



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

EFEECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO CASHCA
TOTORAS

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para aportar el grado académico de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

AUTORA:

JANNIS CORALÍA GARZÓN PROAÑO

Riobamba- Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

EFEECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO CASHCA
TOTORAS

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para aportar el grado académico de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

AUTORA: JANNIS CORALÍA GARZÓN PROAÑO

DIRECTOR: Ing. CESAR IVÁN FLORES MANCHENO

Riobamba- Ecuador

2022

© 2022, **Jannis Coralía Garzón Proaño**

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, Jannis Coralía Garzón Proaño, 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, 09 de agosto del 2022.

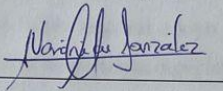
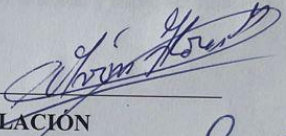
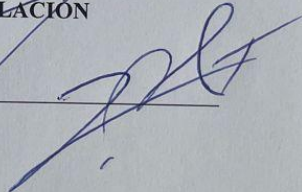
JANNIS CORALÍA GARZÓN PROAÑO

CI: 1004205363

5

ESCUELA SUPERIRO POLITECNICA DE CHIBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación: Tipo: Trabajo Experimental, “EFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL SUELO DE BOSQUE PRIMARIO CASHCA TOTORAS”, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|--|---|-------------------|
| BqF. María Verónica González Cabrera PRESIDENTA DEL TRIBUNAL |  | <u>2022/08/09</u> |
| Ing. Cesar Iván Flores Mancheno Ph. D DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN |  | <u>2022/08/09</u> |
| Ing. Iván Patricio Salgado Tello M.C.S MIEMBRO DE TRIBUNAL |  | <u>2022/08/09</u> |

DEDICATORIA

“La motivación es el empuje al éxito; el éxito es la plenitud de la vida; la vida no sería vida si no hubiera la familia”. Llena de regocijo, de amor y esperanza, dedico este trabajo de titulación, a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mi mayor pilar para seguir adelante, quienes impulsan mi vida, me apoyan constantemente en mis éxitos personales y luchan a cada momento por mí, enseñándome el camino justo de la vida. A mi madre quien con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades y de ser mi ejemplo a seguir. A mi hermana y a mis sobrinos por todo su cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento por no dejarme caer e impulsarme para salir adelante. Finalmente, a mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

Jannis

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes. A la facultad de Ciencias Pecuarias - Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias y a sus docentes que formaron parte de mi formación profesional, al director del trabajo de titulación el Ing. Iván Flores junto al asesor Ing. Iván Salgado por su gran ayuda, por guiarme con sus conocimientos durante el proceso de realización del trabajo. También le doy las gracias a mis amigos de clase que me acompañaron durante el trayecto de mi carrera aprendiendo uno de los otros y apoyándonos por metas y objetivos comunes. A todas las personas que con sus consejos y enseñanzas cooperaron para que no me rindiera en el cumplimiento de mis metas y sueños.

Jannis

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| INDICE DE TABLAS..... | x |
| INDICE DE ANEXOS | xi |
| RESUMEN | xi |
| ABSTRACT..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| INTRODUCCIÓN | 1 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|-----------|
| 1. MARCO TEORICO REFERENCIAL | 3 |
| 1.1. Antecedentes y características generales | 3 |
| 1.2. Antagonismo | 3 |
| <i>1.2.1. Antagonismo bacteriano de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)</i> | <i>5</i> |
| <i>1.2.2. Antibiograma</i> | <i>5</i> |
| 1.3. Sustrato | 7 |
| <i>1.3.1. Definición física y sus propiedades</i> | <i>7</i> |
| <i>1.3.2. Composición de la leche</i> | <i>8</i> |
| 1.4. Bacterias ácido-lácticas | 9 |
| <i>1.4.1. Características generales de las bacterias ácido- lácticas</i> | <i>10</i> |
| <i>1.4.2. Lactilactobacillus parakefiri</i> | <i>11</i> |
| <i>1.4.2.1. Taxonomía</i> | <i>11</i> |
| <i>1.4.2.2. Características Bioquímicas</i> | <i>11</i> |
| <i>1.4.3. Lactobacillus malefermentans</i> | <i>12</i> |
| <i>1.4.3.1. Caracteres fisiológicos</i> | <i>12</i> |
| <i>1.4.3.2. Características Bioquímicas</i> | <i>12</i> |
| <i>1.4.4. Cultivos iniciadores</i> | <i>13</i> |
| 1.5. Aislamiento de microorganismos | 14 |
| <i>1.5.1. Obtención de cultivos puros</i> | <i>15</i> |
| <i>1.5.2. Técnicas de aislamiento</i> | <i>15</i> |
| 1.6. Inhibición frente a patógenos de importancia en alimentos..... | 16 |
| <i>1.6.1. Salmonella spp.....</i> | <i>17</i> |
| <i>1.6.2. Estafilococo aureus</i> | <i>17</i> |
| <i>1.6.3. Listeria monocytogenes</i> | <i>18</i> |

