



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

**“IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA
BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL SUELO DE
BOSQUES PRIMARIOS DE LA PARROQUIA BAÑOS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTORA: DIANA VERONICA AÑILEMA BUÑAY

DIRECTORA: BQF. MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ CABRERA

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Diana Verónica Añilema Buñay

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

Yo, Diana Veronica Añilema Buñay, 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, 17 de agosto de 2023



Diana Veronica Añilema Buñay

060546190-4

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 “**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL SUELO DE BOSQUES PRIMARIOS DE LA PARROQUIA BAÑOS**”, realizado por la señorita: **DIANA VERONICA AÑILEMA BUÑAY**, 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

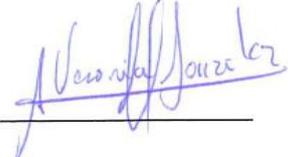
FECHA

Ing. Cesar Iván Flores Mancheno. PhD
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



2023-08-17

BQF. María Verónica González Cabrera
**DIRECTORA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**



2023-08-17

Ing. Iván Patricio Salgado Tello
**ASESOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**



2023-08-17

DEDICATORIA

La presente investigación se la dedico a Dios por guiarme en todo el trayecto de mis estudios y a mis padres por haberme forjado en la persona que soy en la actualidad, dándome fuerzas, valores y sabiduría para salir adelante; a mis hermanos que siempre estuvieron en las buenas y las malas dándome su apoyo incondicional; muchos de mis logros se los debo a mi familia entre los que se incluye este.

Diana

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la oportunidad de estar en este mundo y por la familia que me dio; en especial a mis padres Hilda y Ángel que siempre están apoyándome de manera incondicional dirigiendo siempre mi camino. A mis hermanos Luis y Jorge que me apoyaban de una u otra manera. También un agradecimiento muy especial a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la oportunidad de obtener un título profesional, a su vez a la Bqf. Verónica González e Ing. Iván Salgado que fueron un apoyo fundamental en la elaboración de la investigación.

Diana

ÍNDICE DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1 Bacterias ácido lácticas.....	3
1.1.1 <i>Generalidades</i>	3
1.1.2 <i>Características de las bacterias ácido lácticas</i>	3
1.2 Métodos de conservación	3
1.2.1 <i>Conservación en refrigeración</i>	4
1.2.2 <i>Conservación por congelación</i>	4
1.2.2.1 <i>Factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las cepas</i>	4
1.2.3 <i>Reactivación de bacterias criopreservadas y evaluación de la viabilidad</i>	5
1.3 Métodos de identificación.....	5
1.3.1 <i>Tinción de Gram y morfología</i>	6
1.3.2 <i>Prueba de movilidad</i>	6
1.3.3 <i>Prueba fermentación de carbohidratos</i>	6
1.3.4 <i>Pruebas bioquímicas</i>	6
1.3.4.1 <i>Catalasa</i>	6
1.3.4.2 <i>Oxidasa</i>	7

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	8
2.1	Localización y duración del experimento	8
2.2	Unidades experimentales.....	8
2.3	Materiales, equipos e insumos	8
2.3.1	<i>Materiales de laboratorio.....</i>	<i>8</i>
2.3.2	<i>Insumos de laboratorio</i>	<i>9</i>
2.3.3	<i>Cepas</i>	<i>10</i>
2.3.4	<i>Equipos.....</i>	<i>10</i>
2.4	Tratamiento y diseño experimental	11
2.5	Mediciones experimentales	11
2.5.1	<i>Reconstitución.....</i>	<i>11</i>
2.5.2	<i>Método</i>	<i>12</i>
2.5.3	<i>Viabilidad</i>	<i>12</i>
2.5.4	<i>Pruebas morfológicas</i>	<i>12</i>
2.5.5	<i>Pruebas bioquímicas</i>	<i>12</i>
2.6	Procedimiento experimental	12
2.7	Metodología de evaluación.....	13
2.7.1	<i>Reconstitución de las bacterias</i>	<i>13</i>
2.7.2	<i>Implementación del método de conservación</i>	<i>13</i>
2.7.2.1	<i>Ajuste de la carga de microorganismos mediante nefelometría.....</i>	<i>13</i>
2.7.2.2	<i>Metodología para la conservación por congelación en glicerol.....</i>	<i>14</i>
2.7.3	<i>Evaluación de la viabilidad</i>	<i>14</i>
2.7.3.1	<i>Conteo microbiológico NTE INEN 1 529-5.....</i>	<i>14</i>
2.7.4	<i>Pruebas morfológicas</i>	<i>15</i>
2.7.4.1	<i>Forma</i>	<i>15</i>
2.7.4.2	<i>Tamaño</i>	<i>15</i>
2.7.4.3	<i>Color</i>	<i>15</i>
2.7.5	<i>Pruebas bioquímicas</i>	<i>15</i>
2.7.5.1	<i>Prueba de tinción Gram</i>	<i>15</i>

2.7.5.2	<i>Prueba de catalasa</i>	16
2.7.5.3	<i>Prueba de oxidasa</i>	16
2.7.5.4	<i>Prueba de KOH</i>	16
2.7.5.5	<i>Prueba de movilidad</i>	17
2.7.5.6	<i>Prueba de acidificación</i>	17
2.7.5.7	<i>Fermentación de carbohidratos</i>	18

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1	Morfología de las bacterias ácido lácticas	19
3.1.1	<i>Color y forma</i>	19
3.1.2	<i>Tamaño</i>	19
3.1.2.1	<i>Lactobacillus agilis</i>	20
3.1.2.2	<i>Lactobacillus rapi</i>	21
3.2	Pruebas bioquímicas	21
3.3	Prueba de acidificación	21
3.3.1	<i>Lactobacillus agilis</i>	22
3.3.2	<i>Lactobacillus rapi</i>	23
3.4	Prueba fermentación de carbohidratos y movilidad	23
3.5	Prueba de viabilidad	24
3.5.1	<i>Lactobacillus agilis</i>	25
3.5.2	<i>Lactobacillus rapi</i>	25
	CONCLUSIONES	27
	RECOMENDACIONES	28
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Características meteorológicas de Riobamba	8
Tabla 2-2: Esquema ADEVA	11
Tabla 2-3: Ingredientes del caldo rojo fenol	18
Tabla 3-1: Morfología de las colonias de bacterias ácido lácticas aisladas de los bosques de la parroquia Baños.	19
Tabla 3-2: Tamaño (mm) de las colonias de bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación.	20
Tabla 3-3: Prueba bioquímicas de las bacterias ácido lácticas aisladas de los bosques primarios de la parroquia Baños.	21
Tabla 3-4: Acidez (%) de las colonias de bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación.....	22
Tabla 3-5: Fermentación de carbohidratos y prueba de movilidad de las bacterias ácido lácticas aislados de suelos primarios.	23
Tabla 3-6: Carga microbiológica (UFC/g) de las bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación.	24

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECONSTITUCIÓN DE LAS BACTERIAS

ANEXO B: IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN

ANEXO C: SIEMBRA DESPUÉS DE LA RECONSTITUCIÓN

ANEXO D: CONTEO MICROBIOLÓGICO

ANEXO E: PRUEBAS MORFOLÓGICAS (FORMA, COLOR, TAMAÑO)

ANEXO F: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (TINCIÓN GRAN, CATALASA, OXIDASA, KOH)

ANEXO G: PRUEBA DE MOVILIDAD

ANEXO H: PRUEBA DE ACIDIFICACIÓN

ANEXO I: FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

ANEXO J: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA FORMA, ACIDEZ Y VIABILIDAD DE LA CEPA *L. AGILIS* EN LOS DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS EMPLEADOS.

ANEXO K: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA FORMA, ACIDEZ Y VIABILIDAD DE LA CEPA *L. RAPI* EN LOS DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS EMPLEADOS.

RESUMEN

El uso de microorganismos es muy importante tanto en la agricultura, la alimentación, salud tanto humana como animal, por ello se requiere de la preservación de cepas y esta no es fácil porque la misma debe garantizar la supervivencia de las bacterias ácido lácticas por un periodo considerable de tiempo, garantizando la viabilidad, pureza y estabilidad genética de las bacterias, por lo tanto, el objetivo principal de la investigación fue la implementación de un método de conservación para bacterias ácido lácticas de bosques primarios de la parroquia Baños. La metodología implementada en la investigación inicio con la reconstitución de los microorganismos anteriormente aislados en medio sólido y líquido, se realizó un ajuste de la carga microbiológica mediante nefelometría; para la aplicación de método de conservación se utilizó el 30% de glicerol, estos se colocaron a -20°C , 4°C y 16°C por un periodo de 90 días. Se evaluó la viabilidad de la bacteria mediante el conteo microbiológico, las pruebas morfológicas, bioquímicas, prueba de fermentación de carbohidratos, acidificación y movilidad para la verificación si la bacteria sufrió cambios o mutaciones. Obteniendo resultados de la conservación en bacterias ácido lácticas a -20°C en 90 días, para la cepa *L. rafi* se mantuvo en valores de 6.9×10^5 Unidades formadoras de colonia (UFC/g) y $5.56.9 \times 10^5$ UFC/g dando a entender que no existió perdida en la concentración microbiológica; la cepa *L. agilis* presento valores entre $6.16.9 \times 10^6$ UFC/g y $1.96.9 \times 10^5$ UFC/g, existiendo una perdida parcial. Se concluye que ninguna de las cepas mostro cambios morfológicos, bioquímicos, así mismo las pruebas de fermentación de carbohidratos, movilidad y acidificación durante el periodo de conservación en 90 días, se tomó en cuenta que este método es apropiado para la conservación a largo plazo de las bacterias ácido lácticas con potencial agroindustrial.

Palabras clave: <BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS>, <MÉTODO DE CONSERVACIÓN>, <CONGELACIÓN>, <NEFELOMETRÍA>, <MORFOLÓGICA>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>, <PRUEBA DE VIABILIDAD >.



