable debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y debido a la presencia de oxígeno como menciona (Mena, 2019.,p. 47) en sus estudios.

(Díaz Ferrer et al., 2012.,p15.) Cita que, un producto probiótico debería contener $>10^{-6}$ a 10^{-8} CFU/g ó $>10^8 - 10^{10}$ UFC/dosis de células viables estando nuestros resultados dentro del rango mínimo de UFC viables.

3.1.2. 40 días de edad

Los resultados obtenidos en la presente investigación en cuanto a la concentración de las unidades formadoras de colonias en los cerdos de 40 días de edad en el duodeno existe una media de $9.90^{75} \times 10^6$ UFC/g con una desviación estándar de ± 4.03 , en cuanto al yeyuno tiene una media de 9.296875×10^6 UFC/g con una desviación estándar de ± 5.48 , mientras que, en la última parte del intestino delgado en el íleon tenemos una media de 9.18×10^6 UFC/g y con una desviación estándar de ± 4.44 como se observa en el gráfico 6.3

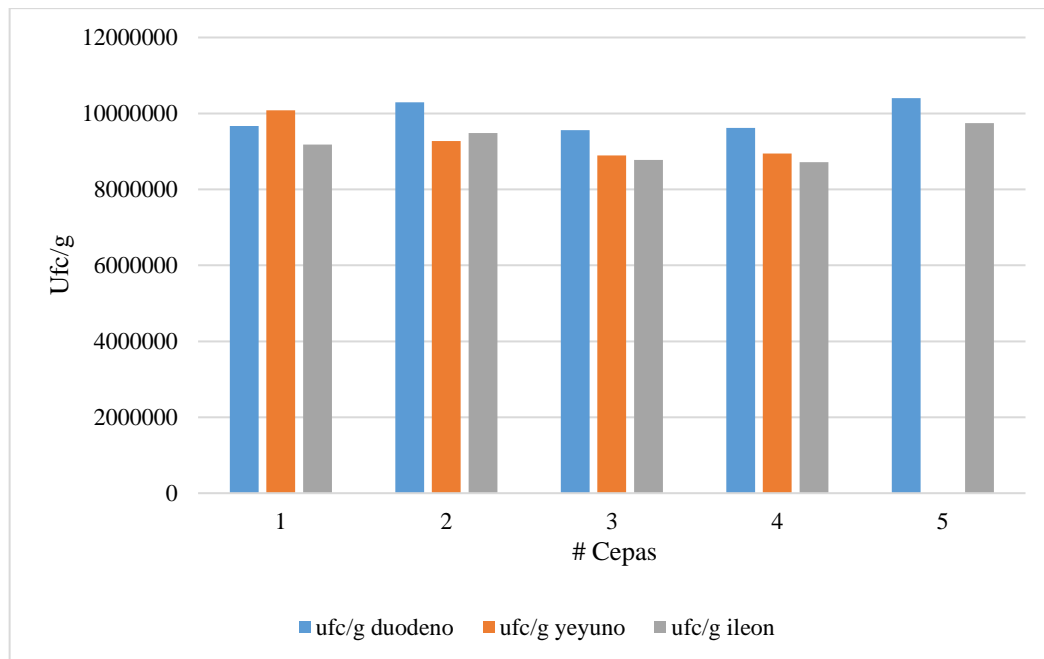


Gráfico 2-3: Ufc/g del intestino delgado de 40 días de edad

Realizado por: Castillo, Carlos 2021.

Según (Kalita et al., 2021.,p. 130), en el duodeno se encontró 6,20 Log₁₀ ufc, en comparación con nuestros resultados de la concentración de unidades formadoras de colonias del duodeno son mayores debido al manejo, crianza, dieta y medio ambiente, además, que el intestino delgado es menos favorable, debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y debido a la presencia de oxígeno como manifiesta (Mena, 2019.,p. 47).

(Kalita et al., 2021.,p.138) dice que, encontró en el yeyuno una concentración de 6,06 Log₁₀ ufc, respectivamente siendo estos resultados mayores a los encontrados en el yeyuno , la principales causas es el manejo, crianza, dieta y medio ambiente, también, que el intestino delgado es menos favorable, debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y debido a la presencia de oxígeno como menciona (Mena, 2019.,p. 47) en sus estudios.

Al realizar la comparación de los datos obtenidos por (Ionut et al., 2020.,p. 13) menciona que, en el ileon se encontró una concentración de UFC de 10⁵ -10⁸, estos resultados son casi similares a los encontrados ,ya que, está dentro del rango mínimo, siendo las principales razones manejo, crianza, dieta y medio ambiente además que el intestino delgado es menos favorable, debido al bajo pH en el estómago y a la descarga de sales biliares en el intestino y debido a la presencia de oxígeno como menciona (Mena, 2019.,p. 47).

Según (Diaz Ferrer et al., 2012.,p. 15) menciona que, un producto probiótico debería contener >10⁻⁶ a 10⁻⁸ CFU/g ó >10⁸ – 10¹⁰ UFC/dosis de células viables estando nuestros resultados dentro del rango mínimo de UFC viables aunque existe algunos factores que reducen capacidad de reproducción como es la temperatura y condiciones del medio como dice (Mogoll et al., [sin fecha],p.126) en su investigación.

