



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERIA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

**“EFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN BACTERIAS
ACIDO LÁCTICAS OBTENIDAS DEL SUELO DE RIO NEGRO,
BAÑOS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para obtener al grado académico de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTORA: JOSSELIN KATERINE CHACHA GUAMÁN

DIRECTOR: Ing. CESAR IVAN FLORES MANCHENO PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

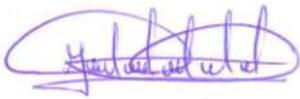
© 2022, **Josselin Katerine Chacha Guamán**

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

Yo, JOSSELIN KATERINE CHACHA GUAMÁN, 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 autora 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, 22 de diciembre de 2022



Josselin Katherine Chacha Guamán

060624184-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación: Tipo: Trabajo Experimental, “**EFEECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN BACTERIAS ACIDO LACTICAS OBTENIDAS DEL SUELO DEL BOSQUE PRIMARIO RIO NEGRO, BAÑOS**”, realizado por la señorita: **JOSSELIN KATERINE CHACHA GUAMÁN**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Paola Fernanda Arguello Hernández MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-12-22
Ing. Cesar Iván Flores Mancheno PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-12-22
Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-12-22

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad, amor han estado conmigo hasta el día de hoy. A mi hermana quien ha sido ejemplo de lucha y perseverancia, estuvo guiándome a cada paso que daba, aunque muchas veces pareciera que estuviéramos peleando, hay momentos donde el fuego desaparece y nos unimos en una sola persona para poder alcanzar todos nuestros objetivos. Gracias no sólo por ser parte fundamental de este gran logro, sino también por todos aquellos momentos bonitos que pasamos a lo largo de todo este proceso.

Josselin

AGRADECIMIENTO

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad, amor han estado conmigo hasta el día de hoy. A mi hermana Silvia Alexandra por su amor y apoyo incondicional, durante toda mi vida por estar conmigo en todo momento gracias porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona, gracias por acompañarme en todos mis sueños y metas. A mis sobrinas Sara, Abigail y Ainoha quien con sus ocurrencias no me dejaron desistir y ayudaron a perseguir mis sueños.

Finalmente, a mis amig@s Gema, Sofía y Luis por apoyarme cuando más los necesitaba, por extender su mano en momentos difíciles y por el cariño brindado cada día.

Josselin

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1. Métodos de conservación	3
1.1.1. <i>Métodos de conservación a largo plazo</i>	3
1.1.1.1. <i>Liofilización</i>	3
1.1.2. <i>Métodos de conservación a mediano plazo</i>	3
1.1.2.1. <i>Congelación</i>	3
1.1.3. <i>Métodos de conservación a corto plazo</i>.....	4
1.1.3.1. <i>Subcultivos</i>	4
1.1.3.2. <i>Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril</i>.....	4
1.1.3.3. <i>Deseccación en papel de filtro</i>.....	4
1.1.3.4. <i>Deseccación en suelo, arena, silicagel</i>.....	4
1.1.3.5. <i>Deseccación en bolitas de alginato</i>	4
1.2. Crioprotectores	5
1.2.1. <i>Características de los crioprotectores</i>	5
1.2.2. <i>Agentes crioprotectores permeables</i>	5
1.2.2.1. <i>Glicerol</i>	6
1.2.2.2. <i>Etilenglicol</i>	6
1.2.2.3. <i>Dimetil sulfóxido (DMSO)</i>	6
1.3. Bacterias ácido lácticas.....	7
1.3.1. <i>Características macroscópicas de las BAL</i>	7
1.3.2. <i>Viabilidad de las BAL</i>.....	8
1.3.3. <i>Dinámica de crecimiento de las Bacterias ácido lácticas</i>	9

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	12
2.1.	Localización y duración del experimento	12
2.2.	Unidades Experimentales	12
2.3.	Materiales, equipos e instalaciones	12
2.3.1.	<i>Materiales</i>	12
2.3.2.	<i>Equipos</i>	13
2.3.3.	<i>Insumos</i>	13
2.3.4.	<i>Reactivos</i>	13
2.4.	Tratamiento y diseño experimental	13
2.4.1.	<i>Esquema del experimento</i>	14
2.4.2.	<i>Análisis estadísticos y pruebas de significancia</i>	14
2.5	Mediciones Experimentales	14
2.5.1.	<i>Características macroscópicas de las bacterias ácido lácticas</i>	14
2.5.2.	<i>Viabilidad de las bacterias ácido lácticas</i>	15
2.5.3.	<i>Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas</i>	15
2.6.	Procedimiento Experimental	15
2.6.1.	<i>Siembra</i>	15
2.6.2.	<i>Aislamiento de microorganismos</i>	15
2.6.3.	<i>Conteo de Bacterias Acido lácticas</i>	15
2.6.4.	<i>Recuento en placa a las 72 horas</i>	16
2.6.5.	<i>Conservación de cepas aisladas</i>	16

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	17
3.1.	Caracterización Macroscópica de las colonias de bacterias ácido lácticas	17
3.2.	Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 0 ,7, 15, 30 días	18
3.2.1.	<i>Viabilidad de las bacterias acido lácticas a los 0 días</i>	18
3.2.2.	<i>Viabilidad de las bacterias acido lácticas a los 7 días</i>	19
3.2.3.	<i>Viabilidad de las bacterias acido lácticas a los 15 días</i>	20
3.2.4.	<i>Viabilidad de las bacterias acido lácticas a los 30 días</i>	21
3.3.	Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas	22
3.3.1.	<i>Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas a las 0 horas</i>	23
3.3.2.	<i>Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas a las 24 horas</i>	23
3.3.3.	<i>Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas a las 72 horas</i>	25
3.3.4.	<i>Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas a las 96 horas</i>	26
3.4.	pH de la solución de bacterias acido lácticas	27

CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Esquema del experimento.....	14
Tabla 2-2:	Análisis de varianza.....	14
Tabla 1-3:	Viabilidad de las Bacterias acido lácticas.....	18
Tabla 2-3:	Dinámica de crecimiento de las bacterias acido lácticas	23
Tabla 3-3:	pH de las soluciones con crioprotectores	28

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-3:	Viabilidad a los 7 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores.	19
Ilustración 2-3:	Viabilidad a los 15 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores.....	20
Ilustración 3-3:	Viabilidad a los 30 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores.....	21
Ilustración 4-3:	Comportamiento de la viabilidad de las BAL con diferentes crioprotectores de acuerdo al periodo de evaluación.	22
Ilustración 5-3:	Dinámica de crecimiento de las BAL a las 24 horas por efecto de diferentes crioprotectores.....	24
Ilustración 6-3:	Dinámica de crecimiento de las BAL a las 72 horas por efecto de diferentes crioprotectores.....	25
Ilustración 7-3:	Dinámica de crecimiento de BAL a las 96 horas por efecto de diferentes crioprotectores.....	26
Ilustración 8-3:	Comportamiento de la dinámica de crecimiento de las BAL utilizando diferentes crioprotectores en función del periodo de evaluación.	27
Ilustración 9-3:	Comportamiento del pH de las BAL con diferentes crioprotectores por efecto del periodo de evaluación.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** DATOS REGISTRADOS SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL EN DÍAS.
- ANEXO B:** DATOS REGISTRADOS SOBRE LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO EN LAS BAL EN DÍAS.
- ANEXO C:** ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 7 DÍAS.
- ANEXO D:** ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 15 DÍAS.
- ANEXO E:** ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 30 DÍAS.
- ANEXO F:** ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL A LAS 24 HORAS
- ANEXO G:** ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL A LAS 72 HORAS
- ANEXO H:** ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL A LAS 96 HORAS
- ANEXO I:** SIEMBRA DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS
- ANEXO J:** AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS
- ANEXO K:** RECUENTO DE LAS PLACAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS
- ANEXO L:** CONSERVACIÓN DE LAS PLACAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

RESUMEN

El presente trabajo experimental se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de tres crioprotectores (glicerol, dimetil Sulfoxido y etilenglicol) en bacterias ácido lácticas obtenidas del bosque primario de Rio Negro, en lo que tiene que ver en la viabilidad en los días: 0, 7, 15 y 30 días y su dinámica de crecimiento. Se utilizó 1.5 ml de muestras del suelo por cada repetición, la cual contara de 5 repeticiones siendo en total de 22.5 ml. Se aplicó un diseño experimental DCA con un solo factor, los resultados experimentales obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza, separación de medias (Prueba de Tukey con un valor $P \leq 0.05$) y estadística descriptiva. De acuerdo a nuestros resultados las características macroscópicas de las colonias BAL presentan una forma redonda puntiforme, un color blanco cremoso y un aspecto entero y un tamaño de 1,2 mm. Con respecto a la viabilidad de las BAL el mejor fue el crioprotector glicerol ya que presento a los 0 días 0,00 UFC/mL; a los 7 días 71.20 UFC/mL, a los 15 días de 154.40 UFC/mL y finalmente a los 30 días de 174.20 UFC/mL. En lo referente a la dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas al emplear el glicerol obtuvo un mejor crecimiento de las BAL en las que presento a las 24 horas 9.8 UFC/mL, a las 72 horas 19,0 UFC/mL y a las 96 horas de 35,4 UFC/ml. Por lo que se recomienda emplear el glicerol como crioprotector para el desarrollo y crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Palabras clave: <GLICEROL>, <ETILENGLICOL >, <DIMETIL SULFÓXIDO>, <CRIOPROTECTORES >, <BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS>.

0124-UPT-DBRA-2023

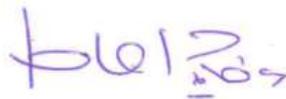


ABSTRACT

This experimental work was carried out with the objective of evaluating the effect of three cryoprotectants (glycerol, dimethyl sulfoxide and ethylene glycol) on lactic acid bacteria obtained from the primary forest of Rio Negro, with regard to viability at days 0, 7, 15 and 30 days and their growth dynamics. A total of 1.5 ml of soil samples were used for each repetition, which consisted of 5 repetitions, with a total of 22.5 ml. A DCA experimental design with a single factor was applied. The experimental results obtained were subjected to analysis of variance, separation of means (Tukey's test with a P value ≤ 0.05) and descriptive statistics. According to our results the macroscopic characteristics of BAL colonies present a round punctiform shape, a creamy white color and an entire appearance and a size of 1.2 mm. Regarding the viability of the LAB, the best was the cryoprotectant glycerol since it presented at 0 days 0.00 CFU/mL; at 7 days 71.20 CFU/mL, at 15 days 154.40 CFU/mL and finally at 30 days 174.20 CFU/mL. With regard to the growth dynamics of lactic acid bacteria, the use of glycerol resulted in a better growth of LAB, with 9.8 CFU/mL at 24 hours, 19.0 CFU/mL at 72 hours and 35.4 CFU/mL at 96 hours. Therefore, it is recommended to use glycerol as a cryoprotectant for the development and growth of lactic acid bacteria.

Keywords: <GLYCEROL>, <ETHYLENGLICOL>, <DIMETHYL SULPHOXIDE>, <CRYOPROTECTORS>, <ACID-LACID BACTERIA>.

0124-UPT-DBRA-2023



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco MsC.

0602698904

INTRODUCCIÓN

La técnica de crioconservación involucra el uso de crio protectores, vitrificación, deshidratación, encapsulación, micro goteo y micro placas (Ribeiro et al. 2014, p. 33).; los cuales tienen el objetivo de proteger y evitar daño letal en las membranas celulares, y eliminar así el efecto negativo sobre la viabilidad posterior a la crioconservación. Existen crioprotectores de bajo peso molecular y permeables como el etilenglicol, propilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y otros alcoholes; los de bajo peso molecular y no permeables como glucosa, sacarosa, trehalosa y prolina; los de alto peso molecular y no permeables como la polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, hialuronidato de sodio y otros polímeros (Carrillo et al. 2016, p. 43).

Estos tienen la propiedad de incrementar la osmolaridad celular, la viscosidad y deshidratar, disminuyendo el punto de congelación e inducir la vitrificación; todo esto con la finalidad de evitar el daño por formación de cristales de hielo durante la congelación ((Dominguez et al 2020, p. 3). Muchas técnicas de crioconservación incluyen un paso inicial para reducir el contenido de agua en los tejidos (deshidratación) e incrementar la viscosidad interna del citoplasma (mediante los crio-protectores), un segundo paso es el congelamiento rápido en nitrógeno líquido y el tercero involucra el descongelamiento rápido (Apaza et al. 2020, p. 18).

Por otro lado, durante el congelamiento y descongelamiento en los tejidos se puede llegar a producir daño a las membranas, dando un incremento del eflujo de iones y solutos orgánicos a través de las membranas celulares. El catión más importante que pierde la célula es el K⁺. Pocos reportes existen acerca del análisis de la pérdida de iones relacionado con el daño en los tejidos debido a los protocolos de crioconservación (Ramírez et al. 2011, p. 137).