1724-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

Using microorganisms is significant in agriculture, food, and human and animal health. Therefore, the preservation of strains is required, and this is not easy because it must ensure the survival of lactic acid bacteria for a considerable period, ensuring the viability, purity, and genetic stability of the bacteria. Therefore, the research's main objective was to implement a conservation method for lactic acid bacteria from primary forests of the parish of Baños. The methodology implemented in the research began with the reconstitution of the microorganisms previously isolated in solid and liquid media. The microbiological load was adjusted by nephelometry. For the application of the preservation method, 30% glycerol was used; these were placed at -20°C , 4°C , and 16°C for a period of 90 days. The viability of the bacteria was evaluated by microbiological counting, morphological and biochemical tests, carbohydrate fermentation tests, acidification, and mobility to verify if the bacteria underwent changes or mutations. The results obtained from the preservation in lactic acid bacteria at -20°C in 90 days for the *L. rafi* strain remained in values of 6.9×10^5 Colony Forming Units (CFU/g) and $5.56.9 \times 10^5$ CFU/g implying that there was no loss in the microbiological concentration; the *L. agilis* strain presented values between $6.16.9 \times 10^6$ CFU/g and $1.96.9 \times 10^5$ CFU/g, with a partial loss. It is concluded that none of the strains showed morphological and biochemical changes, as well as carbohydrate fermentation, mobility, and acidification tests during the 90-day storage period. It was considered that this method is appropriate for the long-term preservation of lactic acid bacteria with agroindustrial potential.

Keywords: <LACID-LACID BACTERIA>, <CONSERVATION METHOD>, <FREEZE>, <NEFELOMETRY>, <MORPHOLOGICAL>, <BIOCHEMICAL TESTS>, <VIABILITY TEST>.



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco. MsC

0602698904

INTRODUCCIÓN

Los bosques primarios o conocidos como vírgenes son llamados así porque no existe aún la intervención del ser humano, estos son ricos en materia orgánica, mineral, agua y aire. Siendo así un lugar apto para la proliferación de microorganismo, según (Zambrano, 2013, p.8), en un estudio realizado sobre aislamiento y selección de cepas de los microorganismos autóctonos menciona la existencia de una gran variedad de microorganismos; los mismos que son afectados, dependiendo los factores ambientales, nutrientes disponibles en la zona y estos determinan los niveles de crecimiento microbiano.

En la actualidad, es común el uso de microorganismos en distintos campos ya sea para la obtención de medicamentos o a su vez en la elaboración de alimentos tanto en el consumo humano o animal. Las bacterias ácido lácticas se encuentran distribuidas en diferentes ecosistemas ya sean tanto suelo, agua y aire, además estos son muy ocupadas ya que desempeñan un papel importante en los procesos de producción de alimentos fermentados y a su vez estos proporcionan propiedades nutricionales y sensoriales a los alimentos ya procesados.

La microbiología industrial estudia el empleo de los microorganismos para la fabricación de productos industriales, centrados en las fermentaciones lácticas, acéticas y alcohólicas que son la base de las principales industrias existentes.

Según Parra, (2010, p. 94) en su estudio menciona que las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos, debido a sus propiedades metabólicas, terapéuticas y de gran valor nutricional. Estos se encuentran ampliamente distribuidas por todo el ecosistema, además actualmente son usadas a gran escala en la producción comercial de los alimentos fermentados. La preservación de los microorganismos es crucial para mantener las cepas microbianas sin que cambien su composición genética, pierdan viabilidad o pierdan su pureza durante largos períodos de tiempo. Por este motivo se han creado diversas técnicas para conservar los microorganismos que permitan conservar los microorganismos entre estos se encuentra la liofilización, congelación, desecación, entre otros (Pacheco y Serpas, 2013, p.28).

En vista de que existe muy poca información sobre las investigaciones que traten sobre la conservación de las bacterias ácido lácticas, esto se debe de gran manera a que estos tipos de bacteria son muy delicados dependiendo de la especie y género que se trate.

Por esta misma razón se realizó el presente estudio que tiene por objetivo implementar un método de conservación para bacterias ácido lácticas aisladas del suelo de bosques primarios de la Parroquia Baños y como objetivos específicos

Reconstituir las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del bosque

Aplicar el método de congelación con nitrógeno líquido a bacterias ácido lácticas aisladas de bosques primarios de la parroquia Baños

Evaluar la viabilidad de las cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de bosques primarios en el tiempo; 0, 15, 30, 60 y 90 días y a tres temperaturas de conservación (-20 °C, 4°C y temperatura ambiente)

Verificar las características morfológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas conservadas por el método desarrollado al inicio y al término del tiempo de conservación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Bacterias ácido lácticas

1.1.1 Generalidades

(Sánchez y Tropms, 2014, p. 125), describe como una colección de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros que comparten rasgos morfológicos, fisiológicos y metabólicos, estos son útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos así también son benéficos para la salud del consumidor.

1.1.2 Características de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas pueden ser bacilos o cocos gran positivos, no esporulados, en casos especiales son móviles pero la gran mayoría son inmóviles, oxidasa, catalasa y bencidina negativas, también carecen de citocromo y por ello estos originan ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos (Parra, 2010, p. 95). Además, estos son ácidos tolerantes pudiendo crecer en pH bajos de 3.3, otras en 9.6, pero la gran mayoría crece entre los 4 y 4,5. Todos los géneros de estas bacterias son considerados anaerobios facultativos ya que obtienen energía solamente del metabolismo de los azúcares y requieren de cultivos ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Ramírez et al., 2011; pp. 1-5).

1.2 Métodos de conservación

Las técnicas de conservación de cultivos microbianos son cruciales dado que permiten mantener a largo plazo una alta tasa de viabilidad, que los mantiene estables y evita cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos que reducirían su productividad inicial (Barragán y Lesmes, 2009; pp. 11-12).

(Weng et al 2005; pp. 1-3) en su estudio elección de un método de conservación que asegure la viabilidad de bacterias indígenas probióticas dice que un cultivo de aplicación industrial debe reunir determinadas características para la aplicación de los métodos de conservación o preservación:

- Contener el máximo número de células viables
- Estar libre de contaminantes

- Ser activo en las condiciones de procesamiento.

1.2.1 Conservación en refrigeración

Este tipo de conservación tiene como objetivo el incrementar la vida útil de los cultivos, y a su vez incrementar sus posibilidades de realizar una conservación a largo plazo. Según Zamora (2003; pp. 25-36) en su estudio aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas dice que este procedimiento es laborioso, consume mucho tiempo porque hace falta hacer resiembras en medios frescos, en intervalos de tiempo regulares que dependen de la temperatura, humedad donde se encuentran almacenados. Estos pueden estar en almacenamiento de 6 a 8 meses a una temperatura de 4-8°C, luego de transcurrido este tiempo se realiza una resiembra, para mantener así los cultivos estables.

1.2.2 Conservación por congelación

La congelación se puede emplear como un método físico - químico que permite la conservación más eficaz, mientras más bajo sea la temperatura de conservación, mayor será la supervivencia de las bacterias, a su vez existe una mínima destrucción de los microorganismos y así mantiene la viabilidad (Zamora, 2003; pp. 25-36).

1.2.2.1 Factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las cepas

Estudios realizados por (Pacheco y Serpas, 2013; pp. 28-35), existen varios factores que influyen para la conservación de las bacterias en las cuales se encuentra los siguientes:

- **Edad de las células:** En la mayoría de los casos se debe utilizar células maduras que estén en el inicio de la fase estacionaria en la curva de crecimiento, en caso de microorganismos que esporulan es preferible que estos ya estén en la fase estacionario estos tienen resistencia a condiciones adversas.
- **Velocidad de congelación y descongelación:** A pesar de la existencia de programas estandarizados para determinar casos o circunstancias, es mejor que la variación de temperatura sea rápida, tanto como la de congelación como la de descongelación, por lo que al descongelarse debe llegar a los 37°C.
- **Temperatura de almacenamiento:** Esta debe ser la más bajo posible, se debe colocar en tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidas en nitrógeno líquido, ya que tiene una temperatura de -195°C, o a su vez en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C. Según Acosta (2019, p. 12) señala que los

microorganismos viables se conservan a temperaturas entre -20°C y -80°C por un tiempo predeterminado sin sufrir ningún cambio genotípico, en su estudio que evalúa técnicas de conservación de microorganismos importantes en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander.

- **Empleo de agentes crioprotectores:** Son sustancias que protegen a las células microbianas del daño por congelación. Hay varios agentes, pero el glicerol, en una concentración de 15% a 20%, es el más utilizado. El tipo de microbio que desea preservar depende de su decisión. La elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar.

La mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos, virus, bacteriófagos) sobreviven largos periodos de almacenamiento en estado de congelación ya que este reduce el ritmo metabólico manteniéndose viable y estable (Bagatolli, 2017, p. 23).

Estudio realizado por (Merchuk, 2006, p. 16), sugiere que la velocidad de congelación sea lenta y una rápida descongelación rinde mayores números de células viables, pero esta también depende de la naturaleza de la célula.

1.2.3 Reactivación de bacterias criopreservadas y evaluación de la viabilidad

Las bacterias que permanecen en conservación, dependiendo el tipo de conservación usado deben tener una reactivación apropiada. Por ejemplo, en la reactivación de las bacterias congeladas deben tener una rápida reactivación pues podría dañar al microorganismo provocando estrés en el mismo. De esto dependerá también la viabilidad y estabilidad de las bacterias (García, 2013, p. 10). La evaluación de la viabilidad se realiza con el conteo respectivo de las bacterias, estimando la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC), después de realizar la siembra en cajas petri.