3.2. Caracterización de *Lactobacillus* sp mediante tinción Gram de muestras obtenidas de los cerdos de las diferentes edades y de las tres porciones del intestino delgado

3.2.1. Morfología de las cepas aisladas del intestino delgado del cerdo

Después de la observación macroscópica de las cepas aisladas, se describen morfológicamente a las colonias de esta manera hacemos una comparación de nuestras colonias con la morfología de las colonias de *Lactobacillus* sp ya conocidas, presentando características propias de los *Lactobacillus* como es el color, tamaño, forma y superficie. El tamaño de las cepas aisladas tiene un diámetro de 0,1 a 5mm, el color es blanco y crema, con una forma circular e irregular, y una superficie convexa, liza y cóncava como se observa en la tabla 1.3.

Tabla 1-3: Morfología de las cepas aisladas

# CEPA	Forma	Color	Tamaño(mm)	Superficie
1	Circular	Crema	0,5	Liza
2	Irregular	Blanca	1	Concavo
3	Irregular	Blanca	3	Liza
4	Irregular	Crema	2	Convexo
5	Irregular	Blanca	4	Liza
6	Irregular	Blanca	2	Convexo
7	Irregular	Blanca	5	Convexo
8	Circular	Blanca	0,1	Liza

Realizado por: Castillo C, 2021.

Según (Mena, 2019.p. 32) manifiesta que, se aislaron 12 cepas del intestino delgado en su investigación, las cepas aisladas en la presente investigación son menores, debido a algunos factores que disminuyen capacidad de reproducción como es la temperatura y condiciones del medio como menciona (Mogoll et al., [sin fecha],p. 126)

En cuanto al tamaño de las cepas aisladas los resultados son casi semejantes a lo dicho por (Cortez, Rodrigo & Aranguren, 2014, pp. 5-6), los cuales, manifiestan que las cepas de *Lactobacillus* forman colonias de color blanco cremoso, puntiformes, con bordes enteros, y superficie convexa, además (Landa-Salgado et al., 2019.,p.75) reporta que el tamaño variable de entre 1 y 5 mm de diámetro al comparar con nuestros resultados son semejantes.

3.2.2. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

En la identificación bioquímica realizada en el Laboratorio de Ciencias biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias se obtuvieron los siguientes resultados como se describe en la tabla 2.3.:

Tabla 2-3: Identificación bioquímica de cepas aisladas

Cepas	Tinción	Catalasa	Oxidasa	KOH
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
8	+	-	-	-

Realizado por: Castillo C, 2021.

Según la morfología se aislaron 8 cepas todas Bacilos Gram positivos, las cuales, luego de realizarlas todas las pruebas bioquímicas básicas se llegó a la conclusión que son bacterias ácido lácticas, para que una bacteria sea considerada como lactobacilo debe ser negativo a oxidasa, catalasa e hidróxido de potasio, y positivo a tinción Gram como manifiesta (Martínez y Steven, 2019.p.28) y (Almeida, 2017.p.28) en su investigación al comparar con nuestros resultados son semejantes a los descritos por las dos investigaciones antes mencionadas.

De igual manera, (Sánchez y Ochoa, 2016.p.8) dice que, la caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias ácido lácticas halladas, todas las colonias que se tiñen de azul, son seleccionadas como bacterias ácido lácticas por la especificidad del medio y por lo tanto son bacilos Gram positivos, siendo nuestros resultados similares como se puede observar en la tabla 2.3 donde todas las cepas aisladas del intestino delgado son bacilos Gram positivos

3.2.3. Actividad acidificante (pH)

Las 8 cepas aisladas del intestino delgado fueron sometidas a la prueba de actividad acidificante, los resultados obtenidos en la presente investigación fueron los siguientes a las 6 horas se obtuvo una media de 6,49 con una desviación estándar de $\pm 0,35$ y a las 12 horas una media de 5,93, con una desviación estándar de $\pm 0,48$

Al realizar el t de student se observa que existen diferencias altamente significativas al realizar la prueba de acidificación, a las cepas aisladas del intestino delgado del cerdo a 6 y 12 horas aceptándose un 99 % de certeza y un 1% de error.

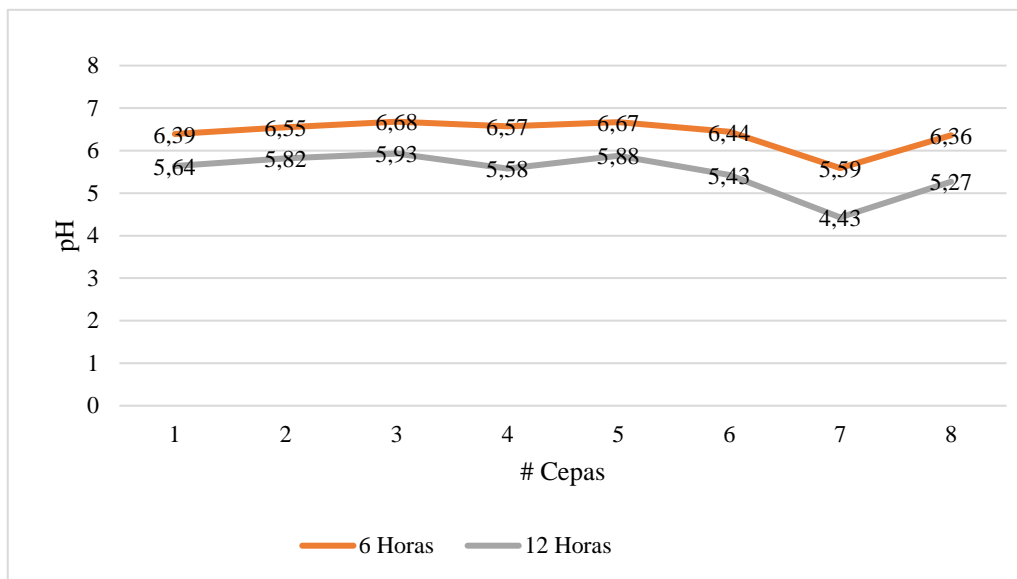


Gráfico 3-3: Prueba de acidificación de las bacterias aisladas

Realizado por: Castillo Carlos 2021.