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características fisiológicas morfológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles anaeróbicos (Tabarez, 2014, p. 36). Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos entre otras fuentes (Moreno & Velarde, 2016, p. 19)

Por todos estos aspectos y consideraciones la presente investigación plantea los siguientes objetivos

Objetivo General:

- Evaluar el efecto de tres crioprotectores (Glicerol, Dimetil Sulfoxido y Etilenglicol) en bacterias ácido lácticas obtenidas del bosque primario de Rio Negro, Baños

Objetivos Específicos

- Identificar características macroscópicas de las colonias de bacterias ácido lácticas (forma, color y tamaño).
- Determinar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas aisladas del suelo del bosque primario de Rio Negro, Baños con crioprotectores (glicerol, etilenglicol y dimetil sulfoxido) durante 0, 7, 15, 30 días.
- Establecer la dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Métodos de conservación

La preservación de los microorganismos es de gran relevancia para mantenimiento de cultivos microbianas, sin que estas alteren sus características típicas (genéticas), ni pierda la viabilidad y conserven su pureza en el transcurso de periodos largos de tiempo; por esto se han desarrollado diferentes métodos que permitan conservar los microorganismos, para luego ser empleados en futuras investigaciones (Osorio et al. 2011, p. 35).

1.1.1. *Métodos de conservación a largo plazo*

1.1.1.1. *Liofilización*

Según Mínguez & García (2012) en su investigación evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial menciona que la liofilización consiste en un proceso mediante el cual el agua es retirada de un producto congelado por sublimación bajo presión reducida

Este proceso se realiza en tres fases: primero el producto es pre congelado para asegurar una estructura inicial sólidamente congelada, después se procede con el secado primario durante el cual el 90 a 95% de agua es retirada y finalmente el producto es sometido a un secado secundario para retirar el agua restante (Ramírez et al. 2011, p. 136).

1.1.2. *Métodos de conservación a mediano plazo*

1.1.2.1. *Congelación*

La congelación bacteriana es un método físico-químico que permite conservar microorganismos viables a temperaturas entre -20°C y -80°C por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado líquido a sólido.

Las bacterias inmersas en este medio deben adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar los daños ocasionados por la aparición de cristales de hielo formados por el cambio de temperatura (Gato, 2010, p. 190).

1.1.3. Métodos de conservación a corto plazo

1.1.3.1. Subcultivos

Es el método clásico para la preservación de los microorganismos. En éste, el microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se guarda a 4°C, Se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en periodos cortos no mayor a un mes. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras (Acosta, 2019, p. 12).

1.1.3.2. Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar (Andrade, 2013, p. 18).

1.1.3.3. Desección en papel de filtro

Según Hernández et al. (2018) se utiliza un papel bastante absorbente Whatmann N° 3 que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que restringir que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células (Vélez et al. 2021, p. 3).

1.1.3.4. Desección en suelo, arena, silicagel

Se añaden las células a estos sustratos que las cubrirán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método (Acosta, 2019, p. 13).

1.1.3.5. Desección en bolitas de alginato

Éste es un proceso bastante eficaz. Las células se localizan en una matriz de alginato y la supresión del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua (Pérez et al. 2016, p. 106). Estas bolitas de alginato se pueden preservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, se podrá guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato (Paniagua et al. 2017, p. 420).

1.2. Crioprotectores

Son sustancias utilizadas para la protección de células o tejidos del daño que se produce durante los procesos de congelación y descongelación debidos principalmente a la formación de hielo (Ruiz et al. 2015, p. 50). Los crioprotectores alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones. Son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad que actúan disminuyendo el punto eutéctico de las soluciones (Apaza et al. 2020, p. 17). Estos se pueden clasificar en dos grupos en función de la permeabilidad que posean para atravesar la membrana celular; crioprotectores permeables y no permeables (Duarte et al. 2020, p. 193).

En una investigación realizada por Naranjo et al. (2018) objetivo evaluaron la conservación de las cepas de BAL por el método de congelación durante un periodo de dos meses, utilizando tanto el aceite mineral como el glicerol resultaron ser buenas sustancias crioprotectoras, demostrando así que la conservación por congelación es un método de gran utilidad que garantiza la viabilidad y disponibilidad de las cepas para diversos estudios.

1.2.1. Características de los crioprotectores

Los crioprotectores suelen ser un fluido, reduce el daño por congelación del proceso de crio preservación. Los crioprotectores deben ser biológicamente aceptables, poder penetrar en las células y tener baja toxicidad. Se han desarrollado varios crioprotectores y se utilizan para reducir la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura, según el tipo de celda, la velocidad de enfriamiento y la velocidad de calentamiento (Ribeiro et al. 2014, p. 32).

1.2.2. Agentes crioprotectores permeables

Los crioprotectores permeables son de bajo peso molecular y son capaces de penetrar en el interior de las células. Los más comunes son los glicoles como el etilenglicol (EG), el propanodiol (PROH) o el glicerol y el dimetil sulfoxido (DMSO). La capacidad de cada uno de estos

compuestos para proteger una célula de los efectos mecánicos y osmóticos de la congelación depende de varias propiedades (Ramónez et al. 2017, p. 109).

Actúan principalmente por los siguientes mecanismos: bajan el punto de congelación, interactúan con la membrana manteniendo su estructura y previenen la exposición a altas concentraciones de electrolitos ya que son capaces de unirse a éstos (Cruz et al. 2016, p. 153). Los agentes permeables deben ser altamente solubles en agua a bajas temperaturas, capaces de atravesar fácilmente las membranas biológicas e, idealmente, mínimamente tóxicos (Herrera et al. 2019, p. 2)

1.2.2.1. Glicerol

Es un líquido viscoso incoloro e inodoro del compuesto de poliol simple (alcohol de azúcar). El glicerol tiene buenas propiedades cosmotrópicas; forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Esta condición dificulta la formación de cristales de hielo por mezcla (70 % de glicerol y 30 % de agua), a menos y hasta que la temperatura sea muy baja, como $-37,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. En comparación con otros crioprotectores, el glicerol es menos tóxico en altas concentraciones. Además, glicerol no es un electrolito y, por lo tanto, puede actuar reduciendo la concentración de electrolitos en la solución descongelada residual dentro y alrededor de una celda a cualquier temperatura dada. Es ampliamente utilizado en el almacenamiento de bacterias y esperma animal (Lazo et al. 2017, p. 39)

1.2.2.2. Etilenglicol

El etilenglicol altera los enlaces de hidrógeno cuando se mezcla con agua. El etilenglicol purificado tiene un punto de congelación de aproximadamente $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero después de mezclarlo con un 40 % de agua y un 60 % de etilenglicol, el punto de congelación de la mezcla se reduciría y la mezcla se volvería incapaz de formar sustancias cristalinas. Esta condición conduce a un punto de congelación transformado a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta propiedad del etilenglicol lo convierte en el candidato más eficaz para la crioprotección. Pero se observó cierta toxicidad para el etilenglicol, como irritación gastrointestinal, edema pulmonar e inflamación pulmonar, asimismo puede ser una alternativa para los protocolos de criopreservación de microorganismos (Joo & Dupré, 2012, p. 76).

1.2.2.3. Dimetil sulfóxido (DMSO)

Básicamente, el DMSO es un compuesto organosulfurado de fórmula $(\text{CH}_3)_2$. También es un solvente aprótico polar que puede disolver compuestos polares y no polares y puede ser fácilmente

miscible con una amplia gama de solventes orgánicos y con agua. El DMSO tiene una citotoxicidad menor, lo que lo convierte en un candidato más destacado para la crioconservación. A cualquier temperatura en particular, el DMSO reduce la concentración electrolítica en los contenidos enfriados residuales dentro y alrededor de una célula biológica, durante la crioconservación. Sin embargo, el aumento de células demarcadas alteradas debido a la metilación del ADN y la alteración de las histonas es un inconveniente de la crioconservación basada en DMSO. Asimismo, el DMSO tiene propiedades típicas; se congela dentro de los 18,5°C. Esto significa que, por debajo de la temperatura ambiente, el DMSO se transforma en sólidos, y esta propiedad lo hace más adecuado para crioprotectores (Atencio et al. 2013, p. 151).

1.3. Bacterias ácido lácticas

Según Sánchez & Ochoa (2018) las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de organismos gram positivos no esporulantes (cocos o bacilos) caracterizados por un metabolismo fermentativo de azúcares, con el ácido láctico como producto principal.

Pueden ser anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, así como catalasa y oxidasa negativos se caracterizan morfológicamente por bacilos largos o cortos. sin embargo, además, los cocos, que se destacan como bacilos, en un solo plano, eventualmente forman cadenas o tetras y filamentos, erróneamente llamados ramificados (Del Campo et al. 2018, p. 3).

1.3.1. Características macroscópicas de las BAL

Las características macroscópicas abarcan la apariencia general de un microorganismo, incluida su forma, tamaño, color y olor. A menudo, puede determinar el tipo de microorganismo examinando las características morfológicas/macros cópicos generales en un cultivo de agar. se debe tener una consistencia firme pero no dura, donde debe acceder a la presión, pero no estar flexible (Lara & Álvarez, 2012, p. 402).

Según (Lara & Marcelo, 2019, p. 32) en su estudio identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas menciona que las colonias de bacterias ácido lácticas presentan características propias como es el color, tamaño, forma. El tamaño de las colonias tiene un diámetro de 0,1 a 5mm, el color es blanco y crema, con una forma circular e irregular

Sánchez (2019) manifiesta en su investigación características macroscópicas preliminares de bacterias ácido lácticas, las colonias encontradas tienen un diámetro menor a 2 mm, lisas, de superficie plana a convexa, de bordes enteros y regulares, de aspecto cremoso.

De acuerdo a lo manifestado por Ortiz (2006) al caracterizar bacterias ácido lácticas en las placas de agar MRS, forman colonias cuyo tamaño sea de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia butirosa o consistencia húmeda o lisa.

1.3.2. Viabilidad de las BAL

Santos et al (2020) realizaron en su trabajo de investigación la evaluación de la viabilidad de las Bacterias ácido lácticas sin procesos de conservación, evaluando la viabilidad de las Bacterias ácido lácticas todas las semanas durante un mes en ambos productos, dando como resultado que los alimentos mantuvieron un alto crecimiento de bacterias ácido lácticas ($> 10^6$ UFC/mL).

Gutiérrez et al (2017) menciona en su estudio de la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas, para ello se inocularon 1×10^{12} UFC/mL en 250 realizando recuento de UFC cada 5 días hasta el día 15, con ello los recuentos obtenidos después de los 15 días de almacenamiento fueron de 11×10^8 UFC/mL y 6.2×10^9 UFC/mL, con lo cual no se encontró ningún efecto desfavorable sobre la viabilidad.

Según Bemy (1991) en su investigación sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores demuestra que la formulación de miel al 10 % + leche descremada al 10 %, las bacterias ácido lácticas son protegidas con la formulación de trehalosa 10 % + leche descremada 10 %, reportaron un porcentaje de viabilidad del 21 %. Dado que los resultados con la formulación de trehalosa al 10 % fueron mejores (92,24 %), se puede suponer que la leche descremada es el agente responsable de la pérdida de viabilidad. Un efecto similar se prueba cuando se emplea leche descremada con C. necátor demostrando una disminución del 11 % en la viabilidad, relacionado con el uso de la miel como único agente lioprotector.

Castro & Hernández (2000) menciona en su investigación sobre el manual sobre conservación de microorganismos que después de preservadas y conservadas las bacterias ácido lácticas se ha evidenciado que la mejor condición de conservación fue aquella donde se utilizó Glicerol al 7%. En este estado se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 98,7% ($2,10 \times 10^{12}$) en glicerol al 7%, 89,6% ($1,9 \times 10^{12}$) en Leche Descremada al 20% y 76,4% ($1,6 \times 10^{12}$) en Papel de filtro N°4 al año de conservación.

Sosa et al (2011) realizaron la evaluación del método de conservación en papel de filtro en bacterias ácido lácticas, donde se determinó la viabilidad, presentaron una viabilidad de 10^8 UFC/mL, estos mismos autores catalogan el método de conservación utilizado en la categoría de mediano plazo, pues en este grupo se encuentran las células conservadas que permanecen viables de dos a cinco años, tanto las características morfológicas de las colonias de bacterias ácido lácticas no mostraron variaciones.

Huertas et al. (2006) compararon distintos métodos de conservación, papel de filtro y criopreservación, sobre la viabilidad en las cepas de bacterias ácido lácticas, pertenecientes al banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) concluyendo que la criopreservación era el mejor método para viabilidad, con un porcentaje de recuperación mayor al 50 % a las 24 horas de conservado. Al igual que Ortiz et al (2016) quienes evaluaron diferentes métodos de conservación siendo estos de congelación y liofilización por períodos de conservación a corto, mediano y largo plazo para la viabilidad de las BAL, estableciendo que la viabilidad de las BAL se mantuvo estable en los métodos de glicerol 30 % (p/v) y liofilización.