1.3 Métodos de identificación

Es muy importante conocer los métodos de identificación microbiana porque no todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas. La gran mayoría se los realiza en laboratorios, donde se realiza distintos procedimientos para lograr una adecuada identificación. Entre los más frecuentes se encuentra: tinción de Gram, la prueba de movilidad, entre muchas más (Pacheco y Serpas, 2013, p.28).

1.3.1 Tinción de Gram y morfología

La identificación morfológica es muy importante para el aislamiento de las colonias bacterianas, de esta observación podemos destacar la forma, consistencia, tamaño y color de las colonias (Fernández et al, 2010.p. 4). En caso de la tinción Gram es la más utilizada permitiendo agrupar las bacterias en dos grupos siendo estos las Gram (+) y Gram (-), estos resultados también son usados para comprobar la pureza de la colonia bacteriana (Martínez y Steven, 2019, citado en Duchi, 2022; pp. 12-13).

1.3.2 Prueba de movilidad

Esta prueba, que se realiza principalmente en agar semisólido, determina si una bacteria es móvil o inmóvil. Las bacterias se mueven debido a sus flagelos, que normalmente están presentes en los bacilos, pero también se pueden encontrar en algunos cocos flagelados (Silvavega et al., 2020, citado en Espín, 2021, p. 19). El medio de cultivo usado debe ser suave para que permita la migración de las bacterias móviles y de como resultado el enturbiamiento de este.

1.3.3 Prueba fermentación de carbohidratos

La fermentación de los carbohidratos incorporados evalúa la reacción del organismo que producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido, existe un proceso de reducción; el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Moreno y Velarde, 2016, citado en Duchi, 2022, p. 13).

1.3.4 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se las realiza a los microorganismos como un paso fundamental para conocer el tipo de organismo encontrado.

1.3.4.1 Catalasa

La mayoría de los microorganismos con citocromo tienen la enzima catalasa, que las bacterias producen al hidrolizar el peróxido de hidrógeno en oxígeno gaseoso y agua, que se descargan en forma de burbujas. La separación de bacterias *Micrococaceae* (positivas) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativas) es el objetivo principal de esta prueba (Fernández et al, 2010, p. 6).

1.3.4.2 *Oxidasa*

Esta prueba permite determinar si las enzimas oxidasas están presentes. El sistema de citocromo oxidasa, que según las bacterias es responsable de la reacción de oxidasa, inicia la oxidación del citocromo, que se reduce con el oxígeno molecular y da como resultado la producción de agua y peróxido de hidrógeno. La catalasa, que degrada el peróxido de hidrógeno creado por la reducción de oxígeno, se forma junto con la presencia de oxidasa (Fernández et al, 20, p. 6).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización y duración del experimento

El presente experimento se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, la cual se encuentra ubicada en la provincia de Chimborazo, cantón de Riobamba en la Panamericana Sur 1 1/2 km, tiene una permanencia de cuatro meses en el mencionado laboratorio.

Tabla 2-1: Características meteorológicas de Riobamba

INDICADORES	PROM. Mensual (2022)
Temperatura (°C)	15,76
Humedad relativa (%)	78,838 %
Precipitación (mm/mes)	4,5
Velocidad/ Viento (m/s)	1,2
Presión atmosférica (hPa)	728, 888

Fuente: (Estación meteorológica, ESPOCH, 2022)

Realizado por: Añilema, D., 2023

2.2 Unidades experimentales

Se utilizarán dos cepas de referencia de bacterias ácido lácticas que fueron aisladas anteriormente del bosque primario de la parroquia Baños, lo cual se realizara 3 repeticiones por cada especie, en tiempos de 0, 15, 30, 60 y 90 días respetivamente con temperaturas de 4, 16 y -20°C.

2.3 Materiales, equipos e insumos

2.3.1 *Materiales de laboratorio*

- Tubos de ensayo
- Gradillas metálicas
- Espátula
- Vasos de precipitación
- Cajas Petri vidrio
- Micropipeta

- Asas de siembra
- Pinzas
- Probetas de 100 ml
- Puntas de 1000 μ l
- Varillas de agitación vidrio
- Varillas de agitación magnéticas
- Frascos termo resistentes
- Porta objetos
- Tubos eppendorf 1,5ml
- Bureta
- Tubos Burnham
- Piseta
- Campana de Durham
- Desecador
- Mechero Bunsen
- Marcador
- Fósforos
- Tanque de gas
- Tanque de nitrógeno líquido
- Papel aluminio
- Toalla de mano
- Papel film
- Guantes
- Cofia
- Mascarilla
- Mandil

2.3.2 *Insumos de laboratorio*

- Glicerol
- Agar MRS
- Caldo rojo de fenol
- Caldo MRS
- Medio Sim
- Tiras de oxidasa
- Nitrógeno líquido

- Peróxido de hidrogeno
- Fenolftaleína
- Hidróxido de sodio 0,1N
- Carbohidratos para fermentación (manitol, sacarosa, rafinosa, celobiosa)
- Agua destilada
- Safranina
- Lugol
- Yodo
- Alcohol cetona
- Alcohol 97%
- Alcohol 70%
- Amonio cuaternario

2.3.3 Cepas

- *Lactobacillus agilis*
- *Lactobacillus rafi*

2.3.4 Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Microscopio
- Microscopio estereoscópico con cámara
- Estufa
- Agitador magnético
- Vortex
- Cámara de flujo laminar
- Nefelómetro
- Refrigerador
- Cuenta colonias
- Ultra congelador
- Computadora

2.4 Tratamiento y diseño experimental

El presente trabajo de investigación se realizó mediante un estudio experimental y descriptivo por lo cual se utilizó como población de estudio 2 cepas de bacterias ácido-lácticas previamente aisladas de la parroquia Baños.

Variables:

Dependiente: Cepas de bacterias ácido lácticas

Independientes: Temperatura

Tiempo de conservación

Estos resultados se analizaron bajo un análisis de varianza (ADEVA).

Tabla 2-2: Esquema ADEVA

ADEVA	
FV	GL
Total	(n-1) = 15
Tratamiento	(t-1) = 3
Error	(n-1) - (T-1) = 12

Realizado por: Añilema D., 2023

La prueba de separación de medias ($P < 0,05$) a través de la prueba de Tukey.

$$w = q \times \sqrt{\frac{CME}{r}}$$

Donde:

q = Valor de la tabla (Tabla de Tukey)

CME = Varianza del error

r = Tratamientos

2.5 Mediciones experimentales

Las medidas experimentales que se tomaron en cuenta son las siguientes:

2.5.1 Reconstitución

- Resiembra por agotamiento en agar MRS (UFC/g)

2.5.2 Método

- Ajuste de carga de microorganismo mediante Nefelometría (NTU)

2.5.3 Viabilidad

- Conteo poblacional de bacterias ácido lácticas (UFC/g)

2.5.4 Pruebas morfológicas

- Forma
- Tamaño
- Color

2.5.5 Pruebas bioquímicas

- Gram Positiva
- Gram negativa
- Catalasa
- Oxidasa
- Prueba de KOH
- Prueba de movilidad
- Prueba de acidificación
- Fermentación de carbohidratos

2.6 Procedimiento experimental

El presente trabajo investigativo se realizó mediante los siguientes procedimientos.

- Se realizó una reconstitución de las cepas por medio de una resiembra por agotamiento por duplicado de las cepas de bacterias ácido lácticas en Agar MRS y se incuban por 24hs a 37°C. pasado este tiempo se realiza un conteo y lectura morfológica de los microorganismos.
- Para la implementación del método de conservación se realizó primero un ajuste de la carga de microorganismos mediante Nefelómetro para cada bacteria y esta solución se lo coloca en el nefelómetro para obtener un resultado mediante la turbidez que este presenta.

- Luego se realiza una estandarización de las cargas bacterianas en balanzas analíticas, se pesa los tubos vacíos y también los tubos con la solución de agua con bacterias ácido lácticas ya que este paso servirá para saber el valor aproximado de la carga microbiana.
- Se realiza la elección de crioprotectores que se va a utilizar para las bacterias ácido lácticas, las mismas que deben de ser esterilizadas en la autoclave por 10min.
- Posteriormente se coloca en un tubo eppendorf estéril una solución de 1ml de solución ajustada y 0,5ml de crioprotector estéril a la concentración adecuada, tapar, agitar y rotular.
- Se aplica el método de conservación con nitrógeno líquido, se almacenan a distintas temperaturas (-20°C, 4°C y 16°C) y tiempos de conservación (0, 15,30, 60 y 90 días) para sus posteriores estudios.
- Finalmente se realizaron las distintas pruebas de: viabilidad, morfológicas y bioquímicas, mediante estos se puede saber si hubo alteración o pérdida de los microorganismos conservados.

2.7 Metodología de evaluación

En el presente trabajo de investigación se utilizó los siguientes métodos de evaluación.

2.7.1 Reconstitución de las bacterias

La resiembra se usó para reconstituir las cepas de investigación cuando se agotaron, utilizando un vial completo cada vez que la cepa necesitaba ser revivida. Los viales mantenidos a -20 °C deben descongelarse rápidamente en un baño de agua a 37 °C durante 30 segundos. Transferir unas gotas del contenido bacteriano al medio sólido sugerido para el desarrollo de la cepa, y el material restante a un tubo que contenga de 5 a 10 ml de la forma líquida del mismo medio. Incubar a la temperatura adecuada y en las circunstancias adecuadas. Subcultivar al menos una vez antes de ser utilizada para cepa de trabajo (Escardino, 2016).

Pasadas las 24 horas de incubación se debe realizar lectura de morfología colonial de cada una y a su vez una morfología microscópica con la técnica de tinción de Gram para su identificación a cada uno de los microorganismos.

2.7.2 Implementación del método de conservación

2.7.2.1 Ajuste de la carga de microorganismos mediante nefelometría

Para medir la turbidez primero se debe realizar la preparación del inóculo en medio de cultivo líquido. Donde se utilizó de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembradas en 5ml de un medio líquido (depende de la bacteria) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar la turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril.