Según (Moreno Galarza 2012, p. 50), en su investigación menciona que la resistencia al pH bajo, es una de las propiedades principales en los microorganismos probióticos, la razón se debe al transporte de los microorganismos benéficos por el sistema digestivo luego de haber resistido a la alta acidez que se encuentra en el estómago, al indagar los datos que obtiene (Vélez-rui, 2016.p.9) donde manifiesta que para ser bacterias ácido lácticas las diferencias en los valores de pH entre la cepa más y la menos acidificante fue de aproximadamente 1 unidad de pH, comprobados con nuestros resultados son casi semejantes tanto a las 6 y 12 horas.

Además, (Sánchez y Ochoa, 2016.p.8) señala que, asimismo, se puede considerar que todas son ácidas con PH que van de 3,75 a 5,74 siendo estos resultados casi similares a los alcanzados en la presente investigación, a las 12 horas con un promedio de 5,49 a las 12 horas en , el cual, está dentro del rango antes indicado.

3.2.4. Crecimiento en bilis de buey deshidratada

Con el propósito de evaluarla habilidad de las cepas aisladas de intestino delgado del cerdo para crecer en presencia de sales biliares al 0,3% de concentración. Como resultado de dicha prueba, se observó que las 8 cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en un medio del 0,3% de sales biliares.

Las cepas aisladas toleraron el crecimiento en sales biliares, la cual, simula las condiciones que tienen que pasar cualquier bacteria por el tracto gastrointestinal del cerdo, las cepas seleccionadas que resistieron a la prueba son óptimas para la preparación de probióticos y pueden ser usados como probioticos, siendo la cepa 6 quien tiene un mayor porcentaje de supervivencia del 77% mientras la cepa 5 es la que menor tolerancia tiene a las sales biliares con un 57,47%, como se observa en el gráfico 9,3.

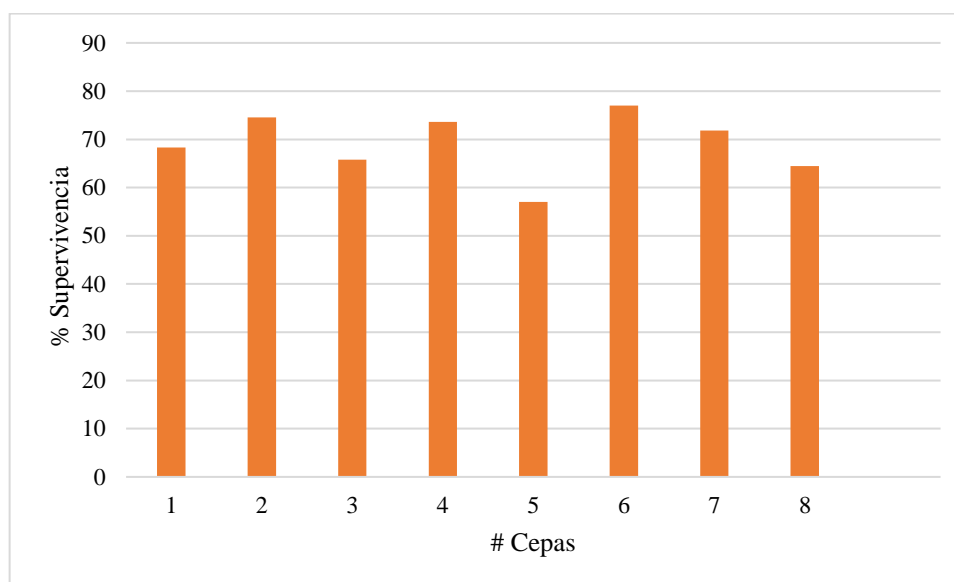


Gráfico 4-3: Crecimiento de cepas aisladas en bilis al 0,3%

Realizado por: Castillo C, 2021.

Según (Vera-Mejia et al., 2018.,p 3.) manifiesta que, en su indagación que las cepas, se dividen como resistentes por encima del 68 % (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9 % (T) y sensibles por debajo de 33,9 %, al comparar nuestros resultados se observó que existen 5 cepas calificadas como resistentes con un porcentaje superior al 68% y tolerantes 3 cepas con un porcentaje inferior al 66,9%.

Según (Song et al., 2015.p. 553), las cepas de Lactobacillus subsisten viables cuando se exponen a valores de pH de 2.5-4.0, pero presentan pérdida de viabilidad a valores de pH más bajos las cepas tolerantes al ácido poseen la superioridad de sobrevivir en las condiciones de pH bajo del estómago , donde se producen ácidos clorhídrico y gástrico. (Huang et al., 2020.p.8) señala que, un

cultivo probiótico eficaz, las bacterias ácido lácticas deben ser viables con alrededor del 0,3% de sales biliares al comparar nuestros resultados todos las cepas resistieron a las sales biliares ya sea en menor o mayor porcentaje.