CAPÍTULO II

| | | |
|---------------|---|----|
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 19 |
| 2.1. | Localización y duración del experimento | 19 |
| 2.2. | Condiciones meteorológicas | 19 |
| 2.3. | Unidades experimentales | 19 |
| 2.4. | Materiales, Equipos e Insumos | 19 |
| 2.4.1. | <i>Materiales</i> | 19 |
| 2.4.2. | <i>Equipos</i> | 20 |
| 2.4.3. | <i>Insumos</i> | 21 |
| 2.5. | Tratamiento y diseño experimental | 21 |
| 2.5.1. | <i>Esquema del experimento</i> | 21 |
| 2.5.2. | <i>Análisis estadístico y prueba de significancia</i> | 22 |
| 2.5.3. | Procedimiento experimental | 22 |
| 2.5.4. | <i>Patógenos</i> | 23 |
| 2.5.4.1. | Aislamiento de patógenos y cultivo de patógenos | 23 |
| 2.5.4.1.1. | <i>Salmonella spp</i> | 23 |
| 2.5.4.1.2. | <i>Estafilococo aureus</i> | 23 |
| 2.5.4.1.3. | <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 2.5.5. | <i>Bacterias ácido- lácticas (BAL)</i> | 24 |
| 2.5.5.1. | Reactivación y cultivo de bacterias ácido- lácticas (BAL) | 24 |
| 2.5.6. | <i>Antagonismo microbiano</i> | 24 |
| 2.5.6.1. | Siembra de (BAL) + Patógeno + Sustrato de leche entera..... | 24 |
| 2.5.6.2. | Evaluación del antagonismo con recuento microbiano | 24 |
| 2.6. | Análisis físico- químicos al sustrato (leche entera) | 24 |
| 2.6.1. | <i>Acidez titulable</i> | 24 |
| 2.6.1.1. | Principio..... | 24 |
| 2.6.2. | <i>pH INEN 701:2009</i> | 25 |
| 2.6.2.1. | Preparación de la muestra..... | 25 |
| 2.6.3. | <i>Grasa INEN – ISO 2446</i> | 25 |
| 2.6.3.1. | Método Gember | 25 |
| 2.6.3.2. | Principio..... | 25 |
| 2.6.4. | <i>Azúcares</i> | 26 |

| | | |
|------------|--------------------------|----|
| 2.6.4.1. | Azucres totales | 26 |
| 2.6.4.2. | Azucres reductores | 26 |
| 2.6.4.2.1. | Procedimiento | 26 |