El equipo debe primero encerse con agua destilada, posteriormente leemos la turbidez de un patrón de escala conocida, con fines de control de calidad y finalmente se procede a leer las suspensiones bacterianas (Ulloa, 2015, p. 24-29).

2.7.2.2 Metodología para la conservación por congelación en glicerol

Las bacterias del ácido láctico se mantuvieron en caldo MRS con glicerol al 30 % a -20 °C para su conservación a largo plazo. Para lo cual se combinaron volúmenes iguales de cultivo y glicerol al 30%, previamente esterilizados a 121°C y 1atm de presión, y el cultivo overnight se realizó inicialmente a 33°C en caldo MRS de las bacterias separadas. Luego, las cepas de bacterias del ácido láctico se agregan al glicerol y se agitan continuamente para crear una mezcla homogénea. A continuación, se reparten 1,5 ml de la mezcla en tubos eppendorf para conservarla durante la ultracongelación a -20°C (Vargas, 2018, p. 32).

Se rotula cada una de las muestras con códigos ya que fueron almacenadas en distintas temperaturas 4°C, 16°C y -20°C, por tiempos de 0, 15, 30, 60 y 90 días para su conservación.

2.7.3 Evaluación de la viabilidad

Para este paso se realiza primero una reconstitución de las bacterias, seguido por un conteo microbiológico. Para lo cual se toma en cuenta la NTE INEN 1 529-5:2006.

2.7.3.1 Conteo microbiológico NTE INEN 1 529-5

Se prepara la muestra de bacterias y se procede a realizar diluciones y éstas serán por duplicado, en cada caja petri con su respectivo agar se deposita 1 cm^3 de cada dilución, se deja incubar a 37°C por 24 horas. Pasado el tiempo se procede a realizar un conteo de las colonias utilizando un contador de colonias (NTE INEN 1529-5, 2006).

En caso de que las placas contengan entre 15 y 300 colonias se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} \text{ ó } \frac{UFC}{g} = \frac{No. de colonias por placa * el factor de dilución}{ml de la muestra sembrada}$$

Fuente: NTE INEN 1 529-5, 2006.

Realizado por: Añilema, D. 2023

Nota: Se realizó este procedimiento para cada periodo de conservación (0, 15, 30, 60, 90 días) y temperaturas (4°C, 16°C y -20°C) para cada una de las bacterias de estudio.

2.7.4 Pruebas morfológicas

Las pruebas morfológicas de las colonias son fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos (Fernández et al, 2010, p. 4).

2.7.4.1 Forma

En las bacterias ácido lácticas la forma varía dependiendo de la especie o familia, también está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. Este proceso se lo realiza de forma visual para cada especie bacteriana, las colonias tienden a tener distintas formas.

2.7.4.2 Tamaño

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente son uniforme entre una misma especie, se estima el diámetro en mm, el cual se realiza con ayuda del microscopio estereoscópico de cámara con el programa *Motic Live Images*, el cual realiza una medición del radio de la cepa, obtenidos estos valores se estima el diámetro.

2.7.4.3 Color

En las bacterias ácido lácticas normalmente al formar colonias el color varía de un color blanco cremoso, beige y crema opaco siendo algo más oscura en la parte central. La determinación de este parámetro se los realiza de forma visual.

2.7.5 Pruebas bioquímicas

2.7.5.1 Prueba de tinción Gram

Después de realizar la identificación apropiada de las colonias de manera macroscópica se realiza la prueba de tinción Gram.

Procedimiento.

Con la ayuda del asa de siembra, retirar una pequeña porción de una colonia de la muestra, formar una mancha en el portaobjetos, mezclar con el agua destilada, dejar secar y luego fijar a la llama. Cubrir con solución de cristal violeta durante 1 minuto, lavar con agua corriente para eliminar el exceso, luego aplicar solución de yodo (Lugol) durante 1 minuto, lavar con agua corriente para eliminar cualquier resto de color, decolorar añadiendo 1 gota de solución de alcohol-acetona, lavar con agua corriente para eliminar cualquier resto de color, y finalmente cubrir con safranina durante 30 segundos, lavar con agua corriente para eliminar cualquier resto de color antes de realizar la observación correspondiente al microscopio con objetivo 100X mientras se añade una gota de aceite de inmersión (Ramírez et al., 2018, p. 38).

Esta prueba tiene como objetivo la identificación de las bacterias mediante la coloración pues al añadir alcohol-acetona se arrastra el colorante solo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecen de color violeta (Rodríguez, 2009, p. 45).

2.7.5.2 Prueba de catalasa

Con el asa de siembra se tomó una porción de masa bacteriana y se colocó en un portaobjetos, después de agregar 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%, se observa si existe la presencia o ausencia de efervescencia, de esta manera se puede comprobar la existencia de catalasa. En caso de las bacterias ácido lácticas son catalasa negativa (Fernández et al, 2010, p. 30).

2.7.5.3 Prueba de oxidasa

Se toma con el asa de siembra esterilizado una muestra bacteriana a partir de una colonia proveniente de un cultivo de 24 horas de incubación, se coloca en tiritas de oxidasa, pasado 30 segundos aproximadamente si cambia de color la prueba tiende a ser positiva (Fernández et al, 2010, p. 30).

2.7.5.4 Prueba de KOH

Esta prueba sirve como confirmación de la tinción de Gram ya que nos dice si la pared bacteriana es resistente a las soluciones alcalinas. Si la prueba de KOH es positiva (hay un hilo mucoso), la bacteria será Gram negativa y viceversa (Latorre, 2011, citado en Duchí., 2022, p. 25).

Para esta prueba se usa hidróxido de potasio y portaobjetos de vidrio y la realización del método es similar a la catalasa. Se recoge con el asa de siembra una muestra bacteriana del agar con las

colonias crecidas, colocando en el portaobjetos, añadiendo una gota de hidróxido de potasio al 1% y se observa la aparición de hilo mucoide (Latorre, 2011, citado en Duchi, 2022, p. 25).

2.7.5.5 Prueba de movilidad

Esta prueba se realiza para identificar si un microorganismo es móvil o inmóvil, se realiza la prueba en medio Agar SIM.

Procedimiento

Se cosechó una colonia de cultivo puro usando el asa de siembra después de 18 a 24 horas de incubación, y se creó una picadura de alrededor de 1,5 cm en el medio SIM. Durante 24 horas, los tubos se incubaron entre 35°C y 37°C. La turbidez influye en la motilidad bacteriana: la motilidad (+) se caracteriza por una turbidez total o difusa en el medio, mientras que la motilidad (-) se caracteriza por la ausencia de crecimiento o por un crecimiento restringido al sitio de la picadura (Espín, 2021, p. 19).

2.7.5.6 Prueba de acidificación

Esta prueba se realizó mediante la Norma técnica INEN 0013.

Procedimiento.

Esta normativa establece el método para determinar la acidez titulable de la leche, para esta prueba primero se inoculo 30 ml de leche con 1ml de muestra bacteriana y se deja 24 horas a 37°C para su fermentación. Luego se realiza su respectivo análisis con una solución estandarizada de hidróxido de sodio al 0,1 N, usando fenolftaleína como indicador. La muestra se coloca en vasos de precipitación, es agitada para tener una mezcla homogénea y se agrega 2ml de solución indicadora de fenolftaleína.

Agregar lentamente la solución de 0,1N de hidróxido de sodio, sin dejar de agitar hasta conseguir un color rosado que persista, finalmente se realiza una lectura de la bureta el volumen de solución empleada (INEN 0013, 1998, p. 2-3).

Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$A = 0,090 \frac{V \times N}{m_{1-m}} \times 100$$

Fuente: INEN 0013, 1998

Realizado por: Añilema D, 2023

Donde:

A = acidez titulable en %

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio

m1 = masa de vaso de precipitación con la sustancia a estudiar, en gramos

m = masa de vaso de precipitación vacío, en gramos

2.7.5.7 Fermentación de carbohidratos

Se desarrolló la creación del caldo rojo fenol (CRF), que actúa como base para confirmar la fermentación de los carbohidratos. Contiene una indicación de rojo fenol.

Los componentes del caldo base, que está diseñado para fomentar la fermentación de un carbohidrato específico, se enumeran a continuación:

Tabla 2-3: Ingredientes del caldo rojo fenol

INGREDIENTES	CANTIDAD
NaCl	5 g
Rojo Fenol	0,018 g
Carbohidrato de estudio	10 g
Agua destilada	100 ml
Peptona	12 g
Extracto de carne	1 g

Fuente: (Catillo, 2021. p.40) citado por (Duchi, 2022. p.27)

Realizado por: Añilema D, 2023

Procedimiento.

Se colocó 10 ml del caldo rojo fenol ya preparado en tubos de ensayo estéril (con campana de Durham si se requiere), tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Incubar el CRF con un 1ml de suspensión bacteriana y llevar a incubar a 37°C durante 24 horas, examinar los tubos para evaluar la producción de ácido y gas.

Interpretación.

La presencia de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación de hidratos de carbono. La presencia de una o más burbujas indica una reacción positiva para la producción de gas (García, 2013, p. 36).

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la parte experimental del presente trabajo y se registra los resultados de las pruebas morfológicas, bioquímicas y de viabilidad de las 2 cepas de estudio durante los 0, 15, 30, 60 y 90 días de conservación a 4°C, 16°C y -20°C.

3.1 Morfología de las bacterias ácido lácticas

3.1.1 Color y forma

Las características morfológicas que se tomaron en cuenta son el color y forma de las colonias, se muestra en la tabla 3-1.

Tabla 3-1: Morfología de las colonias de bacterias ácido lácticas aisladas de los bosques de la parroquia Baños.