3.2.5. Prueba de fermentación de azúcares

La prueba de fermentación de azúcares ayuda a la identificación de las especies de *lactobacillus sp* que existe en el intestino delgado, las cuales pasaron las pruebas de resistencia a las sales biliares siendo la principal prueba para que una bacteria sea considerada como posible candidata a convertirse en un probiótico. Obteniéndose los siguientes resultados como se describe en la tabla 3.3.

Tabla 3-3: Resultados de la prueba de fermentación de azúcares

# Cepa	Glucosa	Fructosa	Lactosa	Maltosa	Manitol
1	+	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-
3	+	-	+	+	-
4	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+

Realizado por: Castillo C, 2021.

De acuerdo a los resultados conseguidos en la prueba de fermentación de azúcares, la cepa 1 proporcionó resultados positivos a lactosa, fructosa, maltosa y glucosa, negativo a manitol, el cual es semejante a los resultados descritos por (Huang et al., 2020.p.3) y (Ahmad et al., 2018.p.3) siendo en esta última investigación donde dio positivo el manitol lo cual lo identifica como *lactobacillus fermentarun*.

La cepa 2 luego de ejecutar la prueba de fermentación de azúcares se consiguió los siguientes resultados dando negativo a lactosa, maltosa y manitol siendo iguales a los resultados mencionados por (Huang et al., 2020.,p.3) y positivo a fructosa y glucosa siendo identificando como *lactobacillus delbrueckii*.

Los resultados de la fermentación de azúcares de la cepa 3 dio positivo a lactosa, maltosa y glucosa siendo semejantes a los descritos por (Zhao y Gänzle, 2018.p.37) y negativo a fructosa y manitol siendo semejantes estos resultados a los observados por (Coman et al., 2019.,p. 1252) identificándolo como *lactobacillus reuteri*.

La cepa 4 después de analizar los resultados de la fermentación de azúcares siendo positivo a lactosa, fructosa, maltosa, manitol y logrando un resultado negativo en glucosa el cual puede ser variable en su fermentación como lo descrito por (Ahmad et al., 2018.p.3) identificándolo como un *lactobacillus casei*.

En la pruebas de fermentación de azúcares la cepa 5 se observó resultados positivos a lactosa, fructosa, maltosa y glucosa, negativo a manitol, siendo iguales los resultados encontrados por (Huang et al., 2020.p. 3), siendo identificado como *lactobacillus acidiphilus*.

De los resultados obtenidos en la prueba de fermentación de azúcares , de la cepa 6 los cuales son positivos a lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol los cuales son iguales a los resultados que manifiesta al igual que (Peralta, 2014, p. 48) en sus investigaciones lo identifican como *lactobacillus brevis*.

Los resultados logrados luego de la prueba de fermentación de azúcares de la cepa 7 se observó resultados negativos manitol y positivos para maltosa, lactosa, fructosa y glucosa positivos como lo describe en Abis Enciclopedia siendo identificado como, *lactobacillus johnsonii*.

De acuerdo a los resultados de la fermentación de azúcares de la cepa 8 la cual dio resultados positivos a lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol siendo sus resultados igual a los relatados por (Ahmad et al., 2018.p.3) de igual manera manifiesta (Peralta, 2014, p. 47) siendo identificado como *lactobacillus plantarun*.

CONCLUSIONES

Al realizar el aislamiento de las cepas obtenidas del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) de los cerdos de las dos edades se encontraron 8 cepas en total.

Al realizar la caracterización e identificación de las cepas aisladas mediante las pruebas bioquímicas se hallaron que eran bacilos positivos, oxidasa, catalasa, y KOH negativos además se realizó las pruebas de acidificación, movilidad y de crecimiento en bilis de buey, la cual, nos ayuda a ver cuáles cepas tienen capacidades probióticas siendo la cepa 7 la de mayor supervivencia con un 77% y la cepa 5 de menor porcentaje de supervivencia con un 57,04% al exponerlas a la bilis de buey.

Al analizar todos los resultados obtenidos en la investigación se podría decir que es posible la utilización de las cepas aisladas del intestino delgado de los lechones como posibles cepas probióticas para la utilización en alimentación animal especialmente al momento del destete.

RECOMENDACIONES

Con el fin de tener una mayor precisión en cuanto a la identificación bioquímica de las cepas aisladas del intestino delgado del cerdo, se sugiere la utilización que pruebas api CHL 50 específica para lactobacillus o la utilización de un PCR en tiempo los cuales nos ayudarían a una mejor identificación.

Realizar este tipo de investigación en otras especies animales de carácter zootécnico y en distintas partes del tracto gastrointestinal para determinar la existencia de una mayor cantidad de microorganismos con capacidad probióticos que puedan ser usadas en las mismas especies.

BIBLIOGRAFÍA

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

AHMAD, M.S., ZARGAR, M., MIR, S., et. al. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Morphological and Biochemical Studies For The Identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., From Municipal Waste. vol. 7, no. 5, pp. 1421-1424. ISSN 2278-4136. DOI 10.13140/RG.2.2.13721.06240.

ALMEIDA, L., *Universidad Central Del Ecuador*, Universidad Central Del Ecuador. pp. 105.

ANTONIO, M.P.L., Universidad estatal del sur de manabí. [en línea], no. 05, pp. 108. Disponible en: <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2305>.

ARCE, V., Utilización del probiótico *Lactobacillus acidophilus*, como aditivo en la alimentación de cerdos lactantes. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil] [en línea], Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/15274/1/TesisViviana revision final.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/15274/1/TesisViviana%20revisi%20final.pdf).