CAPÍTULO III

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3. | MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 27 |
| 3.1. | Caracterización del sustrato leche entera “VITA” | 27 |
| 3.2. | Efecto antagónico de bacterias ácido-lácticas aisladas de suelo de bosque primario Cashca Totoras | 27 |
| 3.2.1. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias Ácido-lácticas con Salmonella spp.</i> | <i>27</i> |
| 3.2.2. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs Salmonella.</i> | <i>32</i> |
| 3.2.3. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas con Estafilococos aureus</i> | <i>34</i> |
| 3.2.4. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs S. aureus.</i> | <i>38</i> |
| 3.2.5. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas con Listeria monocytogenes.</i> | <i>41</i> |
| 3.2.6. | <i>Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs Listeria monocytogenes.</i> | <i>44</i> |
| | CONCLUSIONES..... | 48 |
| | RECOMENDACIONES..... | 49 |
| | BIBLIOGRAFIA | |
| | ANEXOS | |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabla 1-1: | Requisitos microbiológicos de la leche fresca de vaca. | 7 |
| Tabla 2-1: | Requisitos físicos y químicos de la leche fresca de vaca. | 7 |
| Tabla 3-1: | Composición química de la leche, evaporada y concentrada azucarada (g/100 g). | 8 |
| Tabla 4-1: | Composición típica de la leche cruda de vaca. | 9 |
| Tabla 5-1: | Taxonomía de la bacteria ácido-láctica <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 11 |
| Tabla 6-1: | Principales técnicas de aislamiento de microorganismos. | 16 |
| Tabla 7-2: | Condiciones meteorológicas. | 19 |
| Tabla 8-2: | Esquema experimental. | 21 |
| Tabla 9-2: | Requisitos fisicoquímicos de la leche esterilizada de larga vida. | 25 |
| Tabla 10-3: | Caracterización del sustrato de leche entera “VITA”. | 27 |
| Tabla 11-3: | Norma INEN Leche | 27 |
| Tabla 12-3: | Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo. | 28 |
| Tabla 13-3: | Valoración del crecimiento de la <i>Salmonella</i> spp en diferentes medios de cultivo. | 30 |
| Tabla 14-3: | Efecto antagónico del medio de <i>Lactobacillus malefermentans</i> Vs <i>Salmonella</i> 33 | |
| Tabla 15-3: | Efecto antagónico de cultivo <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> Vs <i>Salmonella</i> spp. 33 | |
| Tabla 16-3: | Efecto antagónico del medio de Cultivo mixto Vs <i>Salmonella</i> spp. | 34 |
| Tabla 17-3: | Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en diferentes medios de cultivo. | 35 |
| Tabla 18-3: | Valoración del crecimiento de las <i>S. aureus</i> en diferentes medios de cultivo. | 37 |
| Tabla 19-3: | Efecto antagónico de <i>Lactobacillus malefermentans</i> Vs <i>Estafilococos aureus</i> . .. | 38 |
| Tabla 20-3: | Efecto antagónico de <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> Vs <i>Estafilococos aureus</i> | 40 |
| Tabla 21-3: | Efecto antagónico del medio de Cultivo mixto Vs <i>Estafilococos aureus</i> | 40 |
| Tabla 22-3: | Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo. | 41 |
| Tabla 23-3: | Valoración del crecimiento de la <i>Listeria monocytogenes</i> en medios de cultivo. | 43 |
| Tabla 24-3: | Efecto antagónico de <i>Lactobacillus malefermentans</i> Vs <i>Listeria monocytogenes</i> | 45 |
| Tabla 25-3: | Efecto antagónico de <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> Vs <i>Listeria monocytogenes</i> | 46 |
| Tabla 26-3: | Efecto antagónico del medio de Cultivo mixto Vs <i>Listeria monocytogenes</i> | 46 |