ESPECIE	COLOR	FORMA
<i>L. agilis</i>	Crema	Circular
<i>L. rapi</i>	Beige	Circular

Realizado por: Añilema D, 2023

De la observación visual de las colonias de *L. agilis* presentaron una forma circular, color crema, similar a las bacterias *L. rapi* que registro color beige, con la misma forma circular de la anterior; resultados que concuerdan con los reportados por (Watanabe et al, 2009, p. 759), quien indica que el *L. rapi* desarrolla colonias de color beige y forma circular ligeramente irregular con una superficie rugosa. A su vez (Ehsani et al, 2018, p. 727), al evaluar la producción de queso probiótico indica que las colonias del *L. agilis* tiene forma circular, de color crema brillante, borde liso y un círculo de calcio fundido en el centro.

3.1.2 Tamaño

En la tabla 3-2 se puede observar el tamaño (mm) de las colonias de bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación; resultados que se analizan a continuación.

Tabla 3-2: Tamaño (mm) de las colonias de bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación.

TEMPERATURA	TIEMPO	<i>L. AGILIS</i>	<i>L. RAPI</i>
-20 °C	0 días	2,89 a	2,62 ab
-20 °C	15 días	3,20 a	2,63 ab
-20 °C	30 días	2,77 a	2,86 ab
-20 °C	60 días	2,67 a	2,88 ab
-20 °C	90 días	2,99 a	2,73 ab
4°C	0 días	2,56 a	2,73 ab
4°C	15 días	3,04 a	2,93 ab
4°C	30 días	3,12 a	2,70 ab
4°C	60 días	2,91 a	2,63 ab
4°C	90 días	2,75 a	2,94 ab
16°C	0 días	3,08 a	2,54 b
16°C	15 días	2,88 a	2,58 b
16°C	30 días	2,81 a	3,02 ab
16°C	60 días	2,97 a	3,22 a
16°C	90 días	2,85 a	2,85 ab
		EE.	0,14
		Prob.	0,0738

EE. Error estándar

P<0,05 diferencias significativas

P>0,05 no significativa

P<0,01 es altamente significativa

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Realizado por: Añilema D, 2023

3.1.2.1 *Lactobacillus agilis*

El tamaño de las colonias por efecto de la interacción entre temperaturas y tiempos de almacenamiento *L. agilis* no presenta diferencias estadísticas ($P>0,05$), en cuanto se establecieron tamaños que variaron entre 2,56 mm a 4°C en el día 0 y 3,20 mm con -20°C en el día 15, que son los casos extremos; pudiendo afirmarse que la temperatura y tiempo de conservación no influye en el tamaño de las colonias.

Tomando en consideración en reporte de (Ramírez y Vélez, 2016, p. 119), quienes al realizar el aislamiento, caracterización y selección de bacterias ácido lácticas indican que las colonias de *Lactobacillus* tienen un tamaño de 3 mm o superiores valores que concuerdan con los resultados del presente trabajo.

3.1.2.2 *Lactobacillus rapi*

El efecto de la diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento presentan influencia en el tamaño de las colonias de *L. rapi*, cuando se utilizó 16°C conservado por 60 días, el tamaño de las colonias fue mayor (3,22 mm) a diferencia que cuando se utilizó 16°C entre 0 y 15 días de almacenamiento, se registraron valores de 2,54 y 2,58 mm, valores que estadísticamente presentan diferencias significativas.

Tomando como referencia a (Watanabe et al, 2009, p. 759), es su investigación indica que el *L. rapi* forma colonias de 2 a 3 mm en diámetro, sembradas en agar MRS con una temperatura de 37°C en incubación por 24 horas.

3.2 Pruebas bioquímicas

Los resultados que se presentan en la tabla 3-3 son las pruebas bioquímicas realizadas después del proceso de conservación llevado a cabo en distintos tiempo y temperaturas ejecutados en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

Tabla 3-3: Prueba bioquímicas de las bacterias ácido lácticas aisladas de los bosques primarios de la parroquia Baños.

ESPECIE	TINCIÓN	CATALASA	OXIDASA	KOH
<i>L. agilis</i>	+	-	-	-
<i>L. rapi</i>	+	-	-	-

Realizado por: Añilema D, 2023

Las dos bacterias que estuvieron en conservación pertenecen al género *Lactobacillus*, los resultados obtenidos de las pruebas de tinción son Gram positivos, la catalasa, oxidasa y KOH son negativos. Valores similares a los obtenidos por (Ramírez & Vélez, 2016. p.120), en su investigación sobre aislamiento, caracterización y selección de bacterias ácido lácticas, es importante destacar que para considerar como bacterias ácido lácticas deben ser Gram positivas, la catalasa, oxidasa y la prueba de hidróxido de potasio son negativas.

3.3 Prueba de acidificación

En la tabla 3-4 se muestra los resultados obtenidos de la prueba de acidificación realizadas después de los tiempos y temperaturas de conservación.

Tabla 3-4: Acidez (%) de las colonias de bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación

TEMPERATURA	TIEMPO	<i>L. AGILIS</i>	<i>L. RAPI</i>
-20 °C	0 días	0,17 a	0,14 a
-20 °C	15 días	0,16 a	0,14 a
-20 °C	30 días	0,10 c	0,10 a
-20 °C	60 días	0,10 c	0,10 a
-20 °C	90 días	0,09 c	0,09 a
4°C	0 días	0,17 a	0,13 a
4°C	15 días	0,16 a	0,15 a
4°C	30 días	0,10 c	0,12 a
4°C	60 días	0,10 c	0,12 a
4°C	90 días	0,09 c	0,09 a
16°C	0 días	0,17 a	0,12 a
16°C	15 días	0,14 b	0,14 a
16°C	30 días	0,10 c	0,10 a
16°C	60 días	0,10 c	0,10 a
16°C	90 días	0,09 c	0,09 a
		EE.	2,20E-03
		Prob.	0,0001

EE. Error estándar

P<0,05 diferencias significativas P>0,05 no significativa P<0,01 es altamente significativa

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Realizado por: Añilema D, 2023

3.3.1 *Lactobacillus agilis*

En la prueba de acidez la especie *L. agilis* presentan diferencias altamente significativas por efecto del tiempo de conservación, puesto que al utilizar -20 °C, 4°C y 16°C conservados en el día 0 la acidez fue mayor (0,17%), a diferencia de cuando su conservación fue de -20°C, 4°C y 16°C a los 90 días se registraron valores de 0,09%; valores que indican que a menor tiempo de conservación mayor es el porcentaje de acidez.

Los resultados de acidez concuerdan con los descrito por (Guerrero, 2011, pp. 62-63), en su investigación sobre la utilización de probióticos (*Lactobacillus plantarum*) en la elaboración de una bebida de soya, donde obtuvo valores de 0,17% a 0,37% las 8 horas de fermentación, esto debido a que los valores de acidez se incrementan con relación al tiempo de fermentación, la

velocidad de producción de ácido láctico y la cantidad de nutrientes y azúcares necesarios para la fermentación.

3.3.2 *Lactobacillus rapi*

Los resultados obtenidos para el *L. rapi* no presenta diferencias significativas, por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo, obteniendo valores entre 0,09% con -20°C, 4°C, 16°C en el día 90 y 0,15% a 4°C en 15 días, como casos extremos; dando a entender que no afecta ni la temperatura y tiempo los resultados de acidificación.

De acuerdo a los resultados de (Parra, 2012, p. 97), en su estudio de bacterias ácido lácticas; papel funcional en los alimentos indica que las bacterias ácido lácticas según la temperatura ideal de crecimiento en mesófilos su acidez final es de 0,8% y en termófilas 0,9% de producción de ácido láctico, teniendo en cuenta que las especies bacterianas estudiadas están por debajo de los reportados, esto se debe a los tiempos y temperaturas de conservación, ya que a medida que pasa los días de conservación la concentración bacteriana disminuye, así mismo su producción de ácido láctico es muy bajo.

3.4 Prueba fermentación de carbohidratos y movilidad

La prueba de fermentación de carbohidratos ayuda a la identificación de las bacterias ácido lácticas, obteniendo los siguientes resultados descritos en la tabla 3-5.

Tabla 3-5: Fermentación de carbohidratos y prueba de movilidad de las bacterias ácido lácticas aislados de suelos primarios.

ESPECIE	MANITOL	SACAROSA	RAFINOSA	LACTOSA	CELOBIOSA	SIM
<i>L. agilis</i>	+	Débil	+	+	Débil	-
<i>L. rapi</i>	-	Débil	+	-	-	-

Realizado por: Añilema D, 2023

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de fermentación de carbohidratos muestra que *L. rapi* como *L. agilis* son capaces de fermentar sacarosa, rafinosa, lactosa y celobiosa, como se observa por los resultados positivos en estos carbohidratos a lo largo del tiempo. Estos hallazgos son consistentes con estudios realizados por (Zheng et al., 2013), quien al evaluar las características probióticas de cepas de *Lactobacillus* aisladas de granos de kéfir tibetano encontró

que algunas cepas de *Lactobacillus* tenían la capacidad de fermentar sacarosa, lactosa y otros carbohidratos similares.

En cuanto a la fermentación del manitol y lactosa el *L. rapi* no tiene la capacidad de fermentar estos carbohidratos, según estudio realizado por (Watanabe et al, 2009, p. 759), comenta que esta especie no produce ácido a partir del manitol así también como la lactosa por el hecho que las células no pueden sintetizar estos carbohidratos.

En la prueba de SIM o movilidad de las bacterias ambas muestras dieron como resultado negativo ya que muchas de las bacterias son inmóviles. El resultado concuerda con lo dicho (Watanabe et al., 2009; p. 759) donde concluye que *L. rapi* son células inmóviles y no formadoras de esporas y son anaerobias facultativas, así mismo (Kajikawa, Susuki y Igimi, 2018, p. 2), en su estudio sobre el impacto de la movilidad en la localización de *L. agilis* que estos tipos de bacterias son inmóviles a menos que ocurra una mutación.