CABRERA AGUAYO, P.J. & ANDUEZA, F. *Evaluación Microbiológica de las aguas termales del balneario las Peñas, cantón Baños, provincia Tungurahua*. Facultad de Ciencias [en línea], vol. Bachelor, pp. 100. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4633>.

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

COMAN, M.M., VERDENELLI, M.C., et. al. *Probiotic characterization of Lactobacillus isolates from canine faeces*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 126, no. 4, pp. 1245-1256. ISSN 13652672. DOI 10.1111/jam.14197.

CORTEZ, RODRIGO & ARANGUREN, A., *Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico del género Lactobacillus SPP a partir de heces de perros (Canis Lupus Falmiliaris) Mestizos Lactantes. Rvsp* [en línea], vol. 19, pp. 5-10. Disponible en: http://bibvirtual.ucla.edu.ve/cgiwin/be_alex.exe?Autor=Gonz%20E11ez,+M.&Nombrebd=RVSP&

Sesion=276824151&TipoDoc=S.

DE, M., *Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de teruel*, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria pp. 28.

DEL, A.I. & NATURAL, M., Inclusión de subproductos de pulpa de cítricos en dietas de cerdos de cebo: rendimientos productivos y estudio de la salud intestinal. (Trabajo de titulación (grado) Universidad Politécnica de Valencia pp. 12, 2020. Disponible en <http://hdl.handle.net/10251/150936>.

DIAZ FERRER, J., PARRA, V., BENDAÑO, T., MONTES, P. & SOLORZANO, P., *[Probiotic supplement (Lactobacillus acidophilus and bulgaricus) utility in the treatment of irritable bowel syndrome]*. Revista de gastroenterología del Perú : órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú, vol. 32, no. 4, pp. 387-393. ISSN 1609722X.

DRUCKER, J. & OSTER, H., Aislamiento de microorganismos probióticos del tracto intestinal de gallus gallus en tres estadios fisiológicos de pollos (trabajo de titulación) tesis de grado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias pp.25-28 Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5234>.

FAO, *Buenas Prácticas para la Industria de la carne*. Manejo presacrificio y métodos de aturdimiento y de matanza. [en línea], pp. 1-20. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5454s/y5454s08.pdf>.

FARMACIA, E.D.E.B.Y., PAOLA, T. & ARGUELLO, F., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo “ identificación de bacterias termodúricas en. perros”.

FRANCISCO GALINDO MONTERO, V., *Facultad de ciencia y tecnología*. Google academico [en línea], pp. 111 pag. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>.

HUANG, J., ZHANG, W., HU, Z., LIU, Z., DU, T., DAI, Y. & XIONG, T., *Livestock Science*. Isolation, characterization and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from feces of wild boar, native pig and commercial pig. [en línea], vol. 237, no. 235, pp. 104036. ISSN 18711413. DOI 10.1016/j.livsci.2020.104036. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104036>.

IONUT, S., MIHAELA, D., MIHAELA, H. & COSTIN, S., *Archiva Zootechnica*, Lactobacillus Spp . strains isolation, identification, preservation and quantitative determinations from the intestinal content and faeces of weaned piglets . vol. 23, no. 2, pp. 84-100. ISSN 2344-4592. DOI 10.2478/azibna-2020-0015.

JAIMES, G. & ZULAY, Y., *Revencyt-RedidiCiencia.Aislamiento, identificación y caracterización molecular de Lactobacillus sp*, provenientes de diferentes fuentes animales y ensilados : su evaluación como potencial probiótico para nutrición animal|<http://bdigital.ula.ve/RediCiencia/>. ,

KALITA, A., HUSBANDRY, A., KALITA, P.C., et. al. *Alteration of lactic acid bacteria profile in piglets after dietary supplementation of probiotics*: a comparative study supplementation of probiotics : a comparative study. , no. July, pp. 3-6.

LANDA-SALGADO, P., CABALLERO-CERVANTES, Y., et. al. *Isolation and identification of potentially probiotic lactic acid bacteria for Holstein calves in the Mexican Plateau*. Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias, vol. 10, no. 1, pp. 68-83. ISSN 20071124. DOI 10.22319/rmcp.v10i1.4512.

MENA, G., Universidad nacional de tumbes escuela de posgrado. [en línea], pp. 0-42. Disponible en: [http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/UNITUMBES/1042/QUILICHE CABANILLAS%20IRMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/UNITUMBES/1042/QUILICHE%20CABANILLAS%20IRMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

MIRANDA-HEVIA, R., Microbiota digestiva del cerdo: determinación del patrón en condiciones de salud y enfermedad. , pp. 188.

MOGOLL, C.R., MOGOLL, G.O., AGUILERA, A., QUEREVAL, J. & JEFATURA, B, [sin fecha]. tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) propuestos para alimentación porcina Introducción. , no. II, pp. 120-137.

MORENO GALARZA, L.J., *Aislamiento y Selección de Lactobacillus sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas*. Posgrado Interfacultades de Microbiología, vol. Maestría e, pp. 109.

MURILLO, E. & PULLUPAXI, L., *Aislamiento e identificación de microorganismos fermentadores de una bebida ancestral fermentada (chicha) a partir de Chonta* (*Bactris gasipes* H.B.K). [en línea], pp. 90. Disponible en:

<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>.

PEÑA, C., PEÑA, L. & MORENO, G., *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada Sistema de Visión Artificial para el Reconocimiento y el Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).* [en línea], vol. 1, no. 17, pp. 9-15. Disponible en: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallIG/home_40/recursos/03_v13_18/revista_17/03122011/02.pdf.