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PRUEBA DE pH EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).
- ANEXO B:** RESULTADOS DE pH REALIZADOS A LA LECHE VITA (SUSTRATO).
- ANEXO C:** PRUEBA DE ÁCIDEZ TITULABLE EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).
- ANEXO D:** RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ÁCIDEZ TITULABLE DE LA LECHE.
- ANEXO E:** PRUEBA DE GRASA EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).
- ANEXO F:** RESULTADOS DE LA PRUEBA DE GRASA EN LA LECHE VITA.
- ANEXO G:** PRUEBA DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA LECHE VITA.
- ANEXO H:** RESULTADOS DE LA PRUBA DE AÚCARES REDUCTORES.
- ANEXO I:** PRUEBA DE AZÚCARES TOTALES EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).
- ANEXO J:** RESULTADOS DE AZUCARES TOTALES EN LA LECHE (SUSTRATO).
- ANEXO K:** OBTENCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS.
- ANEXO L:** PURIFICACION Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.
- ANEXO M:** REALIZACIÓN DEL ANTAGONISMO DE (*L. malefermentans* Vs *S. spp*).
- ANEXO N:** CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI (*L. Malefermentans* Vs *S. spp*).
- ANEXO O:** ANTAGONISMO DE (*L. Malefermentans* Vs *L. monocytogenes*).
- ANEXO P:** CONTEO DE COLONIAS EN DE (*L. malefermentans* Vs *E. aureus*).
- ANEXO Q:** CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE *L. parakefiri* Vs *S. spp*.
- ANEXO R:** CONTEO DE COLONIAS DE (*L. parakefiri* Vs *L. monocytogenes*).
- ANEXO S:** CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE (*L. parakefiri* Vs *E. aureus*).
- ANEXO T:** RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (Cultivo mixto Vs *Salmonella spp*).
- ANEXO U:** ANTAGONISMO DE (Cultivo mixto Vs *L. monocytogenes*).
- ANEXO V:** RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (Cultivo mixto Vs *E. aureus*).
- ANEXO W:** CUADROS DE ADEVA (MS. LMS, LPS Vs *Salmonella spp*).
- ANEXO X:** CUADROS DE ADEVA (ME. LME, LPE Vs *S. aureus*).
- ANEXO Y:** CUADROS DE ADEVA (ML. LML, LPL Vs *S. aureus*).
- ANEXO Z:** PRUEBA T STUDEN PARA (Bacterias ácido lácticas vs *Salmonella spp*).
- ANEXO AA:** PRUEBA T STUDEN PARA (Bacterias ácido lácticas vs *S. aureus*).
- ANEXO BB:** PRUEBA T STUDEN PARA (Bacterias ácido lácticas vs *L. monocytogenes*).

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antagónico de bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* y el cultivo mixto) aisladas del suelo de Bosque Primario Cashca Totoras frente a agentes patógenos (*Salmonella spp.*, *Estafilococo aureus* y *Listeria monocytogenes*) que fueron aislados de diferentes sustratos alimentarios según las normativas establecidas, y posterior mente se utilizó para el antagonismo microbiano la siembra in vitro con el sustrato de leche entera "VITA", utilizando el 0.9% de sustrato y el 0.1% de bacterias a evaluar, con un medio neutro para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y patógenos, para la recolección de dato se ejecutó mediante la utilización del diseño completamente al azar se determinó la significancia entre los diferentes tratamientos, por medio del método de separación de medias Tukey ($P>0.05$) se establece que la cepa LMS (*Lactobacillus malefermentans*) presenta una inhibición alta frente a la *Salmonella spp* a las 96 hora de evaluación en relación a la cepas LPS (*Lentilactobacillus parakefiri*) y MS (cultivo mixto) que presentaron inhibiciones bajas en el transcurso de tiempo de evaluación, en la capacidad antagónica de las cepas de LPS (*Lentilactobacillus parakefiri*) obtuvo un mejor en inhibición frente al *S. aureus* en comparación a las cepas LME (*Lactobacillus malefermentans*) y ME (cultivo mixto) y en relación al cultivo mixto la cepa de mejor rendimiento fue la ML (cultivo mixto) presentando una mejor inhibición con dependencia a los tratamientos LML (*Lactobacillus malefermentans*) y LPL (*Lentilactobacillus parakefiri*), como consiguiente se concluye que la utilización del tratamiento de cepa *Lactobacillus malefermentans* es apto para la inhibición completa de *Salmonella spp*, por ende se recomienda emplear diferentes sustratos para determinar el efecto antagónico utilizando bacterias benéficas de bosques primarios frente a diferentes patógenos.

Palabras clave: <ANTAGONISMO>, <INHIBICIÓN>, <PATOGENOS>, <BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS>, <AISLADOS>, <SUSTRATOS>, <CEPAS>.