3.5 Prueba de viabilidad

En la tabla 3-6 se describe los resultados del conteo microbiológico de las bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo.

Tabla 3-6: Carga microbiológica (UFC/g) de las bacterias ácido lácticas por efecto de la interacción de la temperatura y tiempo de conservación.

TEMPERATURA	TIEMPO	<i>L. AGILIS</i>	<i>L. RAPI</i>
-20 °C	0 días	6.1×10 ⁵ a	6.9×10 ⁶ a
-20 °C	15 días	6.2×10 ⁵ a	6.0×10 ⁶ ab
-20 °C	30 días	4.2×10 ⁵ a	5.7×10 ⁶ ab
-20 °C	60 días	2.4×10 ⁵ a	5.7×10 ⁶ ab
-20 °C	90 días	1.9×10 ⁵ a	5.5×10 ⁶ bc
4°C	0 días	5.9×10 ⁵ a	5.4×10 ⁶ bc
4°C	15 días	5.6×10 ⁵ a	5.5×10 ⁶ bc
4°C	30 días	4.0×10 ⁵ a	4.9×10 ⁶ bc
4°C	60 días	2.1×10 ⁵ a	4.1×10 ⁶ cd
4°C	90 días	1.5×10 ⁵ a	3.3×10 ⁶ de
16°C	0 días	5.2×10 ⁵ a	4.9×10 ⁶ bc
16°C	15 días	4.9×10 ⁵ a	5.1×10 ⁶ bc
16°C	30 días	3.0×10 ⁵ a	4.1×10 ⁶ cd

16°C	60 días	1.5×10 ⁵ a	3.2×10 ⁶ de
16°C	90 días	1.0×10 ⁵ a	2.0×10 ⁵ e
EE.		19784,02	27230,88
Prob.		0,8596	0,0057

EE. Error estándar

P<0,05 diferencias significativas

P>0,05 no significativa

P<0,01 es altamente significativa

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Realizado por: Añilema D, 2023

En la prueba de viabilidad se tomó en cuenta el crecimiento de las cepas de 24 horas de incubación a 37°C, en el cuadro se puede apreciar que el crecimiento en ambas especies

3.5.1 *Lactobacillus agilis*

Los resultados obtenidos en la carga microbiológica de la especie *L. agilis* no presentan diferencias estadísticas por efecto de la interacción de la temperatura con el tiempo, por cuanto están varían entre 1.0×10⁵ UFC/g con 16°C en 90 días, y 6.2×10⁵ UFC/g con -20°C en 15 días, como casos extremos; por lo que pueda indicarse que la temperatura y el tiempo no influye en el conteo microbiológico. Según (Ehsani al et., 2018; p. 728), la poca reducción en la concentración de las bacterias ácido-lácticas podría deberse a la falta de carbohidratos, temperaturas de conservación, tipo de agente crioprotector.

En el estudio realizado por (Vázquez, 2014, p. 88-90), quien, al realizar la identificación y caracterización de un aislamiento nativo de *Lactobacillus*, las bacterias ácido lácticas no se produjo un descenso en la viabilidad durante el proceso de congelación a -70°C puesto que el recuento se realizó en 0 días con valor de 1,31E+09 UFC/ml y 1,40E+09 UFC/ml a los 80 días, mostrando la misma concentración bacteriana en el transcurso de almacenamiento.

3.5.2 *Lactobacillus rari*

En la especie *L. rari* presentan diferencias altamente significativas por efecto de la interacción de la temperatura con el tiempo en el conteo microbiológico, en el cual el valor es de 6.9×10⁶ UFC/g en -20 °C conservados en el día 0 fue mayor a contrario de 2.0×10⁵ UFC/g a 16°C a los 90 días siendo el valor más bajo en la concentración de bacterias ácido lácticas.

En el estudio realizado por (Zamora, 2005, p. 728), quienes al realizar el aislamiento, identificación y conservación de bacterias ácido lácticas que fueron almacenadas durante 60 días tuvieron

diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) en el cual está en rangos de $5,60E+08$ UFC/g en 0 días de conservación siendo superior a $3,00E+08$ UFC/g en 60 días. La pérdida de células según (Zamora, 2005, p. 728), podría ocurrir en varias fases, incluso cuando las células en un medio de suspensión bajan de la temperatura ambiente al punto de congelación como resultado, entre otras cosas, del desarrollo de hielo intracelular y extracelular o del aumento gradual del contenido de soluto en el medio, cuando el agua todavía está líquida, se está almacenando o descongelando.

CONCLUSIONES

La reconstitución de las cepas de bacterias ácido lácticas es un paso importante puesto que se debe realizar una reactivación a las bacterias conservadas para sus respectivos estudios.

En la aplicación del método de congelación con glicerol al 30% se determinó que las características propias de cada bacteria ácido láctica evaluada se mantuvieron inalterables, tanto con el cambio de temperaturas y tiempos, dado que el glicerol ayuda a que no exista un daño en el microorganismo, además de ser el más utilizado para conservaciones a bajas temperaturas.

Al evaluar la viabilidad mediante el conteo microbiológico de las cepas bacterianas, la temperatura ideal para la conservación es de -20°C ya que logro mantener la viabilidad de las 2 bacterias por un periodo de 90 días, para la temperatura de 4°C su rendimiento bajo desde el día 30, puesto que la concentración bacteriana fue menor al termino de los 90 días de conservación y a temperatura de 16°C desde el día 15 se observó una baja cantidad de colonias presentes.

Las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias durante los tiempos y temperaturas de conservación se mantuvieron sin mostrar ninguna alteración o mutación en las bacterias ácido lácticas.

RECOMENDACIONES

Para una mayor exactitud en la investigación con respecto a las pruebas bioquímicas de las bacterias ácido lácticas, se propone la utilización de las pruebas API CHL 50 o la compra de reactivos pertinentes para cada tipo de estudio que se debe realizar.

Se sugiere también la obtención de equipos especiales para la conservación de las bacterias de interés agroindustrial por el hecho que el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias no cuenta con dichos equipos, formando inconvenientes al momento de la realización del presente trabajo.

Se recomienda la realización de estudios más profundos acerca de los tipos de conservación para bacterias ácido lácticas, teniendo en cuenta las temperaturas y tiempos a largo plazo para una posterior utilización en la elaboración de productos alimentarios o formación de un cepario específico para bacterias de interés agroindustrial.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, A. 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). Universidad de Santander, Colombia. 2019. pp. 10-16. [Consulta: 16 de marzo de 2023] Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/80707b74-8a23-4be7-8135-23719b132c47/content>

BAGATOLLI, C. Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Cuyo, Argentina. 2017. pp. 21-24. [Consulta: marzo de 2023]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/80528464.pdf>

BARRAGÁN, D. & LESMES, A. Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: Elección del mejor método. [En línea] (Trabajo de titulación). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 2009. pp. 11-12. [Consulta: 13 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf;jsessionid=1C0BEF85D3C7673715407C2A955F47CE?sequence=1>

DUCHI, B. Microorganismos de uso agroindustrial aislados del suelo de un bosque primario de la Parroquia Pungala canton Riobamba. [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Ecuador. 2022. pp. 12-14. [Consulta: 09 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17808/1/27T00553.pdf>

EHSANI, A., HASHEMI, M., AFSHARI, A. & AMINZARE, M. “Probiotic white cheese production using coculture with *Lactobacillus* species isolated from traditional cheeses”. *Veterinary World* [En línea], 2018, (Iran) pp. 726-730. [Consulta: 12 de junio de 2023]. ISSN 2231-0916. Disponible en: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/23.pdf>

ESCARDINO, A. Instrucciones viales de conservación (bacterias y levaduras). Colección Española de Cultivos Tipo [En línea], 2016, (España). [Consulta: mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.uv.es/cect2/Instrucciones%20Viales%20bac%20%2338%20lev.pdf>

ESPIN, S. Aislamiento, identificación y características de microorganismos de interés industrial y ambiental para crear un cepario de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (FICA) de la Universidad Internacional SEK. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Internacional SEK, Quito- Ecuador. 2021. pp. 19. [Consulta: 11 de mayo de 2023]. Disponible en:

<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4509/1/Esp%20c3%20adn%20Osorio%20Sami%20Mishell.pdf>

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SAÉZ, J. & VALDEZATE, S. Metodos de identificacion bacteriana en el laboratorio de microbiologia [En línea]. España: Seimc, 2010. [Consulta: abril de 2023]. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

GARCÍA, L. Implementacion de un metodo de conservacion de cepas bacterianas. [En línea]. (Trabajo de titulacion). Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F. 2013. pp. 10. [Consulta: 05 de abril de 2023]. Disponible en:

https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_garcia_lopez.pdf

GUERRERO, J. Utilización de probióticos (*Lactobacillus plantarum*) en la elaboración de una bebida de soya. [En línea] [Trabajo de investigación]. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador. 2011. pp. 62-63. [Consulta: junio de 2023]. Disponible en:

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3269/1/PAL258%20.pdf>

INEN 0013. *Determinacion de la acidez titulable.* [En línea]. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Quito- Ecuador. 1998. [Consulta: 16 de mayo de 2023]. Disponible en:

<https://ia801901.us.archive.org/31/items/ec.nte.0013.1984/ec.nte.0013.1984.pdf>

KAJIKAWA, A., SUZUKI, S. & IGIMI, S. “The impact of motility on the localization of *Lactobacillus agilis* in the murine gastrointestinal tract. *BMC Microbiology*”. [En línea]. 2018, (Tokio) 18(68). [Consulta: 27 de junio de 2023]. Disponible en:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6042280/pdf/12866_2018_Article_1219.pdf

MERCHUK, J. *Microbiologia Industrial.* Whasintong D.C- USA: Street N.W. 2006, pp. 16.