PERALTA, L.P., *Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a Listeria monocytogenes y Escherichia coli.* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco,

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

ROCA-CANUDAS, M., *Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares.* [en línea], pp. 172. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/5618>.

RONDÓN, A., MILIÁN, G., SAMANIEGO, L., BOCOURT, R., LAURENCIO, M. & PÉREZ, M., *Aditivos alimentarios sustituyentes de los antibióticos en la avicultura moderna. uso de las bacterias ácido lácticas como probióticos.* Monografías, Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Cuba, vol. 2008, no. c.

RUÍZ, C., *Activación E Identificación Bioquímica De Los Conglomerados De Bacterias Probióticas Abt-5, Aby-3 Y Bc-7 Utilizando El Kit Rápido Api 50 Ch.* Delos, vol. 5, no. 13, pp. 16. ISSN 1988-5245.

SÁNCHEZ, H. & OCHOA, G., *Molecular identification of lactobacilos of the digestive tract of piglet (Sus scrofa domesticus).* Manglar, vol. 13, no. 1, pp. 3-16. ISSN 18167667. DOI 10.17268/manglar.2016.002.

SAYAN, H., ASSAVACHEEP, P., ANGKANAPORN, K. & ASSAVACHEEP, A., *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,* Effect of Lactobacillus salivarius on growth performance, diarrhea incidence, fecal bacterial population and intestinal morphology of suckling pigs challenged with F4+ enterotoxigenic Escherichia coli. vol. 31, no. 8, pp. 1308-1314. ISSN 19765517. DOI 10.5713/ajas.17.0746.

SONG, M., YUN, B., MOON, J.H., PARK, D.J., LIM, K. & OH, S., *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, Characterization of selected lactobacillus strains for use as probiotics. vol. 35, no. 4, pp. 551-556. ISSN 12258563. DOI 10.5851/kosfa.2015.35.4.551.

VÉLEZ-RUIZ, C.R.J.F., *Aislamiento , Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra Isolation , Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria from Goat Milk and Fresh Artisanal-Goat Cheese. ,* vol. 27, no. 6, pp. 115-128. DOI 10.4067/S0718-07642016000600012.

VERA-MEJIA, R., ORMAZA-DONOSO, J., MUNOZ-CEDEÑO, J., et. al. *Cepas de Lactobacillus plantarum con potencialidades probióticas aisladas de cerdos Criollos.* Lactobacillus plantarum strains with probiotic potentials isolated from Creole pigs. [en línea], vol. 40, no. 2, pp. unpaginated. ISSN 0253-570X. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2018000200004&lng=en&nr m=iso&tlng=es.

VITRO, I.N., OF, E., POTENTIAL, P., LACTIC, O.F., ACID, B. & SERUM, F.C., *Serum. Actualidades Biológicas*, Evaluación in Vitro Del Potencial Probiótico De Bacterias Ácido Lácticas Aisladas De Suero Costeño in Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Bacteria Acid Isolated From Coastal vol. 32, no. 93, pp. 129-138. ISSN 2145-7166.

ZHAO, X. & GÄNZLE, M.G., *International Journal of Food Microbiology*, Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in Lactobacillus reuteri. [en línea], vol. 272, no. 2017, pp. 12-21. ISSN 18793460. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021>.



ANEXOS

ANEXO A: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR MRS

Composición		Instrucciones
Proteasa peptona N° 3	10,0g	1. Suspender 70 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	10,0g	
Extracto de levadura	5,0g	
Dextrosa	20,0 g	
Citrato de amonio	2,0 g	
Polisorbato 80	1,0 g	
Acetato de sodio	5,0g	
Citrato de amonio	2,0g	
Sulfato de magnesio	0,1g	
Sulfato de manganeso	0,05g	
Agar	15,0g	
pH final: 6.5 ± 0.2		

ANEXOS B: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CALDO MRS

Composición		Instrucciones
Proteasa peptona	10,0g	1. Suspender 55,15 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	10,0g	
Extracto de levadura	5,0g	
Dextrosa	20,0 g	
Dipotacio de fosfato	2,0 g	
Tween 80	1,0 g	
Acetato de sodio	5,0g	
Citrato de amonio	2,0g	
Sulfato de magnesio	0,1g	
Sulfato de manganeso	0,05g	
pH final: 6.5 ± 0.2		

ANEXOS C: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE CARNE

Composición	Instrucciones
Peptona digerida de tejido animal 30,0g	1. Suspender 36,23 g en un litro de agua destilada. 2. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. 3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne 3,0g	
Hierro peptonizado 0,2g	
Triosulfato de sodio 5,0g	
Agar 3,0g	
pH final: 7,3 ± 0.2	

ANEXOS D: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL INTESTINO DELGADO DE LOS LECHONES DE 21 DÍAS

UFC/gr 21 DÍAS

Variable	<i>Ufc/gr duodeno</i>	<i>Ufc/gr yeyuno</i>	<i>Ufc/gr ileon</i>
Media	9217500	9640000	9191071,429
Error típico	275308,1607	129839,6447	54627,6823
Mediana	8968750	9555000	9195000
Desviación estándar	674364,5157	224888,8614	144531,2621
Varianza de la muestra	4,54768E+11	50575000000	20889285714
Curtosis	1,162729654	#¡DIV/0!	1,074650022
Coefficiente de asimetría	1,326174186	1,457862967	0,067774851
Rango	1795000	425000	467500
Mínimo	8607500	9470000	8960000
Máximo	10402500	9895000	9427500