D.B.R.A.J.
Ing. Cristhian Castillo

1813-DBRA-UTP-2022

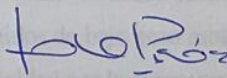


ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antagonistic effect of lactic acid bacteria (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* and the mixed culture) isolated from the soil of Cashca Totoras Primary Forest against pathogenic agents (*Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) that were isolated from different food substrates according to established regulations, and subsequently used for microbial antagonism in vitro seeding with the whole milk substrate "VITA", using 0.9% of substrate and 0.1% of bacteria to be evaluated, with a neutral medium for the growth of lactic acid bacteria and pathogens, for the collection of data was executed by using a completely randomized design, the significance between the different treatments was determined, by means of the Tukey method of separation of means ($P > 0.05$) it is established that the LMS strain (*Lactobacillus malefermentans*) presents a high inhibition against *Salmonella spp* at 96 hours of evaluation in relation to the LPS (*Lentilactobacillus parakefiri*) and MS (mixed culture) strains that presented low inhibitions in the course of evaluation time, in the antagonistic capacity of the LPS strains (*Lentilactobacillus parakefiri*) it obtained a better inhibition against *S. aureus* in comparison to the strains LME (*Lactobacillus malefermentans*) and ME (mixed culture) and related to the mixed culture the strain with the best performance was the ML (mixed culture) presenting a better inhibition depending on the treatments LML (*Lactobacillus malefermentans*) and LPL (*Lentilactobacillus parakefiri*). Therefore, it is concluded that the use of the *Lactobacillus malefermentans* strain treatment is suitable for the complete inhibition of *Salmonella spp*. Therefore, it is recommended to use different substrates to determine the antagonistic effect using beneficial bacteria from primary forests against different pathogens.

Keywords: <ANTAGONISM>, <INHIBITION>, <PATHOGENS>, <ACID-LACTIC BACTERIA>, <ISOLATES>, <SUBSTRATES>, <CEPAS>.

1813-DBRA-UTP-2022



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco
0602698904

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son conocidas por su capacidad como microorganismos probióticos, que pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la producción extracelular de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas, una gran cantidad de las BAL más reconocidas pertenecen al género de los Lactobacillus. Indica Salagata (2018, p.01). que los lactobacilos son bacterias Grampositivas, anaerobias o aerobias, se encuentran en gran cantidad en el tracto gastrointestinal, generalmente se ubican en lugares ricos en carbohidratos y se utilizan como fermentadores de carnes, productos lácteos y alimentos vegetales, además de su uso en biopreservación, para aumentar la vida útil del producto o como un potencial probiótico industrial.

Los estudios realizados con bacterias ácido lácticos han demostrado que producen sustancias con actividad antibacteriana llamadas bacteriocinas y se utilizan en la industria alimentaria para neutralizar los contaminantes de los alimentos, capaces de causar enfermedades en los humanos sin cambiar las propiedades de los alimentos Salagata, (2018, p. 01). El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra.

Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido la importancia de las BAL como microorganismos benéficos en los alimentos y en la salud, mejorando el tracto gastrointestinal de los seres humanos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos, capaces de producir enfermedades, por la estimulación del sistema inmunológico y, por consiguiente, la producción de anticuerpos.

La capacidad antagónica de las BAL, y por ende de los Lactobacillus spp. es atribuida a sus productos metabólicos, ya que al fermentar los hidrocarburos producen una amplia variedad de sustancias con acción antimicrobiana como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Sin embargo, también se puede dar una actividad por la competencia por los nutrientes del ambiente en que se encuentran. Existen muchos mecanismos por los cuales un microorganismo puede presentar una interacción negativa con otros, competencia por espacio, nutrientes, una tasa de crecimiento mayor o incluso una forma más eficaz de captar alimentos. Con respecto a las BAL su actividad antagónica o antimicrobiana ha sido atribuida a la producción y acumulación de los productos de la fermentación como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno.

En el Ecuador las bacterias ácido-lácticas son utilizadas en la industria alimenticia, principalmente como cultivos iniciadores, para la producción de diferentes subproductos derivados de la leche, carne, frutas y hortalizas, ya que estas bacterias producen cambios específicos en sus características organolépticas.

Se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) que presentan espectros de inhibición específicos para algunas bacterias específicas y para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos y patógenos como *Salmonella spp*, *Estafilococo aureus* y *Listeria monocytogenes*. Debido a los métodos de manejo intensivo que se aplican en la actualidad, los animales de granja son muy susceptibles a los desbalances bacterianos entéricos. Estos conllevan a la insuficiente conversión de alimentos y a la disminución de la respuesta zootécnica, gracias a su actividad antagónica.