Bagatolli (2017) evaluaron la viabilidad de las BAL, mediante el método de conservación de transferencia periódica al cabo de 24 horas, 1, 3, 6 y 15 meses. Todas se mantuvieron estables, puras y presentaron un porcentaje de recuperación mayor al 50 % a los 6 meses y el 67 % de ellas a los 15 meses. Por lo que el método de conservación utilizado permite preservar bacterias, al menos por el periodo de tiempo evaluado.

1.3.3. Dinámica de crecimiento de las Bacterias ácido lácticas

En un estudio realizado por Ramírez & Vélez (2016) donde las curvas de crecimiento con respecto al tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) para bacterias ácido lácticas seleccionadas, en donde se observó los valores más altos ($> 0.35 \text{ h}^{-1}$) para las cepas que corresponde a bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis ssp. Lactis*) y menores tasas de crecimiento (0.24 h^{-1} y 0.35 h^{-1}) para las cepas (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*).

Según Prescott (2000) en su estudio de la capacidad de crecimiento en bacterias ácido lácticas menciona las dinámicas de crecimiento de bacterias ácido lácticas en caldo MRS y glicerol. Las colonias tuvieron un comportamiento similar y al parecer sus fases de adaptación son inferiores a 0.5 h. A partir de este tiempo hasta aproximadamente las 4.0 h se visualizó la fase exponencial, posteriormente se observó una fase de desaceleración y después de las 6 h de cultivo alcanzaron

la fase estacionaria. Las velocidades máximas de crecimiento de las cepas fueron de 0.5 h⁻¹ y los tiempos de duplicación de 1.3 h, lo que está en correspondencia con lo informado para las bacterias lácticas. (Prescott, 2000, p. 84).

Castro & Hernández (2000) mencionan en su investigación de la dinámica poblacional de bacterias ácido lácticas liofilizadas que durante el proceso de preservación con agentes lioprotectores, en todos los medios de cultivo el mayor recuento microbiano se observó a las 48 h. El mayor recuento celular se obtuvo en el medio Elliker (Streptococcus, Lactococcus, Leucocito, lactobacilos), seguido en orden descendente en los medios MRS (lactobacilos), APT(bacilos) y M17 (estreptococos lácticos). Una reducción del crecimiento se visualizó a las 120 h colonias restantes, con excepción del medio APT.

En su estudio Martínez et al (2016) sobre la dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas utilizando el método de conservación por desecación en papel de filtro, obtenido en las 24 horas una población de (6 x 10⁵ UFC mL⁻¹), posteriormente disminuyó, sin detectarse después de las 48 h. Por su parte Por su parte Burguet & Sierra (2012) demuestran que, para el mantenimiento de cepas de BAL, conservadas por el método liofilización, resulta conveniente emplear MRS como medio de crecimiento y glicerol como sustancia lioprotectora, donde estudiaron la dinámica de crecimiento. La misma que alcanzó su pico máximo en las 96 horas siendo esta 96 UFC/mL.

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (G) y este se denomina como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días (Patiño, 2018, p. 4).

Para establecer la dinámica de crecimiento se usa la fórmula del modelo de crecimiento primario de Baranyi y Roberts este es un modelo que se fundamenta en la dinámica de poblaciones microbianas, que relaciona la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de latencia (fase lag), y que permite cuantificar la cinética de crecimiento microbiano para obtener diferentes parámetros cinéticos útiles (Ramírez & Vélez, 2016, p. 119).

$$\frac{dN}{dt} = \frac{q_t}{q_{t+1}} \cdot U_{max} \cdot \left[1 - \left\{ \frac{N(t)}{N_{mas}} \right\}^m \right] N(t)$$

Donde:

- $N(t)$ = número instantáneo de microorganismos al tiempo t ,
- $M_{\text{máx}}$ = velocidad máxima de crecimiento
- $N_{\text{máx}}$ = número máximo de microorganismos que el sistema puede soportar,
- m = constante del modelo.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Localización y duración del experimento

El desarrollo de la presente investigación se realizó 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 tuvo una duración de 30 días.

2.2. Unidades Experimentales

Se utilizó un total de 60 unidades experimentales distribuidas en 3 tratamientos en cuatro tiempos, con 5 repeticiones donde el tamaño de la unidad experimental fue de 1.5 ml de solución de bacterias ácido lácticas

2.3. Materiales, equipos e instalaciones

2.3.1. *Materiales*

- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf
- Frascos de esterilización
- Pera de goma
- Gradilla
- Pipetas 1ml
- Pipetas 10ml
- Portaobjetos
- Colorante principal: cristal violeta
- Mordiente: Lugol
- Aceite de inmersión
- Colorante de contraste: safranina
- Mechero

2.3.2. Equipos

- Balanza Analítica
- Agitador Vortex
- Microscopio
- Cuenta colonias
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave

2.3.3. Insumos

- Mandil
- Cofia
- Guantes
- Mascarilla
- Alcohol
- Agua destilada

2.3.4. Reactivos

- Nitrógeno líquido
- Glicerol
- Dimetil sulfóxido
- Etilenglicol
- Caldo MRS
- Agar MRS

2.4. Tratamiento y diseño experimental

Se evaluó el efecto de la utilización de diferentes crioprotectores (glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido) en el tiempo (0, 7, 15 y 30 días), por lo que las unidades experimentales se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde

Y_{ij} = Valor estimado de la variable.

μ = Media general.

α_i = Efecto de los tratamientos

E_{ij} = Efecto del error experimental.

2.4.1. Esquema del experimento

En el Tabla 1-2 se describe el esquema del experimento:

Tabla 1-2: Esquema del experimento

Tratamiento	Código	Repetición	TUE*	Total (ml/solución)/Trat
Glicerol	T1	20	1,5	30
Etilenglicol	T2	20	1,5	30
Dimetil sulfóxido	T3	20	1,5	30
Total, ml de solución				90

*TUE = Tamaño de la unidad experimental

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

2.4.2. Análisis estadísticos y pruebas de significancia

El esquema de análisis de varianza (ADEVA), se reporta en la (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Análisis de varianza

Fuente de variación	Formula	Grados de libertad
Total	(n-1)	14
Tratamiento	(t-1)	2
Error	(n-1)-(t-1)	12

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

2.5 Mediciones Experimentales

Las mediciones experimentales que se consideran en esta investigación fueron:

2.5.1. Características macroscópicas de las bacterias ácido lácticas

- Color
- Forma
- Tamaño

2.5.2. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas

- Población de bacterias ácido lácticas de acuerdo al tiempo 0, 7, 15 y 30 días

2.5.3. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas

- Cargas microbiológicas a las 0, 48, 72 y 96 horas.

2.6. Procedimiento Experimental

2.6.1. Siembra

Para la siembra se utilizó Agar MRS el prepara 67.15 gramos del Agar MRS y se disuelve en 100 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en el autoclave a 121°C 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).

2.6.2. 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.

2.6.3. Conteo de Bacterias Acido lácticas

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).

2.6.4. Recuento en placa a las 72 horas

Para el conteo, se colocaron en las placas 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

2.6.5. Conservación de cepas aisladas

Para el almacenamiento a largo plazo, los cultivos puros de BAL se conservaron en caldo MRS que contenían glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido al 7%.

- **Procedimiento**

Se realizó el cultivo en caldo MRS de las colonias bacterianas aisladas. Se mezclaron volúmenes iguales de cultivo y de los crioprotectores glicerol, etilenglicol y dimetil sulfoxido al 7%. Luego de colocar las cepas BAL aisladas sobre el glicerol etilenglicol y dimetil sulfoxido, se agita de manera constante para lograr una mezcla uniforme. Al final se distribuye 1mL la mezcla en tubos Eppendorf, para su conservación en nitrógeno líquido durante 30 días (Mecánica et al., 2015, p. 32).

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Caracterización Macroscópica de las colonias de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas poseen las siguientes características macroscópicas: forma redonda puntiforme, un color blanco cremoso y un borde entero y un tamaño de 1,2 mm al respecto indican Lara & Álvarez (2012) indica que las características macroscópicas abarcan la apariencia general de un microorganismo, incluida su forma, tamaño, color y olor. Sánchez & Tromps (2014) mencionan que las bacterias ácido lácticas (BAL), son puntiforme, color blanco cremoso y con bordes enteros De acuerdo con las características macroscópicas de las colonias de las bacterias ácido lácticas presentan una forma redonda puntiforme, un color blanco cremoso y un aspecto entero. Esto concuerda con lo reportado por Andino & Guasgua (2021) quienes describieron a las bacterias ácido lácticas de forma circular, de color blanco cremoso.

Similar a lo que alcanzó Ortiz (2016) quién realizó la identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas obtuvo una caracterización de las bacterias ácido lácticas con un tamaño de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso forma redonda puntiformes, bordes enteros. Además, Estrada et al (2017) describe a las colonias ácido lácticas pueden ser pequeñas, entre dos y cinco mm, convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y de color blanco-lechoso. Lo cual va conforme con Cortez, & Aranguren, (2014) quienes, en su estudio, sobre aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en suelos, dan a conocer que las bacterias ácido lácticas son de color blanco; forma circular, irregular o puntiforme y superficie convexa o cóncava. Y por lo reportado por Carrasco (2019) quién realizó la identificación fenotípica y genotípica de bacterias ácido lácticas aisladas encontrando características primarias en las bacterias ácido lácticas encontrando una forma: circular o puntiforme, bordes: entero una elevación: convexa y una textura: lisa.

3.2. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 0, 7, 15, 30 días

Los resultados de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas determinadas en diferentes periodos (0, 7, 15 y 30 días) se reportan en la tabla 1-3.

Tabla 1-3: Viabilidad de las Bacterias ácido lácticas

Variable	Crioprotectores			E.E	Prob.
	Glicerol	Etilenglicol	Dimetil sulfoxido		
0 días	ausencia	ausencia	ausencia	---	---
7 días	71,20 b	34,80 a	30,00 a	5,1	0,002
15 días	140,40 b	66,00 a	38,40 a	9,81	0,001
30 días	174,20 c	84,60 b	51,20 a	32,71	0,043

E.E: Error Estándar

Prob >0,05: No existe

Prob < 0,05: Existen diferencias estadísticas

Prob <0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con una letra iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

3.2.1. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 0 días

Los resultados de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 0 días según la tabla 1-3, nos demuestra que los valores obtenidos a las 0 horas no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre medias, ya que todos los crioprotectores: glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido presentaron viabilidad de 0,00 UFC/mL, lo que es confirmado Santos et al (2020) quienes realizaron la evaluación de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en un periodo de un mes, el mismo que el 0,00 UFC/mL. Asimismo, Castro & Hernández (2000) mencionan que la viabilidad de las BAL a los 0 días se encontro en 0 cabe destacar que en esta investigación se utilizó el crioprotector Glicerol al 7%.

3.2.2. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 7 días

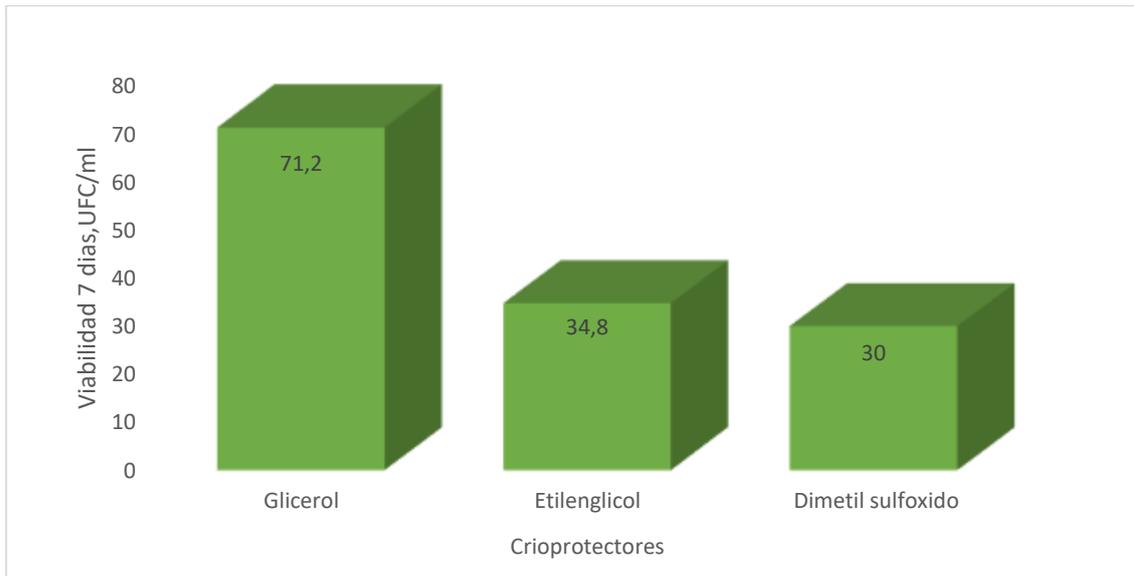


Ilustración 1-3: Viabilidad a los 7 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

En los 7 días de la viabilidad, como se muestra en la (Tabla 1-3) se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, el resultado que la viabilidad más baja es con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 30,00 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 34,00 UFC/mL y la más alta de las BAL se da en con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 71,20 UFC/mL (Ilustración 1-3), con lo cual podemos concluir que a medida que aumenta el tiempo la viabilidad de las bacterias ácido lácticas también va en aumento. Esto concuerda con lo reportado por Jalali et al. (2012) quienes realizaron la evaluación de la estabilidad de las bacterias ácido lácticas donde utilizaron tres crioprotectores (glicerol, sacarosa y etilenglicol) dando como resultados que mejoran la viabilidad de las bacterias ácido lácticas siendo el mejor crioprotector el glicerol. El glicerol ha sido uno de los materiales más aplicados y utilizados para la conservación de cultivos microbianos, ya que según Terreros et al (2015) las bacterias ácido lácticas conservadas en glicerol conservaran sus características durante períodos prolongados.

3.2.3. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 15 días

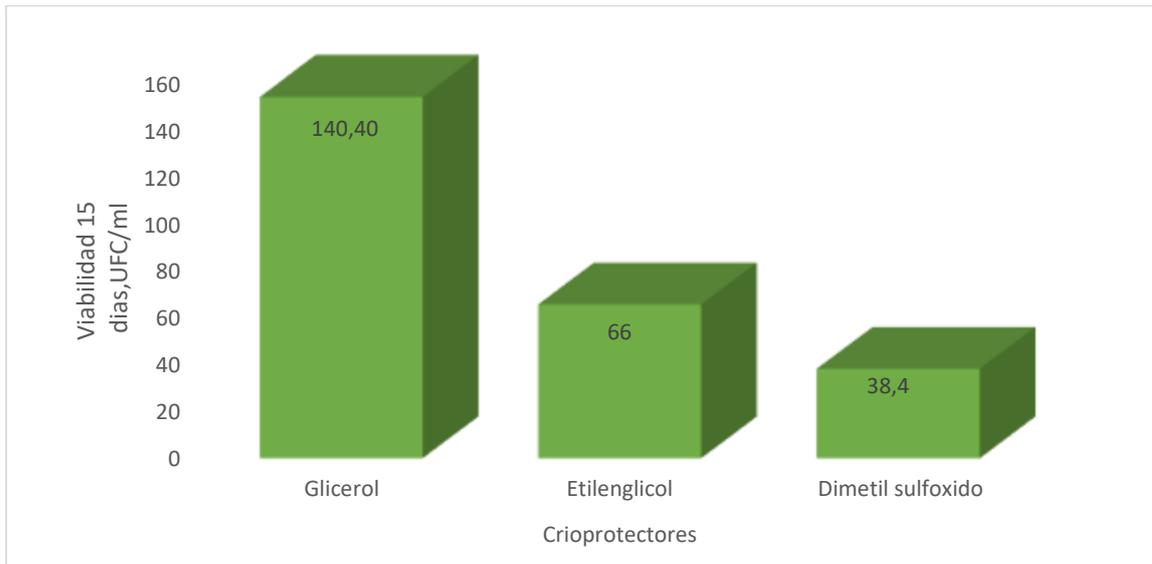


Ilustración 2-3: Viabilidad a los 15 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

En las 15 días de las viabilidad, como se muestra en la (Tabla 1-3) se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, el resultado que la viabilidad más baja es con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 38,40 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 66,00 UFC/mL y la más alta viabilidad de las bacterias ácido lácticas se da en con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 140,20 UFC/mL (Ilustración 2-3), con lo cual sigue la tendencia de que la mejor viabilidad de las bacterias ácido lácticas se da con el crioprotector glicerol. Resultados obtenidos de la presente investigación concuerdan con lo reportado por Saarela et al. (2015) quienes probó la viabilidad de las bacterias lácticas en una concentración de 6% del crio protector glicerol obtenido a los 15 días 160 UFC/mL, este mismo autor reveló un alto número y diversidad de bacterias del ácido láctico presentes en el suelo. Mismas que resultaron ser positivas para la actividad de control biológico y/o la promoción directa del crecimiento de las plantas.

3.2.4. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas a los 30 días

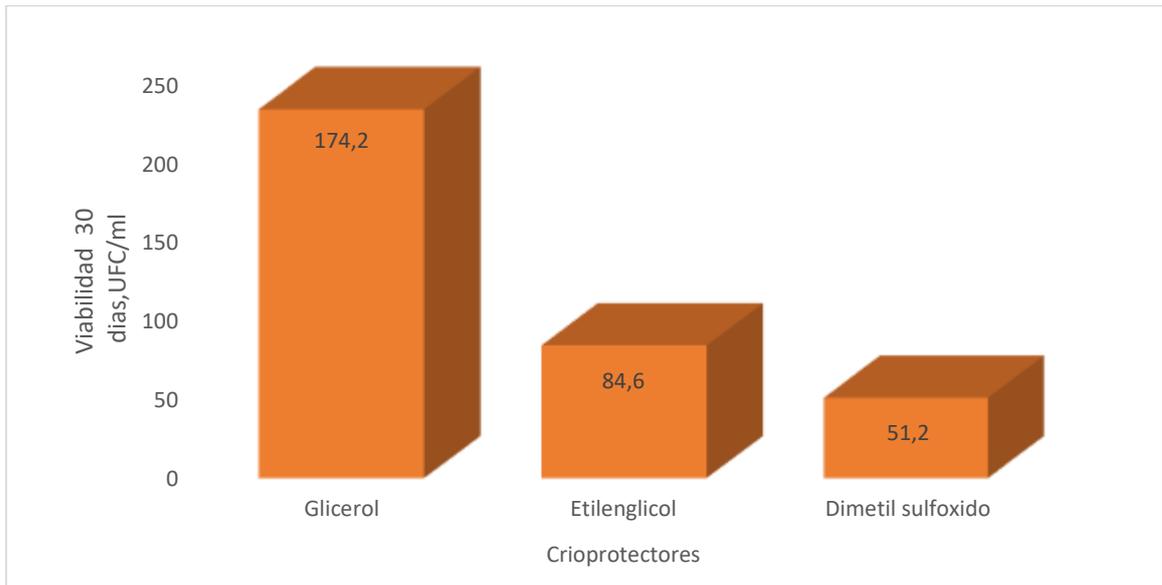


Ilustración 3-3: Viabilidad a los 30 días de las BAL por efecto de diferentes crioprotectores.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

En las 30 días de las viabilidad, se reportó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, el resultado que la viabilidad más baja es con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 51,20 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 84,60 UFC/mL y la más alta viabilidad de las BAL se da en con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 174,20 UFC/mL (Ilustración 3-3), es decir que el mejor crioprotector es el glicerol para mantener la viabilidad de las bacterias ácido lácticas. Esto es similar a lo reportado por Gutiérrez et al (2017) donde en su investigación sobre la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas, utilizó los crioprotectores glicerol (6%) y dimetil sulfóxido, realizando un recuento de UFC por 15 días, donde el mejor crioprotector es el glicerol, presentado una viabilidad de 160 UFC frente al dimetil sulfóxido que de 40 UFC.

Con respecto al etilenglicol según Joo & Dupré (2012) es considerado como agente crioprotector cuyo objetivo es proteger del daño que se pueda producir en las células microbianas mientras transcurre el tiempo de conservación y es utilizando principalmente en la aplicación del método de conservación a largo plazo. Resultados similares a los de nuestra investigación fueron registrados por Wang et al (2021) quienes utilizaron el crio protector etilenglicol para determinar la viabilidad de las Bacterias ácido lácticas durante 20 días alcanzando la cantidad de 70 UFC/mL. Al igual que Pyar & Peh (2013) donde estudiaron el efecto del agente crioprotector etilenglicol sobre la viabilidad y estabilidad de las bacterias ácido lácticas concluyendo estos autores que la

presencia de agentes crioprotectores mejoró significativamente la viabilidad. No así por lo obtenido por Bhattacharya (2018) quién utilizó crioprotector MRS más glucosa como fuente de carbono en la cual no existió viabilidad significativa de bacterias de ácido láctico.

Esto concuerda con lo reportado por Hoon et al (2017) donde compararon los crioprotectores glicerol y dimetil sulfóxido donde concluyó una menor viabilidad en el dimetil. Una de las causas para esta baja viabilidad es que las bacterias ácido lácticas no estuvieron en las mejores condiciones para su crecimiento, como bien señala Whaley et al (2021) es que las bacterias ácido lácticas crecen adecuadamente bajo condiciones microaerófilas con cantidades de oxígeno, entre un 2 y 10%; además, en pH, donde los medios son ligeramente ácidos, en un rango de 4,5 a 6,5.

En el Ilustración 5-3 se puede observar que durante el periodo de evaluación en glicerol presenta una mayor viabilidad de las bacterias ácido lácticas a diferencia del empleo de dimetil sulfoxido que es el crioprotector que presenta las menores respuestas de viabilidad.

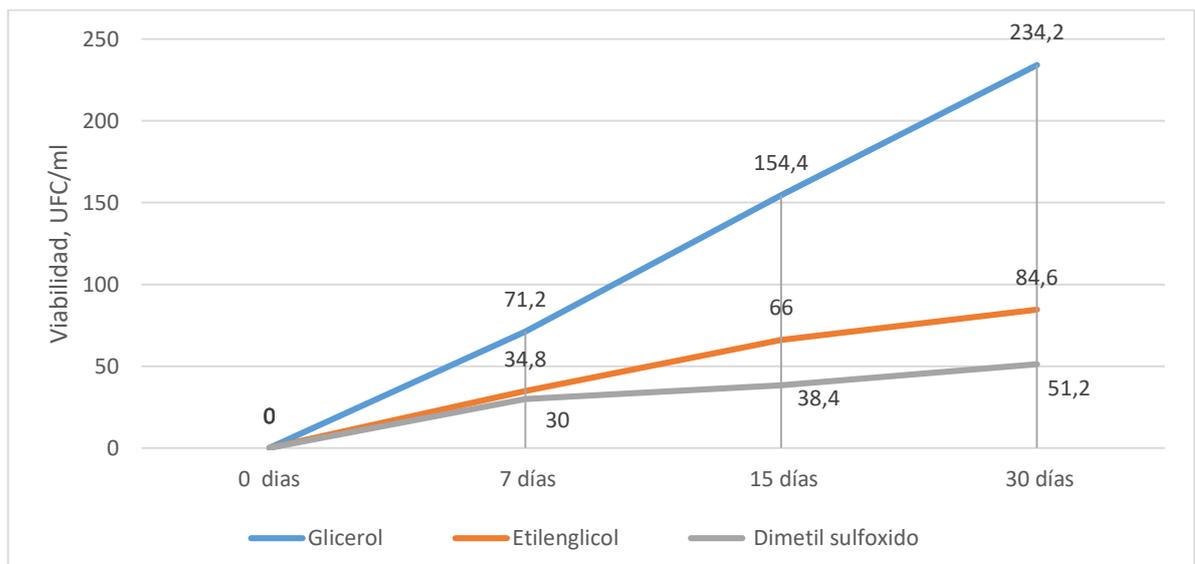


Ilustración 4-3: Comportamiento de la viabilidad de las BAL con diferentes crioprotectores de acuerdo al periodo de evaluación.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

3.3. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas

Los resultados encontrados en las dinámicas de crecimiento con diferentes crioprotectores se reportan en la tabla 2-3.

Tabla 2-3: Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

3.3.1. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 0 horas

Variable	Crioprotectores			E.E	Prob.
	Glicerol	Etilenglicol	Dimetil sulfoxido		
0 horas	0,00 a	0,00 a	0,00 a	---	--
24 horas	9,80 a	5,60 b	4,20 c	0,34	0,002
72 horas	19,00 a	8,60 b	7,20 b	1,05	0,001
96 horas	35,40 a	16,80 b	14,60 b	2,51	0,001

E.E: Error Estándar

Prob >0,05: No existe

Prob < 0,05: Existen diferencias estadísticas

Prob <0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con una letra iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey

Los resultados de la dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 0 horas según la tabla 2-3, nos demuestra que los valores obtenidos a las 0 horas no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre medias, ya que todos los crioprotectores: glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido presentaron una cinemática de crecimiento de 0,00 UFC/mL, lo que es confirmado Santos et al y por Ramírez & Vélez (2016) donde elaboraron curvas de crecimiento con respecto al tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) para bacterias ácido lácticas seleccionadas, teniendo a las 0 horas 0 UFC/mL.