ANEXOS E: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL INTESTINO DELGADO DE LOS LECHONES DE 40 DÍAS

Variable	UFC/gr 40 DIAS		
	<i>ufc/gr duodeno</i>	<i>ufc/gr yeyuno</i>	<i>ufc/gr ileon</i>
Media	9907500	9296875	9180000
Error típico	180229,021	274354,1184	198735,062
Mediana	9665000	9108750	9177500
Desviación estándar	403004,342	548708,2368	444385,109
Varianza de la muestra	1,6241E+11	3,01081E+11	1,9748E+11
Curtosis	3,03006692	1,901973987	2,13722116
Coefficiente de asimetría	0,61143582	1,490424146	0,20763369
Rango	840000	1190000	1025000
Mínimo	9560000	8890000	8720000
Máximo	10400000	10080000	9745000

ANEXOS F: T DE STUDENT PARA PRUEBA DE ACIDIFICACIÓN

<i>variable</i>	<i>6 horas</i>	<i>12 horas</i>
Media	6,40625	5,4975
Varianza	0,1231125	0,23719286
Observaciones	8	8
Coefficiente de correlación de Pearson	0,96675751	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	14,8650643	
P(T<=t) una cola	7,4718E-07	**
Valor crítico de t (una cola)	1,89457861	
P(T<=t) dos colas	1,4944E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2,36462425	

ANEXOS G: T DE STUDENT DEL CRECIMIENTO EN BILIS DE BUEY AL 0.3%.

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

ANEXOS H: PESAJE DE AGARES Y LIMPIEZA DE EQUIPO



ANEXOS I: DISECCIÓN DE INTESTINO DEL CERDO.



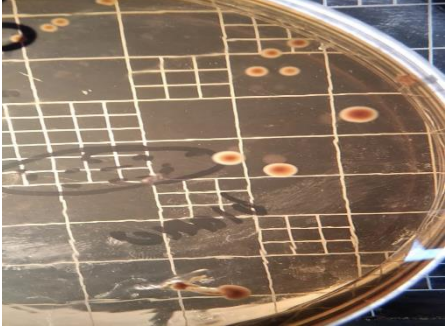
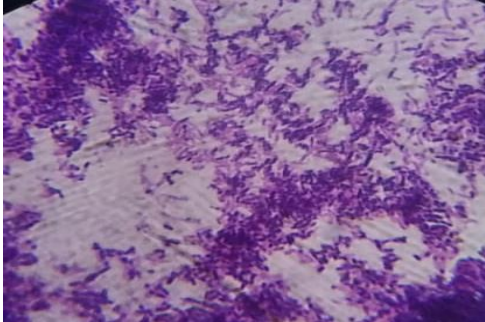
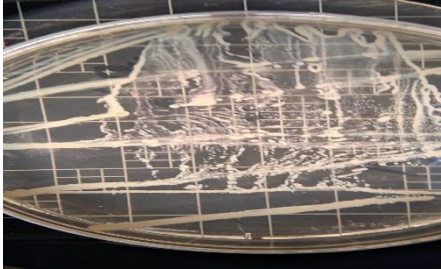
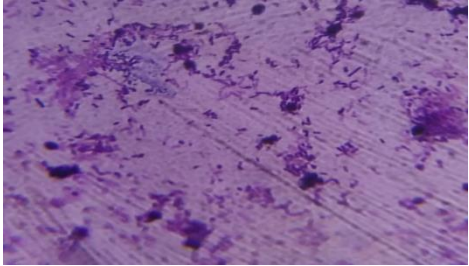

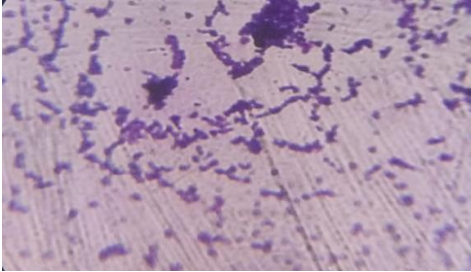

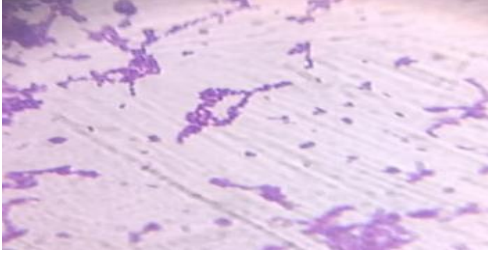
ANEXOS J: PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y SIEMBRA DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN AGAR MRS

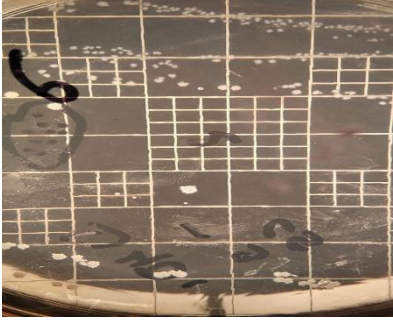
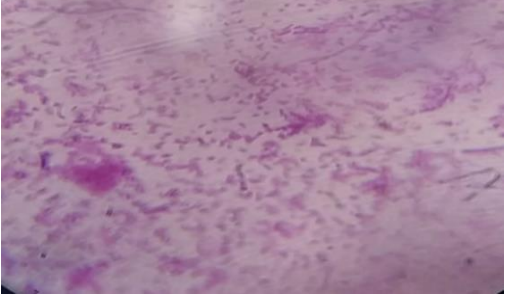
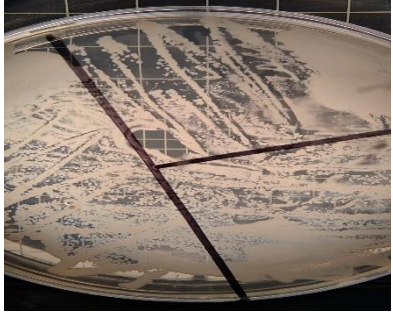
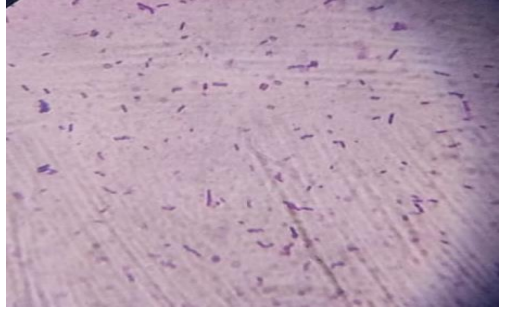