NTE INEN 1 529-5. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.* [En línea]. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Quito- Ecuador. 2006. [Consulta: 16 de mayo de 2023]. Disponible en:

<https://ia902906.us.archive.org/16/items/ec.nte.1529.5.2006/ec.nte.1529.5.2006.pdf>

PACHECO, J. & SERPAS, R. Evaluación de dos métodos de para la conservación de capas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos [En línea] (Trabajo de titulación) Universidad del Salvador.2013. pp. 28-35. [Consulta: marzo de 2023]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5268/1/16103407.pdf>

PARRA, R. “Review lactic acid bacteria: Functional role in the foods “. [En línea], 2010. Vol. 8, no.1, pp. 94. [Consulta: 06 de marzo de 2023]. ISSN 1692-3561. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169235612010000100012#:~:text=Carbohidratos%20fermentables%20y%20alcoholes%20pueden,\(heterofermentativas\)%20%5B4%5D](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169235612010000100012#:~:text=Carbohidratos%20fermentables%20y%20alcoholes%20pueden,(heterofermentativas)%20%5B4%5D).

RAMIREZ, J; MEDINA, Y, & USCANGA, I. Manual de laboratorio de microbiología. [En línea]. Universidad Veracruzana. Veracruz. 2018. pp. 38. [Consulta: 18 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia.pdf>

RAMÍREZ, J., ULLOA, P., VELÁZQUEZ, M., ULLOA, J. & ROMERO, F. “Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud”. [En línea], 2011, (Nayarit), vol. 2, no.7, pp. 1-5. ISSN 2007-0713. [Consulta: 08 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://aramara.uan.mx:8080/bitstream/123456789/436/1/Bacterias%20l%C3%A1cticas%20I%20mportancia%20en%20alimentos%20y%20sus%20efectos%20en%20la%20salud.pdf>

RAMIREZ, C. & VELEZ, J. “Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra”. Scielo [En línea], 2016, (Puebla -México) pp. 115-128. [Consulta: junio de 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v27n6/art12.pdf>

RODRÍGUEZ, M. Aislamiento y selección de cepas del genero lactobacillus con capacidad probiotica e inmunomoduladora. [En línea]. (Trabajo de doctorado). Universidad Autonoma de Barcelona. Barcelona. 2009. pp. 45. [Consulta: 07 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf>

SÁNCHEZ, L. & TROMPS, J. “Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico”. [En línea], 2014 (Cuba) vol. 36, no. 2, pp. 125. [Consulta: 08 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v36n2/rsa08214.pdf>

ULLOA, F. Análisis de los métodos para medir la turbidez de los inóculos y su influencia en el antibiograma de la bacteria *E. coli* en urocultivos. [En línea] [Trabajo de titulación]. Universidad

Técnica de Ambato. Ambato- Ecuador 2015. pp. 24-29. [Consulta: 18 de mayo de 2023].
Disponible en:
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10786/1/TESIS%20FREDDY%20ULLOA.pdf>

VARGAS, J. Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga. [En línea] [Trabajo de titulación]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba- Ecuador 2018. pp. 32. [Consulta: 19 de junio de 2023]. Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8834/1/56T00769.pdf>

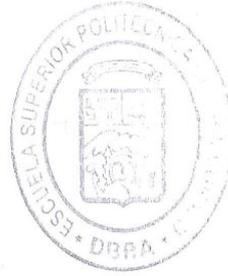
VÁZQUEZ, S. Identificación y caracterización de un aislamiento nativo del género *Lactobacillus* con propiedades probióticas y su potencial uso en la industria láctea. [En línea] [Trabajo de maestría]. Universidad de la Republica. Montevideo – Uruguay. 2014. pp. 88-90. [Consulta: 20 de junio 2023]. Disponible en:
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/9064/1/uy24-17133.pdf>

WATANABE, K., FUJIMOTO, J., TOMII, Y., SASAMOTO, M., MAKINO, H., KUDO, Y. & OKADA, S. “*Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [En línea], 2009, (Tokyo- Japan) pp. 755-759. [Consulta: junio de 2023].
Disponible en:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.004689-0>

WENG, Z., DÍAZ, O. & ÁLVAREZ, I. “Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer?”. *Rev. Cubana Hig Epidemiol* [En línea], 2005, (Cuba) 43(3), pp. 1-3. ISSN 1561-3003. [Consulta: abril de 2023]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v43n3/hie06305.pdf>

ZAMORA, L. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. [En línea] (trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Girona, Girona. 2003. pp. 25-36. [Consulta: 21 de junio de 2023].
Disponible en:
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/TlZr.pdf;jsessionid=88F34D4FF7D50C8B3C4FF178277DCF2D?sequence=4>

ZHENG, Y., LU, Y., WANG, J., YANG, L., PAN, C. & HUANG, Y. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. PLOS ONE [En línea], 2013, (China) 8(7), pp. 1-7. [Consulta: 21 de junio de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0069868&type=print>

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Y. Zheng', written over a faint circular stamp.

ANEXOS

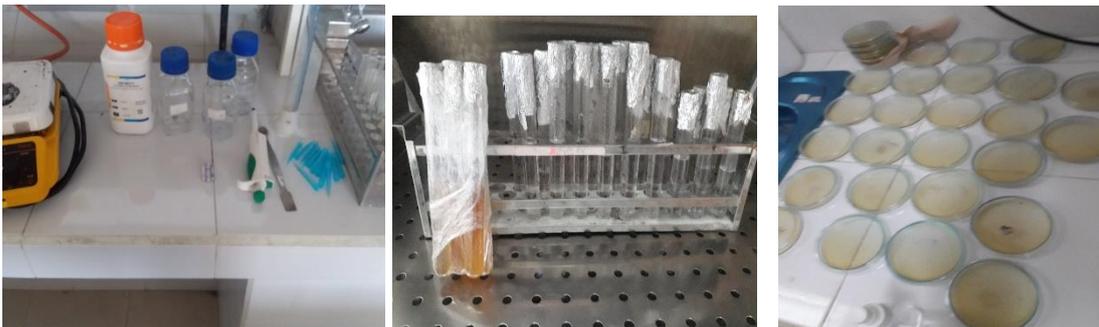
ANEXO A: RECONSTITUCIÓN DE LAS BACTERIAS



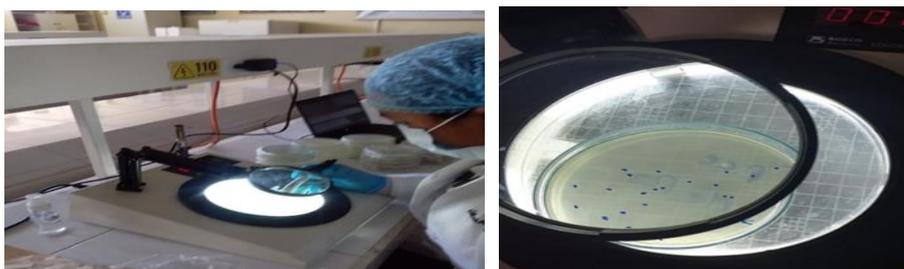
ANEXO B: IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN



ANEXO C: SIEMBRA DESPUÉS DE LA RECONSTITUCIÓN



ANEXO D: CONTEO MICROBIOLÓGICO



ANEXO E: PRUEBAS MORFOLÓGICAS (FORMA, COLOR, TAMAÑO)



ANEXO F: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (TINCIÓN GRAN, CATALASA, OXIDASA, KOH)



ANEXO G: PRUEBA DE MOVILIDAD



ANEXO H: PRUEBA DE ACIDIFICACIÓN



ANEXO I: FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS



ANEXO J: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA FORMA, ACIDEZ Y VIABILIDAD DE LA CEPA *L. AGILIS* EN LOS DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS EMPLEADOS.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

TAMAÑO(MM)

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>Tamaño(mm)</u>	<u>45</u>	<u>0,41</u>	<u>0,13</u>	<u>8,60</u>

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	1,27	14	0,09	1,46	0,1857
Temper.	0,01	2	0,01	0,12	0,8890
Tiempos	0,24	4	0,06	0,96	0,4449
Temper.*Tiempos	1,02	8	0,13	2,05	0,0738

Error	1,86	30	0,06
<u>Total</u>	<u>3,14</u>	<u>44</u>	

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22436

Error: 0,0621 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
16 C	2,92	15	0,06	A
-20 C	2,90	15	0,06	A
<u>4 C</u>	<u>2,88</u>	<u>15</u>	<u>0,06</u>	<u>A</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,34080

Error: 0,0621 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
15	3,04	9	0,08	A
30	2,90	9	0,08	A
90	2,86	9	0,08	A
60	2,85	9	0,08	A
<u>0</u>	<u>2,85</u>	<u>9</u>	<u>0,08</u>	<u>A</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,74991

Error: 0,0621 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
-20 C	15	3,20	3	0,14	A
4 C	30	3,12	3	0,14	A
16 C	0	3,08	3	0,14	A
4 C	15	3,04	3	0,14	A
-20 C	90	2,99	3	0,14	A
16 C	60	2,97	3	0,14	A
4 C	60	2,91	3	0,14	A
-20 C	0	2,89	3	0,14	A
16 C	15	2,88	3	0,14	A
16 C	90	2,85	3	0,14	A
16 C	30	2,81	3	0,14	A
-20 C	30	2,77	3	0,14	A

4 C	90	2,75	3	0,14	A
-20 C	60	2,67	3	0,14	A
<u>4 C</u>	<u>0</u>	<u>2,56</u>	<u>3</u>	<u>0,14</u>	<u>A</u>

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

ACIDEZ

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>acidez</u>	<u>45</u>	<u>0,99</u>	<u>0,99</u>	<u>3,18</u>