3.3.2. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 24 horas

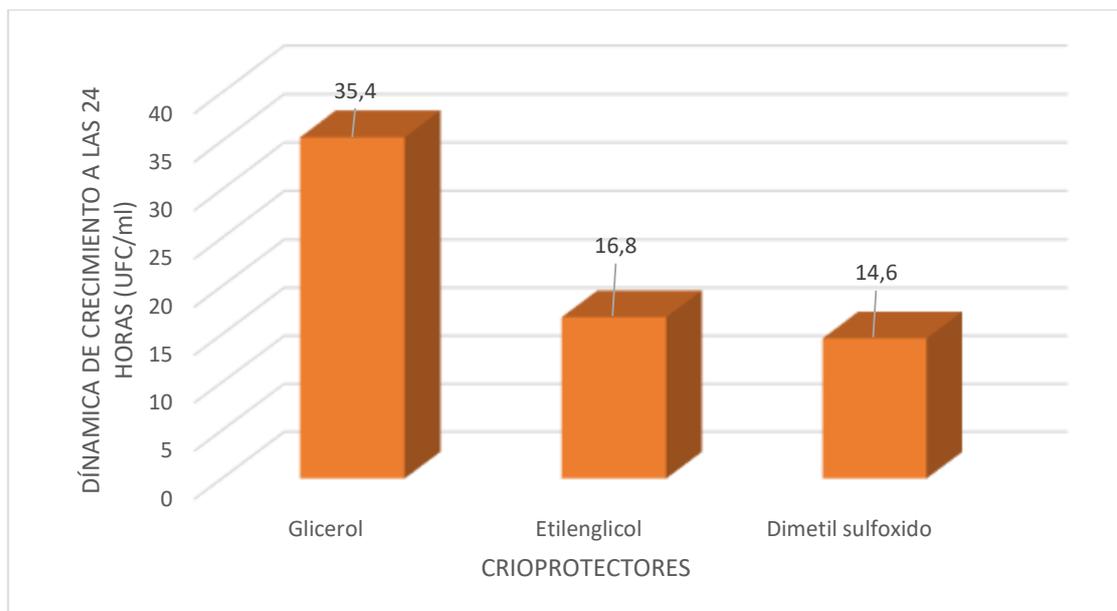


Ilustración 5-3: Dinámica de crecimiento de las BAL a las 24 horas por efecto de diferentes crioprotectores.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

En las 24 horas, la dinámica de crecimiento, según nos muestra (Tabla 2-3) se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, que el crecimiento más bajo es con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 4,2 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 5,6 UFC/mL y el crecimiento de las BAL se da con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 9,8 UFC/mL (Ilustración 5-3), con lo cual podemos concluir que a medida que aumenta el tiempo la el crecimiento de la bacterias ácido lácticas también va en aumento. Esto concuerda con lo reportado por Jalali et al. (2012) quienes realizaron la evaluación de la cinemática de crecimiento de las bacterias ácido lácticas donde utilizaron tres crioprotectores (glicerol, sacarosa y etilenglicol) en 4 tiempos (0, 24, 48 y 72 horas) siendo el glicerol el mejor crioprotector con una dinámica de crecimiento a las 24 horas con 12 UFC/mL. Al igual que Prescott (2000) quién en su estudio sobre la capacidad de crecimiento en bacterias ácido laticas menciona las dinámicas de crecimiento de bacterias ácido lácticas en caldo MRS y glicerol tuvieron un comportamiento similar.

3.3.3. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 72 horas

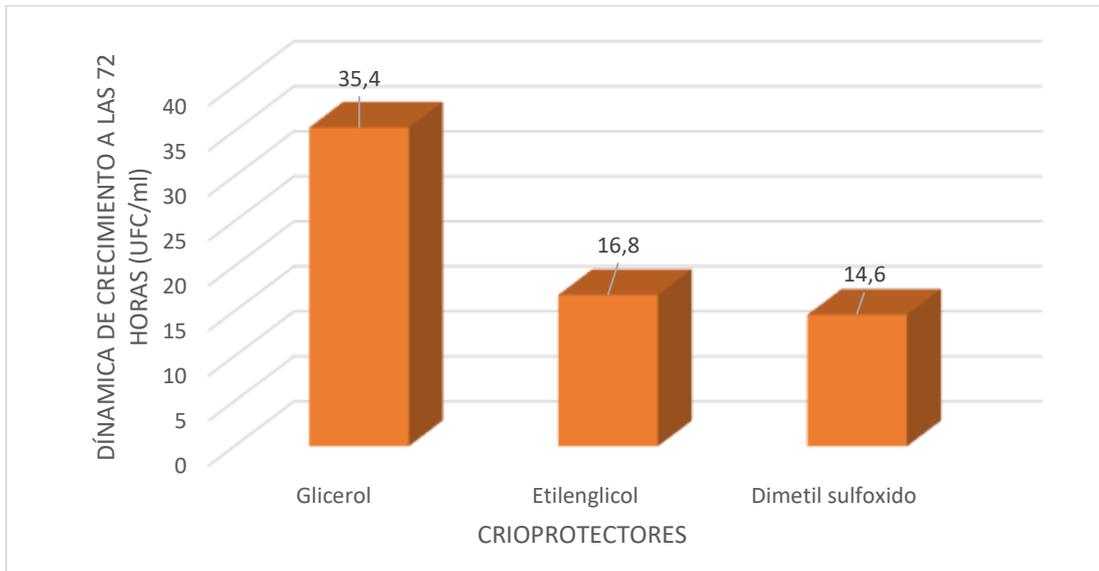


Ilustración 6-3: Dinámica de crecimiento de las BAL a las 72 horas por efecto de diferentes crioprotectores.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

A las 72 horas, la dinámica de crecimiento según nos muestra la (Tabla 2-3) se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, que el resultado que el crecimiento de las BAL más bajo se da con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 7,2 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 8,6 UFC/mL y el más alto crecimiento de las bacterias ácido lácticas se da en con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 19,00 UFC/mL (Ilustración 6-3), con lo cual sigue la tendencia sobre la dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas se da con el crioprotector glicerol. Resultados obtenidos de la presente investigación concuerdan con lo reportado por Gamboa & Lizcano (2013) quienes utilizaron glicerol (8%) para medir la cinemática de crecimiento de las BAL en 3 tiempos (0, 24 y 72 horas), obteniendo a las 72 horas 23 UFC/mL, estos mismos autores recalcan que el uso de glicerol es beneficioso para el crecimiento de las BAL ya que el glicerol contiene compuestos complejos para el crecimiento como vitaminas y aminoácidos, asimismo las bacterias del género *Lactobacillus* son de carácter estrictamente fermentativo, lo cual indica que su crecimiento está ligado directamente con la producción de metabolitos (Castro & Hernández, 2000 pág. 15)

3.3.4. Dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 96 horas

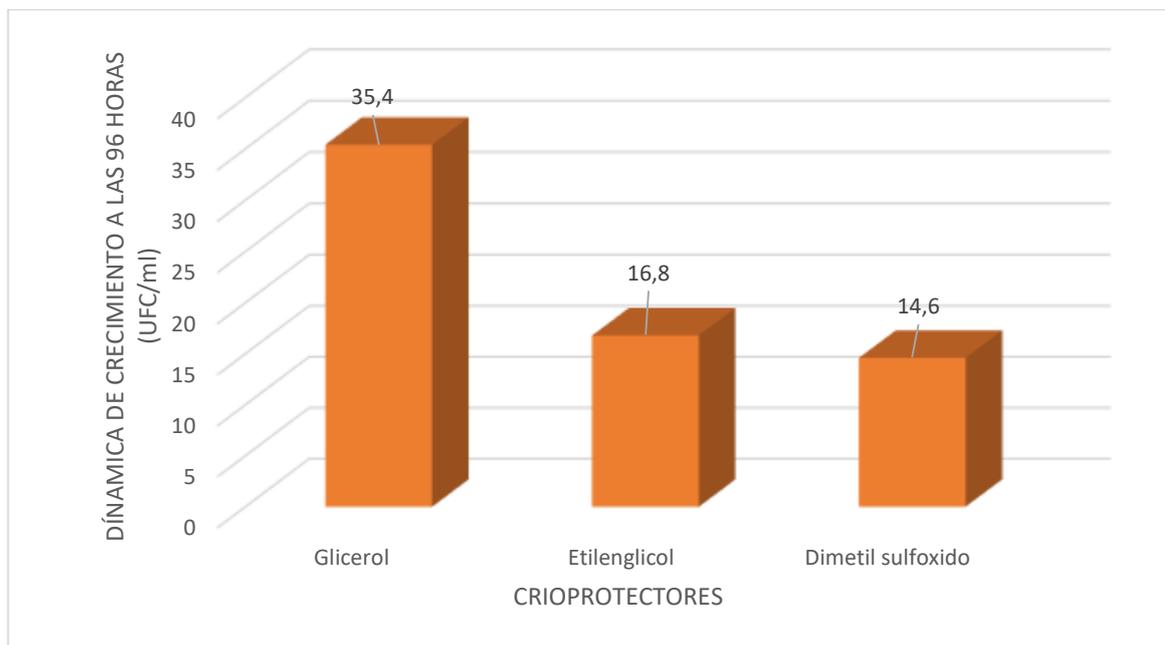


Ilustración 7-3: Dinámica de crecimiento de BAL a las 96 horas por efecto de diferentes crioprotectores.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

A las 96 horas de crecimiento de las BAL, se reportó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medias, por efecto de la acción de diferentes crioprotectores, determinándose, el resultado que el crecimiento más bajo es con la utilización del crioprotector, dimetil sulfoxido (7%), con un valor de 14,6 UFC/mL, seguido por el etilenglicol (7%), con un valor de 16,8 UFC/mL y la más alta viabilidad de las BAL se da en con el crioprotector glicerol (7%), con un valor de 35,4 UFC/mL (Ilustración 7-3), es decir que el mejor crioprotector es el glicerol para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Esto es similar a lo reportado por Dos Santos, (2007) quién realizó el estudio del comportamiento cinético de las bacterias ácido lácticas utilizando dos crioprotectores que fueron el glicerol y el etilenglicol siendo el crioprotector glicerol el que mayor crecimiento obteniendo a las 96 horas 42,00 UFC/mL. El crioprotector dimetil sulfóxido es el que menos dinámica de crecimiento presento como se mencionó, esto concuerda con lo expuesto por Martínez et al (2016) sobre la dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas utilizando el método de conservación por desecación en papel de filtro, obtenido en las 96 horas una población de BAL de 18 UFC/mL

De acuerdo con los crioprotectores estudiados en esta investigación todos presentan dinámicas de crecimiento ascendente es de decir que a medida que pasan las horas de fermentación mayores

contenido de BAL (UFC/mL) va a existir (ver Ilustración 8-3), si comparamos los tres crioprotectores el que mejor dinámica de crecimiento demuestra es el de glicerol, esto concuerda con lo reportado por González et al (2019) quienes realizaron la evaluación de crioprotectores en la conservación a largo plazo de bacterias ácido lácticas comparando glicerol y dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración del 10% por un tiempo de 72 horas concluyendo que el glicerol es el mejor crioprotector.

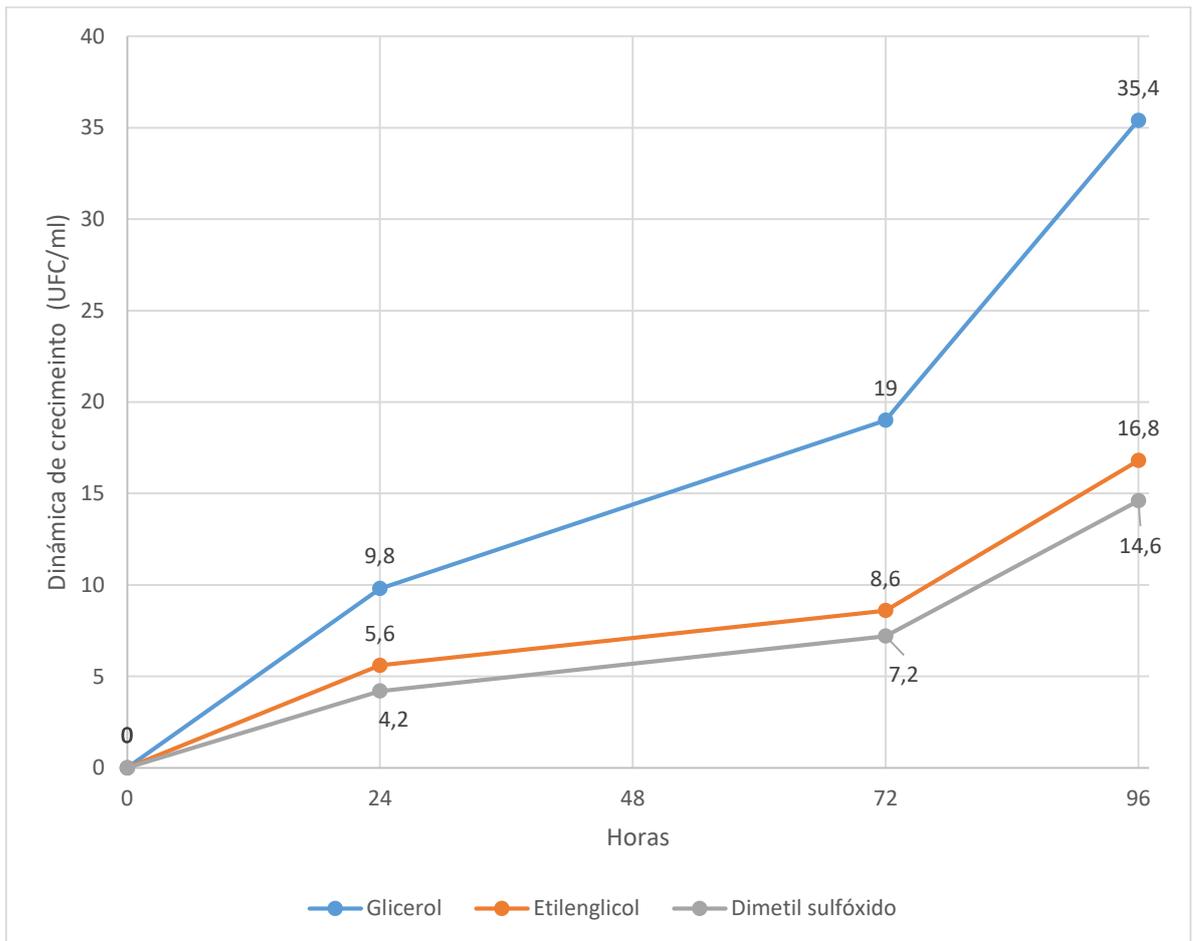


Ilustración 8-3: Comportamiento de la dinámica de crecimiento de las BAL utilizando diferentes crioprotectores en función del periodo de evaluación.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

3.4. pH de la solución de bacterias ácido lácticas

Los resultados de la evaluación realizada a la solución de bacterias ácido lácticas se reporta en la tabla 3-3.