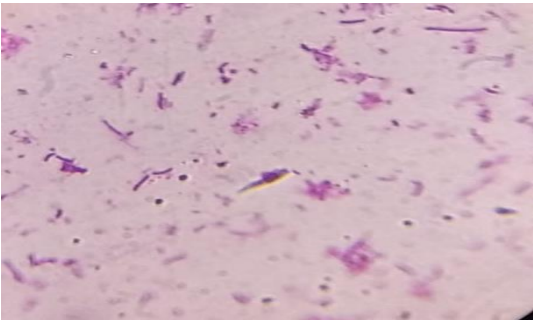
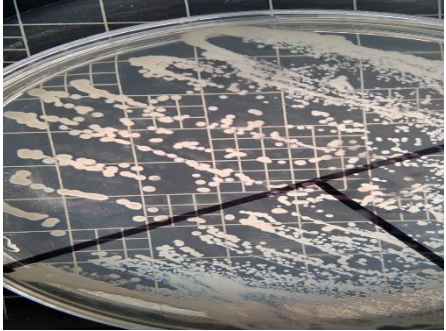
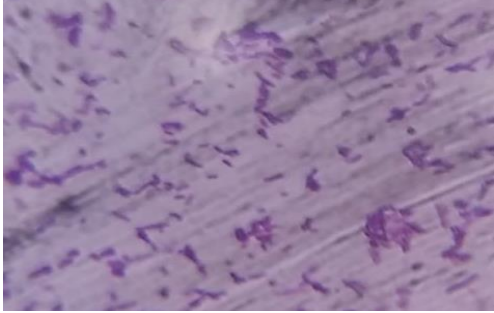


ANEXOS K: AISLAMIENTO Y CONTEO DE CEPAS DE *Lactobacillus* sp.

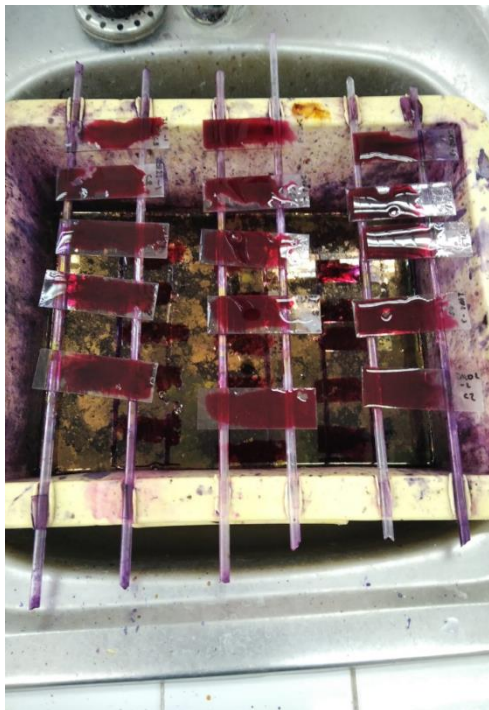
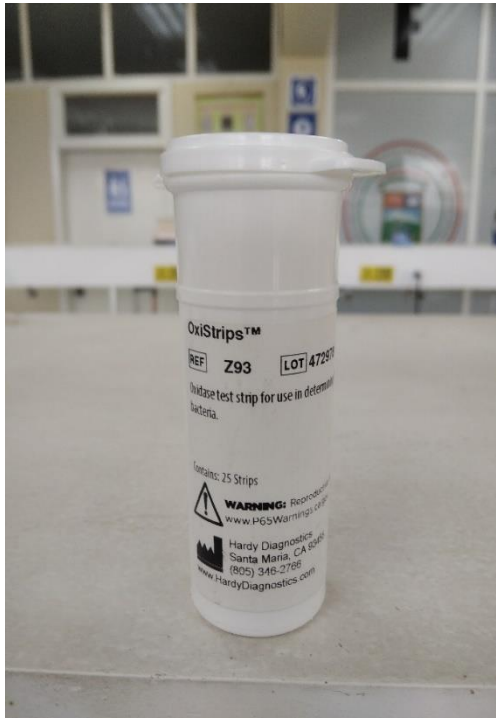


ANEXOS L: SELECCIÓN DE CEPAS MÁS TINCIÓN GRAM

# Cepa	COLONIAS	TINCIÓN
1		
2		
3		
4		

5		
6		
7		
8		

ANEXOS M: PRUEBAS BIOQUÍMICAS BÁSICAS APLICADAS A CEPAS SELECCIONADAS



ANEXOS N: PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN