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	0,05	14	3,2E-03	215,02	<0,0001
Temper.	1,3E-04	2	6,3E-05	4,19	0,0249
Tiempos	0,04	4	0,01	733,82	<0,0001
Temper.*Tiempos	1,0E-03	8	1,3E-04	8,32	<0,0001
Error	4,5E-04	30	1,5E-05		
<u>Total</u>	<u>0,05</u>	<u>44</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00350

Error: 0,0000 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
4 C	0,12	15	1,0E-03	A
-20 C	0,12	15	1,0E-03	A B
<u>16 C</u>	<u>0,12</u>	<u>15</u>	<u>1,0E-03</u>	<u>B</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00532

Error: 0,0000 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
0	0,17	9	1,3E-03	A
15	0,15	9	1,3E-03	B
60	0,10	9	1,3E-03	C
30	0,10	9	1,3E-03	C
<u>90</u>	<u>0,09</u>	<u>9</u>	<u>1,3E-03</u>	<u>C</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01170

Error: 0,0000 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
4 C	0	0,17	3	2,2E-03	A
16 C	0	0,17	3	2,2E-03	A
-20 C	0	0,17	3	2,2E-03	A
4 C	15	0,16	3	2,2E-03	A
-20 C	15	0,16	3	2,2E-03	A
16 C	15	0,14	3	2,2E-03	B
4 C	60	0,10	3	2,2E-03	C
16 C	30	0,10	3	2,2E-03	C
-20 C	90	0,10	3	2,2E-03	C
-20 C	60	0,10	3	2,2E-03	C
-20 C	30	0,10	3	2,2E-03	C
16 C	60	0,10	3	2,2E-03	C
16 C	90	0,09	3	2,2E-03	C
4 C	30	0,09	3	2,2E-03	C
<u>4 C</u>	<u>90</u>	<u>0,09</u>	<u>3</u>	<u>2,2E-03</u>	<u>C</u>

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

UFC/g

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/G	45	0,98	0,97	9,16

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	1495521244444,44	14	106822946031,75	90,97	<0,0001
Temper.	857527111111,11	2	42876355555,56	36,51	<0,0001
Tiempos	1405246577777,78	4	351311644444,45	299,19	<0,0001
Temper.*Tiempos	4521955555,56	8	565244444,44	0,48	0,8596
Error	35226666666,67	30	1174222222,22		
<u>Total</u>	<u>1530747911111,11</u>	<u>44</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=30846,73698

Error: 1174222222,2222 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
-20 C	419333,33	15	8847,68	A
4 C	387733,33	15	8847,68	B
<u>16 C</u>	<u>315066,67</u>	<u>15</u>	<u>8847,68</u>	<u>C</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=46855,21283

Error: 1174222222,2222 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
0	575111,11	9	11422,31	A
15	564000,00	9	11422,31	A
30	378222,22	9	11422,31	B
60	204000,00	9	11422,31	C
<u>90</u>	<u>148888,89</u>	<u>9</u>	<u>11422,31</u>	<u>D</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=103102,23410

Error: 1174222222,2222 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
-20 C	15	629333,33	3	19784,02	A
-20 C	0	611333,33	3	19784,02	A B
4 C	0	593333,33	3	19784,02	A B C
4 C	15	568666,67	3	19784,02	A B C
16 C	0	520666,67	3	19784,02	B C D
16 C	15	494000,00	3	19784,02	C D E
-20 C	30	423333,33	3	19784,02	D E
4 C	30	406666,67	3	19784,02	E F
16 C	30	304666,67	3	19784,02	F G
-20 C	60	242000,00	3	19784,02	G H
4 C	60	214666,67	3	19784,02	G H
-20 C	90	190666,67	3	19784,02	H I
16 C	60	155333,33	3	19784,02	H I
4 C	90	155333,33	3	19784,02	H I
<u>16 C</u>	<u>90</u>	<u>100666,67</u>	<u>3</u>	<u>19784,02</u>	<u>I</u>

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

ANEXO K: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA FORMA, ACIDEZ Y VIABILIDAD DE LA CEPA *L. RAPI* EN LOS DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS EMPLEADOS.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

TAMAÑO (MM)

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>tamaño(mm)</u>	<u>45</u>	<u>0,52</u>	<u>0,30</u>	<u>7,64</u>

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	1,49	14	0,11	2,34	0,0250
Temper.	0,07	2	0,03	0,76	0,4774
Tiempos	0,48	4	0,12	2,66	0,0516
Temper.*Tiempos	0,94	8	0,12	2,57	0,0290
Error	1,37	30	0,05		
<u>Total</u>	<u>2,85</u>	<u>44</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19203

Error: 0,0455 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
16 C	2,84	15	0,06	A
4 C	2,78	15	0,06	A
<u>-20 C</u>	<u>2,75</u>	<u>15</u>	<u>0,06</u>	<u>A</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29169

Error: 0,0455 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
60	2,91	9	0,07	A
30	2,86	9	0,07	A
90	2,84	9	0,07	A
15	2,71	9	0,07	A
<u>0</u>	<u>2,63</u>	<u>9</u>	<u>0,07</u>	<u>A</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64185

Error: 0,0455 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
16 C	60	3,22	3	0,12	A
16 C	30	3,02	3	0,12	A B
4 C	90	2,94	3	0,12	A B
4 C	15	2,93	3	0,12	A B
-20 C	60	2,88	3	0,12	A B
-20 C	30	2,86	3	0,12	A B
16 C	90	2,85	3	0,12	A B
-20 C	90	2,73	3	0,12	A B
4 C	0	2,73	3	0,12	A B
4 C	30	2,70	3	0,12	A B
4 C	60	2,63	3	0,12	A B
-20 C	15	2,63	3	0,12	A B
-20 C	0	2,62	3	0,12	A B
16 C	15	2,58	3	0,12	B
<u>16 C</u>	<u>0</u>	<u>2,54</u>	<u>3</u>	<u>0,12</u>	<u>B</u>

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

ACIDEZ

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Ai</u>	<u>CV</u>
<u>acidez</u>	<u>45</u>	<u>0,83</u>	<u>0,74</u>	<u>10,11</u>

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	0,02	14	1,3E-03	10,14	<0,0001
Temper.	1,5E-03	2	7,6E-04	5,74	0,0077
Tiempos	0,02	4	3,8E-03	28,82	<0,0001
Temper.*Tiempos	2,0E-03	8	2,5E-04	1,89	0,0982
Error	4,0E-03	30	1,3E-04		
<u>Total</u>	<u>0,02</u>	<u>44</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01037

Error: 0,0001 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
4 C	0,12	15	3,0E-03	A
-20 C	0,11	15	3,0E-03	A B
<u>16 C</u>	<u>0,11</u>	<u>15</u>	<u>3,0E-03</u>	<u>B</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01576

Error: 0,0001 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
15	0,14	9	3,8E-03	A
0	0,13	9	3,8E-03	A
60	0,10	9	3,8E-03	B
30	0,10	9	3,8E-03	B
<u>90</u>	<u>0,09</u>	<u>9</u>	<u>3,8E-03</u>	<u>B</u>

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03467

Error: 0,0001 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
4 C	15	0,15	3	0,01	A
-20 C	15	0,14	3	0,01	A
-20 C	0	0,14	3	0,01	A
16 C	15	0,14	3	0,01	A
4 C	0	0,13	3	0,01	A B
4 C	60	0,12	3	0,01	A B C
4 C	30	0,12	3	0,01	A B C
16 C	0	0,12	3	0,01	A B C
16 C	60	0,10	3	0,01	B C
-20 C	30	0,10	3	0,01	C
-20 C	60	0,09	3	0,01	C
16 C	90	0,09	3	0,01	C
-20 C	90	0,09	3	0,01	C
16 C	30	0,09	3	0,01	C
<u>4 C</u>	<u>90</u>	<u>0,09</u>	<u>3</u>	<u>0,01</u>	<u>C</u>

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

UFC/g

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>UFC/g</u>	45	0,91	0,87	9,69

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	678231111111,11	14	48445079365,08	21,78	<0,0001
Temper.	335287644444,45	2	167643822222,22	75,36	<0,0001
Tiempos	280554666666,67	4	70138666666,67	31,53	<0,0001
Temper.*Tiempos	62388800000,00	8	7798600000,00	3,51	0,0057
Error	66736871111,33	30	2224562370,38		
<u>Total</u>	<u>744967982222,45</u>	<u>44</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=42457,69140

Error: 2224562370,3778 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
-20 C	600533,33	15	12178,02	A
4 C	468666,67	15	12178,02	B
16 C	391466,67	15	12178,02	C

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=64491,88348

Error: 2224562370,3778 gl: 30

<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
0	580888,89	9	15721,76	A
15	556888,89	9	15721,76	A B
30	495333,33	9	15721,76	B C
60	436000,00	9	15721,76	C
90	365333,33	9	15721,76	D

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=141910,72596

Error: 2224562370,3778 gl: 30

<u>Temper.</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
-20 C	0	698666,67	3	27230,88	A

-20 C	15	600666,67	3	27230,88	A	B
-20 C	30	576000,00	3	27230,88	A	B
-20 C	60	574000,00	3	27230,88	A	B
-20 C	90	553333,33	3	27230,88	B	C
4 C	15	552000,00	3	27230,88	B	C
4 C	0	546000,00	3	27230,88	B	C
16 C	15	518000,00	3	27230,88	B	C
4 C	30	498000,00	3	27230,88	B	C
16 C	0	498000,00	3	27230,88	B	C
4 C	60	414000,00	3	27230,88	C	D
16 C	30	412000,00	3	27230,88	C	D
4 C	90	333333,33	3	27230,88	D	E
16 C	60	320000,00	3	27230,88	D	E
<u>16 C</u>	<u>90</u>	<u>209333,33</u>	<u>3</u>	<u>27230,88</u>		<u>E</u>

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



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: 05 / 10 / 2023

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



1724-DBRA-UTP-2023