Tabla 3-3: pH de las soluciones con crioprotectores

Variable	Crioprotectores			E.E	Prob.
	Glicerol	Etilenglicol	Dimetil sulfoxido		
0 horas	6,50 b	6,18 c	6,66 a	0,03	0,001
24 horas	6,40 b	6,04 c	6,68 a	0,04	0,001
72 horas	6,46 b	6,12 c	6,64 a	0,04	0,001
96 horas	6,50 b	6,16 c	6,68 a	0,03	0,001

E.E: Error Estándar

Prob >0,05: No existe

Prob < 0,05: Existen diferencias estadísticas

Prob <0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con una letra iguales en la misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

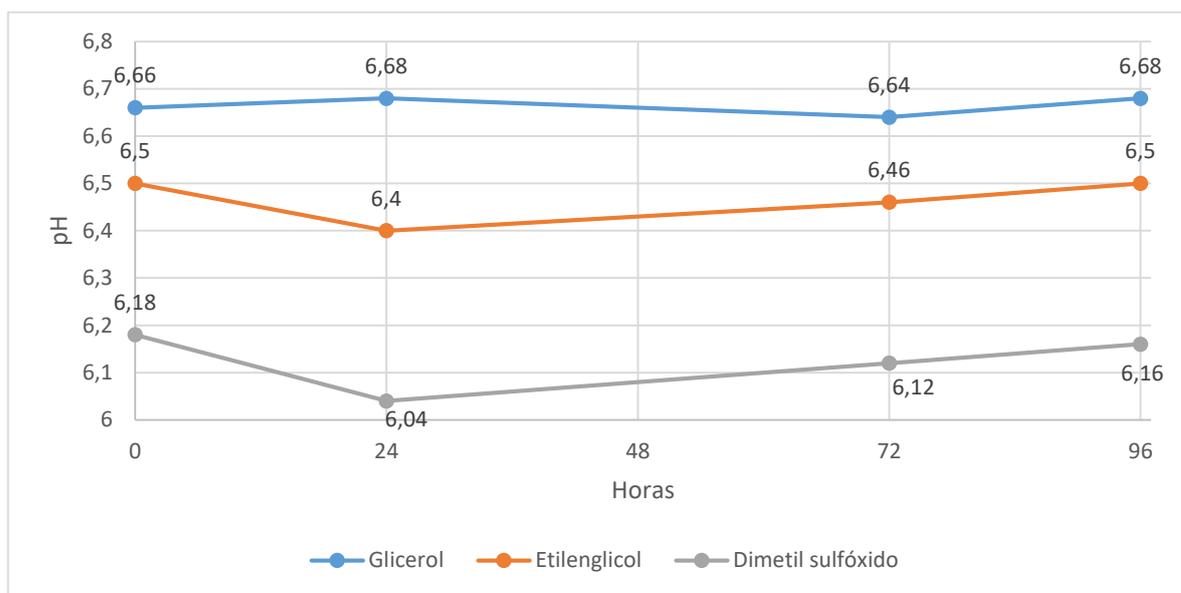


Ilustración 9-3: Comportamiento del pH de las BAL con diferentes crioprotectores por efecto del periodo de evaluación.

Realizado por: Chacha, Josselin, 2022.

De acuerdo a la Tabla 3-3, se puede observar que en los periodos de evaluación (0,24,72 y 96 horas) se registraron diferencias altamente significativas por efecto de los crioprotectores utilizados, estableciendo que al emplear el glicerol que tiene un pH inicial (0 horas) de 6,50 se mantiene casi constante hasta las 96 horas a diferencia de la utilización de dimetil sulfoxido presenta pH cercanos a la neutralidad con respuestas entre 6,66 y 6,68 (0 y 96 horas, respectivamente) sucediendo lo contrario con el etilenglicol que presenta mayores características

acidas ya que los pH encontrados fueron de 6,18 a 6,16 en los mismos periodos (ver Ilustración 9-3), lo que permite confirmar lo indicado por Bintsis (2018) quién menciona que los mayores valores de pH se corresponden con los menores valores de las poblaciones de BAL, es decir existe una fuerte relación entre el pH y el crecimiento de estos microorganismos asimismo Jurado & Jarrín (2015) expresan que la producción de ácido láctico está estrechamente relacionada con la reducción del pH. Además, cuando un medio de cultivo alcanza la alcalinidad o neutralidad, el crecimiento de las BAL tiende a disminuir; lo que coincide con los resultados de este trabajo.

CONCLUSIONES

- Las características macroscópicas de las colonias de bacterias ácido lácticas presentan una forma redonda puntiforme, un color blanco cremoso y un aspecto entero y un tamaño de 1,2 mm.
- La viabilidad de las bacterias ácido lácticas al utilizar el glicerol como crioprotector supera al empleo de etilenglicol y dimetil sulfoxido por cuanto a los 7 días presenta 71.20 UFC/ml, alcanzando a los 30 días 174.20 UFC/ml
- Mayor dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas se determinó al emplear e glicerol que presento a las 24 horas 9.8 UFC/mL, a las 72 horas 19,0 UFC/mL y a las 96 horas de 35,4 UFC/ml.
- Las soluciones de siembra de bacterias ácido lácticas tienden a permanecer constantes entre 0 y 96 horas, con la diferencia de que al emplearse dimetil sulfoxido tiende a la neutralidad con el etilenglicol convierte la solución demasiada acida al emplearse el glicerol presenta un pH intermedio entre las dos lo que permite un mayor desarrollo y crecimiento de BAL

RECOMENDACIONES

- Emplear el glicerol como crioprotector para la conservación de bacterias.
- Continuar con el estudio del desarrollo de bacterias ácido lácticas utilizando otros crioprotectores para crear una base de información técnica que permita su uso adecuado.
- Se recomienda acerca del uso de los crioprotectores en las bacterias ácido lácticas, ya que ayuda en la viabilidad y crecimiento de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA OVALLOS, Angy Karolina. “Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad de Santander UDES. Bucaramanga, Colombia. 2019. pp.10-12. [Consulta 2022-11-03]. Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/80707b74-8a23-4be7-8135-23719b132c47/content>

AGUDELO LONDOÑO, Natalia. et al. “Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos”. *Alimentos Hoy*. [En línea]. (2015). (Colombia). Volumen 23 N° 36. ISSN: 2027-291X. pp.187-188. [Consulta 2022-07-21]. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356/306>

AGUAYO MANGUI, Johana Alexandra. “Criopreservación de cinco especies de microalgas utilizadas en la industria alimenticia”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 2021. pp.21-23. [Consulta 2022-06-22]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24720/1/UCE-FCQ-CQA-%20AGUAYO%20JOHANA.pdf>

ANDINO GUALPA, Liseth Verónica & GUASGUA MIPAZ, Fausto René “Evaluación in vitro de la actividad antagonista de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados sobre *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp de granos de quinua”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2021. pp.31-32. [Consulta 2022-07-22]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/15411/1/56T01018.pdf>

ANDRADE PROAÑO, Diana Carolina. “Determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. 2018. pp.18-20. [Consulta 2022-10-16]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6641/1/BQ%2048.pdf>

APAZA CALLISAYA, Blanca. et al. “Parámetros cinéticos de espermatozoides en semen fresco y crioconservado de alpaca (*Vicugna pacos* L.)”. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. [En línea]. (2020). (Bolivia). Volumen 7 N° 1. ISSN: 2311-2581. pp.17-19. [Consulta 2022-07-11]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsaas/v7n1/v7n1_a3.pdf

ATENCIO, V. et al. “Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*”. *Archivos de medicina veterinaria*. [En línea]. (2013). (Colombia). Volumen 45 N° 2. ISSN: 0301-732X. pp. 151-153. [Consulta 2022-07-17]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsaas/v7n1/v7n1_a3.pdf

ÁVILA PORTILLO, Luz. et al. “Fundamentos de criopreservación”. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. [En línea]. (2006). (Colombia). Volumen 57 N° 4. ISSN: 2463-0225. pp.292-293. [Consulta 2022-07-01]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008

BAGATOLLI GARÓFOLI, Carolina Daniela. “Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad de Cuyo. Mendoza, Argentina. 2017. pp.56-58. [Consulta 2022-11-12]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/80528464.pdf>

BALBOA LUNA, Cristian & VERGARA GONZÁLEZ, Luis. “Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua”. *Ecosistemas*. [En línea]. (2021). (Chile). Volumen 30 N° 2. ISSN: 1697-2473. pp.1-3. [Consulta 2022-07-13]. Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/2224>

BECERRA GUTIÉRREZ, Lizzie Karen & HORNA ACEVEDO, María Valeria. “Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos”. *Scientia Agropecuaria*. [En línea]. (2016). (Perú). Volumen 7 N° 1. ISSN: 2077-9917. pp. 24-25. [Consulta 2022-07-26]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v7n1/a03v7n1.pdf>

BETANCOURT BOTERO, Sandra. “Detección de isómeros del ácido láctico: metabolitos de bacterias ácido lácticas aisladas de masas ácidas fermentadas colombianas”. *Revista argentina de microbiología*. [En línea]. (2014). (Argentina). Volumen 45 N° 3. ISSN: 0325-7541. pp.205-206. [Consulta 2022-07-28]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v45n3/v45n3a12.pdf>

BHATTACHARYA, Sankha. “Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process”. [En línea] 2018. [Consulta 2022-07-19]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/64165>

BINTSIS, Thomas. “Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics”. *AIMS Microbiology*. [En línea]. (2018). (Estados Unidos). Volumen 2 N° 1. ISSN: 2471-1888. pp.667-668. [Consulta 2022-07-01]. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x>

BUITRAGO MORALES, Sonia Marcela et al. “Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá”. *Sennova*. [En línea]. (2014). (Colombia). Volumen 1 N° 1. ISSN: 2389-9573. pp. 150-151. [Consulta 2022-07-18]. Disponible en: <https://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/89/101>

CABRALES HESSEN, Soad Samira. “Evaluación de etilenglicol y leche en polvo descremada como crioprotectores en la criopreservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Magíster). Universidad de Córdoba. Córdoba, Argentina. 2020. pp.19-21. [Consulta 2022-06-28]. Disponible en: https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3564/CABRALESHESSENSO_ADSAMIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

CABRERA, Pedro. et al. “Vitrificación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones”. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. [En línea]. (2006). (Venezuela). Volumen 47 N° 1. ISSN: 0258-6576. pp.15-16. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762006000100003

CARRILLO CASTAÑEDA, Guillermo et al. “Aislamiento de microorganismos inocuos productores de sideróforos para sistemas de fitorremediación”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. [En línea]. (2011). (México). Volumen 13 N° 3. ISSN: 1870-0462. pp. 501-502. [Consulta 2022-07-24]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/939/93920942028.pdf>

CARRILLO ESPER, Raúl. “Intoxicación por etilenglicol. Reporte de un caso y revisión de la literatura”. *Acta Médica Grupo Ángeles*. [En línea]. (2016). (México). Volumen 4 N° 4. ISSN: 1870-7203. pp.43-44. [Consulta 2022-07-15]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2006/am064e.pdf>

CASTAÑEDA, Maria. “Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano”. [En línea] 2019. [Consulta 2022-07-20]. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89651/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

CRUZ CASALLAS, Pablo. et al. “Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*)”. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. [En línea]. (2016). (Venezuela). Volumen 19 N° 2. ISSN: 0120-0690. pp.153-154. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295022982006.pdf>

DEL CAMPO, M. et al. “Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos”. *e-Gnosis*. [En línea]. (2018). (México). Volumen 6 N° 1. ISSN: 1665-5745. pp.03-05. [Consulta 2022-07-13]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf>

DOMÍNGUEZ, Luz et al. “Optimización de un protocolo para la criopreservación del espermátforo y masa espermática del langostino blanco *Litopenaeus vannamei*”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. [En línea]. (2020). (Perú). Volumen 31 N° 3. ISSN: 1609-9117. pp.2-3. [Consulta 2022-07-10]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v31n3/1609-9117-rivep-31-03-e17101.pdf>

DOS SANTOS EDUARDO, Agatángelo Joaquín. “Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de Interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 2007. pp.89-91. [Consulta 2022-11-12]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf>

DUARTE RUJILLO, Astrid et al. “Efecto crioprotector de la yema de huevo en semen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae)”. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. [En línea]. (2020). (Colombia). Volumen 19 N° 1. ISSN: 1909-995. pp.193-195. [Consulta 2022-07-16]. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biologia/article/view/1526/1455>

ENRÍQUEZ BRITO, Jorge Luis & VIERA BRIONES, Jorge Luis. “Caracterización preliminar de aislamiento de Microorganismos, mediante la técnica de E.M., a nivel de comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente diferentes”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 2010. pp.57-59. [Consulta 2022-08-13]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/31467/D-65922.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

ESTRADA CUTIÑO, Osmaida et al. “Caracterización e identificación de BAL procedentes de gallos pluma de león y perdices”. *Revista Electrónica de Veterinaria*. [En línea]. (2017). (España). Volumen 18 N° 2. ISSN: 1695-7504. pp.6-8. [Consulta 2022-07-06]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63651262011.pdf>

ESQUIVEL, Ana Abdelnour. “Crioconservación de especies leñosas”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2015. pp.16-18. [Consulta 2022-07-05]. Disponible en: https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/6432/VIE_Crio_de_Lenosas_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y

GAMBOA RUEDA, Jimy Alexander & LIZCANO GONZÁLEZ, Víctor Alexis. “Estudio de la fermentación del glicerol crudo para la obtención de ácido láctico empleando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: Propuesta preliminar de un modelo cinético”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 2013. pp.28-30. [Consulta 2022-11-13]. Disponible en: <http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2013/148565.pdf>

GÁRCIA LÓPEZ, Edgar. “Implementación de un método de conservación”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Autónoma de México. Zaragoza, México. 2013. pp.09-11. [Consulta 2022-08-13]. Disponible en: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_garcia_lopez.pdf

GARCÍA ROJAS, Tatiana & ESQUIVEL, Ana Abdelnour. “Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación”. *Agronomía Costarricense*. [En línea]. (2013). (Costa Rica). Volumen 37 N° 1. ISSN: :0377-9424. pp.114-115. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: https://www.mag.go.cr/rev_agr/v37n01_113.pdf

GARCÍA, Yaneisy et al. “Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos”. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. [En línea]. (2018). (Cuba). Volumen 42 N° 2. ISSN: 0034-7485. pp.196-197. [Consulta 2022-07-15]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494014.pdf>

GATO CÁRDENAS, Yohana. “Métodos de conservación y formulación de trichoderma harzianum rifai”. *Fitosanidad*. [En línea]. (2010). (Cuba). Volumen 14 N° 3. ISSN: 1562-3009. pp.190-192. [Consulta 2022-10-28]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209115199008.pdf>

GEORGE, Fanny et al. “Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective”. *Frontiers in Microbiology*. [En línea]. (2018). (Estados Unidos). Volumen 9 N° 1. ISSN: 1664-302X. pp.2-3. [Consulta 2022-07-08]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6277688/pdf/fmicb-09-02899.pdf>

GONZÁLEZ, Araceli et al “Evaluación de crioprotectores y temperaturas de recuperación en la conservación a largo plazo de Bacterias Ácido Lácticas.”. [En línea] 2019. [Consulta 2022-07-21]. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_VI/CARTELES/CVI-26.pdf

GUAMÁN, Linda. et al. “Caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador”. *Avances en Ciencias e Ingenierías*. [En línea]. (2014). (Ecuador). Volumen 6 N° 1. ISSN: 2528-7788. pp.20-22. [Consulta 2022-07-21]. Disponible en: <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/155/157>

GUEVARA MIÑACA, Esteban Santiago. “Evaluación de la criopreservación de semen fresco para la conservación de germoplasma de tapir amazónico (Tapirus terrestris)”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. 2018. pp.13-15. [Consulta 2022-07-13]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27295/1/Tesis%20126%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20564.pdf>

HEREDIA CASTRO, Priscila et al. “Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos”. *Interciencia*. [En línea]. (2017). (México). Volumen 42 N° 6. ISSN: 0378-1844. pp.342-343. [Consulta 2022-07-18]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/339/33951621002/html/>

HERNÁNDEZ PICHARDO, José. et al. “Ventajas de la vitrificación con relación a la congelación en eyaculados de ovino”. *Revista de Salud Animal*. [En línea]. (2018). (Cuba). Volumen 40 N° 1. ISSN: 2224-4700. pp.2-3. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v40n1/ras01118.pdf>

HERRERA GARCÍA, Natalia et al. “Influencia de agentes crioprotectores sobre las cinéticas de congelación de lechuga (*Lactuca sativa* L.)”. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. [En línea]. (2019). (Colombia). Volumen 22 N° 2. ISSN: 2619-2551. pp.2-3. [Consulta 2022-07-07]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v22n2/0123-4226-rudca-22-02-e1305.pdf>

HOON JANG, Tae et al. “Cryopreservation and its clinical applications”. [En línea] 2017. [Consulta 2022-07-19]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>

HUERTAS, Carolina & GUEVARA CAMPO, Nathalia. “Identificación de bacterias del suelo resistentes al arsénico como candidatas en procesos de biorremediación”. *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo*. [En línea]. (2016). (Colombia). Volumen 46 N° 1. ISSN: 2665-6558. pp.68-70. [Consulta 2022-10-11]. Disponible en: http://www.unicauca.edu.co/revistas/index.php/suelos_ecuadoriales/article/view/64/53

JOO, Roberto & DUPRÉ, Enrique. “Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia)”. *Investigaciones marinas*. [En línea]. (2012). (Chile). Volumen 30 N° 2. ISSN: 0717-7178. pp.76-77. [Consulta 2022-07-05]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/imar/v30n2/art08.pdf>

JURADO GÁMEZ, Henry & JARRÍN JARRÍN, Verónica. “Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas”. *Biosalud*. [En línea]. (2015). (Colombia). Volumen 14 N° 2. ISSN: 1657-9550. pp.50-52. [Consulta 2022-07-23]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v14n2/v14n2a05.pdf>

LARA MANTILLA, M. & ÁLVAREZ, Chalela. “Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales”. *Archivos de Zootecnia*. [En línea]. (2012). (España). Volumen 51 N° 1. ISSN: 0004-0592. pp.402-403. [Consulta 2022-07-13]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/495/49519516.pdf>

LAZO JAVALERA, María et al. “Efecto de los crioprotectores en la morfología y pérdida iónica en yemas axilares de vid cv. ‘Flame Seedless’ crioconservadas”. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. [En línea]. (2017). (México). Volumen 20 N° 72. ISSN: 2521-9758. pp.39-41. [Consulta 2022-07-09]. Disponible en: <https://revistas.uaa.mx/index.php/investycien/article/view/220/204>

LUNA FELJOO, María Andrea. “Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores”. [En línea] 2016. [Consulta 2022-07-20]. Disponible en: <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/84/115>

MESA MARIÑO, Yarindra et al. “Estudio del comportamiento de Bacterias Acido lácticas (BAL) del cultivo Bioyogur a diferentes dosis de tratamiento magnético”. *Tecnología Química*. [En línea]. (2016). (Cuba). Volumen 36 N° 3. ISSN: 2224-6185. pp.15-17. [Consulta 2022-07-23]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852016000300010

MÍNGUEZ, Yolanda & GARCÍA VELASCO, Juan. “Estado actual de la criopreservación”. *Vaccimonitor*. [En línea]. (2012). (España). Volumen 19 N° 2. ISSN: 1132-0249. pp.99-100. [Consulta 2022-07-04]. Disponible en: http://www.revistafertilidad.org/rif/vplus/arts/estado_criopreservacion.pdf

MORENO LÓPEZ, Joana Alexandra & VELARDE ESCOBAR, Kristina Estefanía. “Aislamiento, caracterización y usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtropical durante el periodo 2016”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2016. pp.19-20. [Consulta 2022-07-22]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6276/1/236T0245.pdf>

ORTÍZ BALDERAS, Marineth “Identificación bioquímica de bacterias acido lácticas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Autónoma del Estado de México. Hidalgo, México. 2016. pp.40-42. [Consulta 2022-07-22]. Disponible en: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/381/Identificacion%20bioquimica.pdf?sequence=1>

OSORIO SÁENZ, Antelmo et al. “Crioconservación de ápices de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) por encapsulación-deshidratación y por vitrificación”. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. [En línea]. (2011). (Colombia). Volumen 17 N° 2. ISSN: 1027-152X. pp.35-37. [Consulta 2022-07-02]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000500004

ORTÍZ, Tatiana et al. “Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo”. *Revista Colombiana de Biotecnología*. [En línea]. (2016). (Colombia).

Volumen 18 N° 2. ISSN: 0123-3475. pp.33-35. [Consulta 2022-11-09]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a05.pdf>

OTERO JIMÉNEZ, Vanessa. “Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011. pp.69-71. [Consulta 2022-09-21]. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8653/Tesis_186300_-_voteroj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PANIAGUA CHÁVEZ, Carmen et al. “Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México”. *Hidrobiológica*. [En línea]. (2017). (México). Volumen 21 N° 3. ISSN: 0188-8897. pp.420-422. [Consulta 2022-07-06]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v21n3/v21n3a14.pdf>

PARRA HUERTAS, Ricardo Adolfo. “Review. bacterias ácido lacticas: papel funcional en los alimentos”. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*. [En línea]. (2010). (Colombia). Volumen 8 N° 1. ISSN: 1909-9959. pp.94-95. [Consulta 2022-07-23]. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biologia/article/view/724/352>

PATIÑO CASTILLO, Blanca Dolores. “Determinación de la biodiversidad microbiana de los bosques nativos llucud y palictahua de la provincia de Chimborazo”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2018. pp.30-32. [Consulta 2022-10-23]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/8766/1/33T0188.pdf>

PÉREZ CASTILLO Anisleidy et al. “Criopreservación y almacenamiento de Mycoplasma spp.”. *Revista Salud Animal*. [En línea]. (2016). (Cuba). Volumen 32 N° 2. ISSN: 2224-4700. pp.106-107. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v38n2/rsa06216.pdf>

PÉREZ REYTOR, Diliana Celeste & SOSA ESPINOSA, Ángela Estela. “Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología”. *Vaccimonitor*. [En línea]. (2010). (Cuba). Volumen 19 N° 2. ISSN: 1025-0298. pp.11-12. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2010000200003

PLANAS RIBO, J. & CORONEL GAGLIARDI, R. “Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción.”. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. [En línea]. (2011). (España). Volumen 34 N° 4. ISSN: 1989-2055. pp.320-221. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v37n4/original2.pdf>

PYAR, Hassan & PEH, Kok Khiang. “Cost Effectiveness of Cryoprotective Agents and Modified De-man Rogosa Sharpe Medium on Growth of *Lactobacillus acidophilus*”. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. [En línea]. (2014). (Estados Unidos). Volumen 17 N° 1. ISSN: 1028-8880. pp.465-467. [Consulta 2022-07-03]. Disponible en <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2014/462-471.pdf>

RAMÍREZ LÓPEZ, Carolina & VÉLEZ RUIZ, Jorge. “Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra”. *Información Tecnológica*. [En línea]. (2016). (México). Volumen 27 N° 6. ISSN: 0718-0764. pp. 116-117. [Consulta 2022-07-18]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v27n6/art12.pdf>

RAMÓNEZ, J. et al. “Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación”. *MASKANA*. [En línea]. (2017). (Ecuador). Volumen 8 N° 1. ISSN: 2477-8893. pp.109-110. [Consulta 2022-07-16]. Disponible en: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1501/1186>

RAMÍREZ MERLANO, J. et al. “Criopreservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación”. *Archivos de medicina veterinaria*. [En línea]. (2011). (Colombia). Volumen 43 N° 2. ISSN: 0301-732X. pp.136-137. [Consulta 2022-07-06]. Disponible en https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2011000200006

RAMÍREZ MUNÓZ, Felipe Andrés. “Aislamiento de bacterias *Lactobacillus* s.p y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica in vitro”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 2010. pp.36-38. [Consulta 2022-07-23]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8624/tesis584.pdf;sequence=1#:~:text=La%20descripci%C3%B3n%20general%20ubica%20a,su%20reacci%C3%B3n%20a%20cata%20y>

RIBEIRO PERES, A. et al. “Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado”. *Archivos de medicina veterinaria*. [En línea]. (2014). (Colombia). Volumen 46 N° 1. ISSN: 0301-732X. pp.32-33. [Consulta 2022-07-08]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v46n1/art05.pdf>

ROLDÁN, María Liliana. et al. “Efecto inhibitor de Lactobacillus casei 206/1 contra Escherichia coli O157:H7”. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. [En línea]. (2011). (Venezuela). Volumen 31 N° 1. ISSN: 1315-2556. pp.25-26. [Consulta 2022-07-18]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008

RUIZ, Luis et al. “Evaluación de la Calidad Espermática del Semen Ovino Posdescongelación al Emplear Dos Fuentes Energéticas y Dos Crioprotectores”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. [En línea]. (2015). (Perú). Volumen 26 N° 1. ISSN: 2619-2551. pp.50-52. [Consulta 2022-07-09]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000100007

SAARELA, M. et al. “Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of Bifidobacterium animalisssp.lactiscells produced without milk-based ingredients”. *Journal of Applied Microbiology*. [En línea]. (2015). (Estados Unidos). Volumen 2 N° 1. ISSN: 1365-2672. pp.1331-1333. [Consulta 2022-07-01]. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x>

SÁNCHEZ, Héctor & OCHOA, Gloria. “Acción antibiótica de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas del tracto digestivo del lechón (Sus scrofa domesticus)”. *Manglar*. [En línea]. (2018). (Peú). Volumen 15 N° 1. ISSN: 2414-1046. pp.68-70. [Consulta 2022-07-21]. Disponible en: <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/88/122>

SÁNCHEZ, Lilian & TROMPS, Jeannette. “Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico”. *Revista de Salud Animal*. [En línea]. (2014). (Cuba). Volumen 36 N° 2. ISSN: 0253-570X. pp.125-126. [Consulta 2022-07-20]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v36n2/ras08214.pdf>

SOSA LÓPEZ, Acenet et al. “Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de Bacillus subtilis Cohn mediante la actividad antagónica frente a Rhizoctonia solani

Kühn”. *Fitosanidad*. [En línea]. (2011). (Cuba). Volumen 15 N° 1. ISSN: 1818-1686. pp.46-48. [Consulta 2022-11-12]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v15n1/fit07111.pdf>

SUÁREZ CONTRERAS, Liliana Yanet & RANGEL RIAÑO, Alba Luz. “Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*”. *Acta Agronómica*. [En línea]. (2020). (Colombia). Volumen 62 N° 4. ISSN: 0120-2812. pp.371-372. [Consulta 2022-07-15]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v62n4/v62n4a11.pdf>

TABAREZ ROJAS, Abigail. “Optimización del protocolo de criopreservación de semen caprino de raza autóctona de extinción blanca de rasquera”. [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 2014. pp.35-37. [Consulta 2022-06-23]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/285040/atr1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

TANYA MOROCHO, Mariuxi & LEIVA MORA, Michel. “Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas”. *Centro Agrícola*. [En línea]. (2019). (Ecuador). Volumen 46 N° 2. ISSN: 0253-5785. pp.420-422. [Consulta 2022-07-15]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v46n2/0253-5785-cag-46-02-93.pdf>

TERREROS, Marino et al. “Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. [En línea]. (2010). (Perú). Volumen 26 N° 3. ISSN: 1609-9117. pp.420-422. [Consulta 2022-07-13]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n3/a08v26n3.pdf>

TODAR, Kenneth. “Lactic Acid Bacteria”. [En línea] 2020. [Consulta 2022-07-17]. Disponible en: <https://textbookofbacteriology.net/lactics>

TORRES, Gabriel et al. “Vitrificación de tejido ovárico porcino: efecto de diferentes agentes crioprotectores en la preservación de la morfología de folículos preantrales”. *Invet*. [En línea]. (2012). (Argentina). Volumen 14 N° 1. ISSN: 1668-3498. pp. 90-91. [Consulta 2022-07-15]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982012000100010

TORRES, María Guanque & GÓMEZ, Sandra Liliana. “Ácido láctico: una revisión sobre los métodos de Determinación y purificación”. *Biociencias*. [En línea]. (2019). (Colombia). Volumen 14 N° 2. ISSN: 2390-0512. pp. 112-113. [Consulta 2022-07-23]. Disponible en: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/6027/5550>

VÁSQUEZ, Martha et al. “Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia in vivo e in vitro”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. [En línea]. (2011). (Perú). Volumen 22 N° 3. ISSN: 1609-9117. pp.192-193. [Consulta 2022-07-06]. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300003

VÉLEZ PÁEZ, Jorge. et al. “Lactato: fisiología, bioquímica y metabolismo de la producción energética celular”. *Revista INSPILIP*. [En línea]. (2021). (Ecuador). Volumen 5 N° 1. ISSN: 2588-0551. pp.02-04. [Consulta 2022-07-16]. Disponible en: <http://www.investigacionsalud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/06/PDF-Lactato-Fisiologia.pdf>

VERGARA SOTO, S. et al. “Evaluación de un dilutor elaborado con jugo de Opuntia sp., en la crioconservación de semen de bovino”. *Agro Productividad*. [En línea]. (2016). (México). Volumen 10 N° 2. ISSN: 2594-0252. pp.83-84. [Consulta 2022-07-06]. Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/959/818>

WANG, Yaqui. “Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry”. [En línea] 2021. [Consulta 2022-07-18]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.612285/full>

WONG VILLAREAL, Arnoldo et al. “Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México”. *Ciencia UAT*. [En línea]. (2021). (México). Volumen 15 N° 4. ISSN: 2007-7521. pp.145-146. [Consulta 2022-07-16]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v15n2/2007-7858-cuat-15-02-144.pdf>



ANEXOS

ANEXO A: DATOS REGISTRADOS SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL EN DÍAS.

DIAS					
SOLUCION	REPETICION	0	7	15	30
MRS +7%GLICEROL	1	0	52	105	156
	2	0	60	62	143
	3	0	73	167	180
	4	0	80	176	191
	5	0	91	192	201
MRS+7% ETILENGLICOL	1	0	30	62	76
	2	0	43	81	95
	3	0	32	64	83
	4	0	38	72	98
	5	0	31	51	71
MRS+7%DIMETIL SULFOXIDO	1	0	23	30	46
	2	0	35	35	42
	3	0	17	30	50
	4	0	45	52	61
	5	0	30	45	57

ANEXO B: DATOS REGISTRADOS SOBRE LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO EN LAS BAL EN DÍAS.

HORAS					
	REPETICION	0	24	72	96
MRS + 7% GLICEROL	1	0	10	19	26
	2	0	9	16	30
	3	0	9	17	35
	4	0	10	20	40
	5	0	11	23	46
MRS+7% ETILENGLICOL	1	0	6	8	15
	2	0	6	11	21
	3	0	6	9	15
	4	0	5	7	17
	5	0	5	8	16
MRS+7%DIMETIL SULFOXIDO	1	0	3	6	11
	2	0	5	8	16
	3	0	4	4	9
	4	0	5	11	22
	5	0	4	7	15

ANEXO C: ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 7 DÍAS.

Variable N R² R² Aj CV
Viabilidad 15 0,77 0,73 25,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	5075,73	2	2537,87	19,55	0,0002
Crioprotector	5075,73	2	2537,87	19,55	0,0002
Error	1557,60	12	129,80		
<u>Total</u>	<u>6633,33</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=19,22343

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	30,00	5	10 A
Etilenglicol	34,80	5	10 A
<u>Glicerol</u>	<u>71,20</u>	<u>5</u>	<u>10 B</u>

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

ANEXO D: ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 15 DÍAS.

Variable N R² R² Aj CV
Viabilidad 15 0,68 0,63 40,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	27835,20	2	13917,60	12,92	0,0010
Crioprotector	27835,20	2	13917,60	12,92	0,0010
Error	12924,40	12	1077,03		
<u>Total</u>	<u>40759,60</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=55,37429

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	38,40	5	14,68 A
Etilenglicol	66,00	5	14,68 A
<u>Glicerol</u>	<u>140,40</u>	<u>5</u>	<u>14,68 B</u>

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

ANEXO E: ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS BAL A LOS 30 DÍAS.

Variable N R² R² Aj CV
Viabilidad 15 0,93 0,92 15,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	40454,53	2	20227,27	77,53	<0,0001
Crioprotector	40454,53	2	20227,27	77,53	<0,0001
Error	3130,80	12	260,90		
<u>Total</u>	<u>43585,33</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=27,25403

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	51,20	5	7,22 A
Etilenglicol	84,60	5	7,22 B
<u>Glicerol</u>	<u>174,20</u>	<u>5</u>	<u>7,22 C</u>

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

ANEXO F: ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL A LAS 24 HORAS

Variable N R² R² Aj CV
Dinámica de crecimiento 15 0,93 0,91 11,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	84,93	2	42,47	74,94	<0,0001
Crioprotector	84,93	2	42,47	74,94	<0,0001
Error	6,80	12	0,57		
<u>Total</u>	<u>91,73</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,27016

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	4,20	5	0,34 A
Etilenglicol	5,60	5	0,34 B
<u>Glicerol</u>	<u>9,80</u>	<u>5</u>	<u>0,34 C</u>

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

**ANEXO G: ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL
A LAS 72 HORAS**

Variable N R² R² Aj CV
Dinámica de crecimiento 15 0,86 0,84 20,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	415,60	2	207,80	37,78	<0,0001
Crioprotector	415,60	2	207,80	37,78	<0,0001
Error	66,00	12	5,50		
<u>Total</u>	<u>481,60</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,95708

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	7,20	5	1,05 A
Etilenglicol	8,60	5	1,05 A
<u>Glicerol</u>	<u>19,00</u>	<u>5</u>	<u>1,05 B</u>

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

**ANEXO H: ANÁLISIS DE VARIANZA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LAS BAL
A LAS 96 HORAS**

Variable N R² R² Aj CV
Dinámica de crecimiento 15 0,78 0,74 25,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1305,73	2	652,87	20,77	0,0001
Crioprotector	1305,73	2	652,87	20,77	0,0001
Error	377,20	12	31,43		
<u>Total</u>	<u>1682,93</u>	<u>14</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,45995

<u>Crioprotector</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Metilsulfóxido	14,60	5	2,51 A
Etilenglicol	16,80	5	2,51 A
<u>Glicerol</u>	<u>35,40</u>	<u>5</u>	<u>2,51 B</u>

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

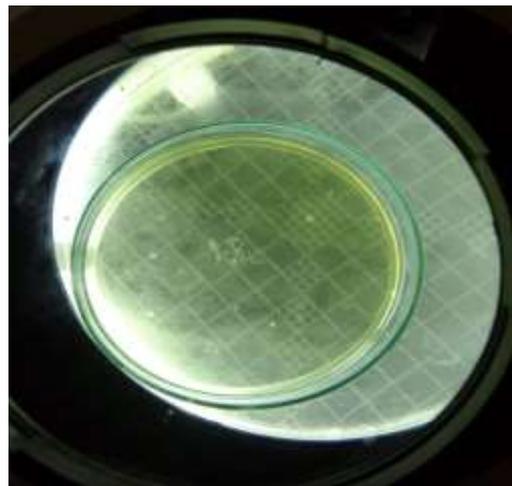
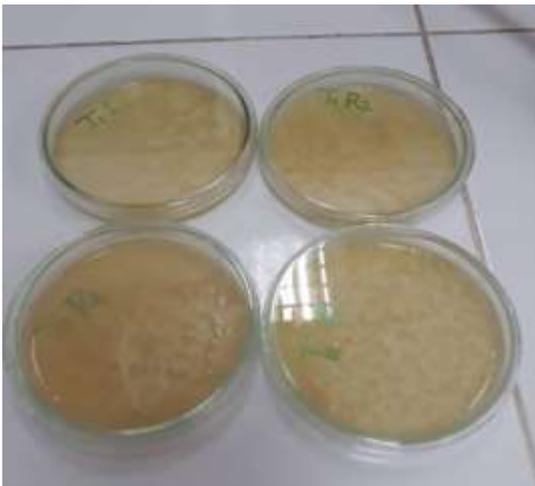
ANEXO I: SIEMBRA DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS



ANEXO J: AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS



ANEXO K: RECUENTO DE LAS PLACAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS



ANEXO L: CONSERVACIÓN DE LAS PLACAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS





epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 23 / 01 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Josselin Katerine Chacha Guamán.
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias Pecuarias
Carrera: Ingeniería en Industrias Pecuarias
Título a optar: Ingeniera en Industrias Pecuarias
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



0124-DBRA-UTP-2023