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antagónico de bacterias Ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* y el cultivo mixto) aisladas del suelo de Bosque Primario Cashca Totoras utilizando el sustrato de leche entera para el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas (BAL) estableciendo la evaluación del efecto antagónico de bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* y el cultivo mixto) aisladas del suelo de Bosque Primario Cashca Totoras, junto a la caracterización del sustrato leche entera utilizado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* y el cultivo mixto), aislando patógenos de diferentes sustratos alimentarios (*Salmonella spp*, *Estafilococo aureus* y *Listeria monocytogenes*) para estudiar el efecto antagónico, y de esta manera identificar el efecto antagónico de bacterias ácido-lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*; *Lactobacillus malefermentans* y el cultivo mixto) frente agentes patógenos como es la *Salmonella spp*, *Estafilococo aureus* y *Listeria monocytogenes*) utilizando el sustrato de leche entera.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes y características generales

El concepto de bacterias lácticas como un grupo de microorganismos surgió a mediados del siglo XIX con la significativa contribución de Louis Pasteur, quien en el año de 1857 demostró que los procesos fermentativos (fermentación láctica, alcohólica o butírica) eran causados por distintos tipos de microorganismos. Posteriormente en 1873, Lister aisló el primer cultivo puro de un microorganismo y lo denominó *Bacterium lactis*. En 1884, Huppe denominó “*Milchsauerbacillus*” a la flora microbiana responsable de la acidificación y coagulación de la leche. Luego a finales del siglo XIX Weigmann propuso el término “*Bacterium acidi lactici*” e introdujo el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de quesos y de leche agria en las industrias alimentarias de las ciudades de Kiel y Storch (Copenhague), lo que representó el comienzo de la era industrial de las fermentaciones como procesos controlados o dirigidos.

1.2. Antagonismo

Precisa Guanochanga (2019, p.03) que el antagonismo microbiano está determinado por la muerte o inhibición de una especie por otra, es decir, dos especies pueden crecer en el mismo ambiente, sin embargo, una de ellas puede dañar a la otra especie. Por lo tanto, el tipo de interacción entre microorganismos se utiliza para el control de patógenos. Los antagonistas deben poder adaptarse a ambientes adversos, controlar una amplia variedad de patógenos, demostrar estabilidad en el ambiente y no deben causar enfermedades en el huésped.

Los mecanismos de antagonismo se deben principalmente a la competencia por los nutrientes y el espacio, la resistencia a las bacterias, la alteración del medio en el que se desarrollan y la neutralización de las enzimas presentes en el organismo intestinal (patógenos). La antibiosis es la capacidad de los microorganismos para producir sustancias que son dañinas para otros organismos. Las principales sustancias producidas para la inhibición son ácidos orgánicos, CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, metilhidiatonina, ácidos grasos y bacteriocinas (Villamil, 2014; citado en Guanochanga, 2019, p.03).

Los ácidos orgánicos reducen el pH del ambiente en el que se encuentran, creando un ambiente que es tóxico (Gram negativo) para las bacterias intestinales. Además, estos ácidos orgánicos entran en las células gramnegativas y provocan la muerte instantánea de estos organismos. (Sánchez, 2015; citado en Guanochanga, 2019, p. 16).

Las bacteriocinas causan muerte de las bacterias patógenas al provocar destrucción de la pared celular o ya sea evitando la síntesis de esta. Indica Guanochanga (2019, p.17) que la producción de estos agentes antimicrobianos permite que especies de microorganismos compitan en ambientes adversos, creando y colonizando ambientes e impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, tienen la capacidad de secretar peróxido de hidrógeno y diacetilo, que funcionan destruyendo las conexiones celulares y evitando que las bacterias causantes de enfermedades utilicen los aminoácidos (arginina).

Los probióticos deben ser capaces de eliminar patógenos de manera competitiva, lo que significa que las bacterias con potencial invasivo deben reducir el crecimiento de otras especies bacterianas creando un ambiente dañino, secretando agentes antimicrobianos y compitiendo por los nutrientes. En los estudios, las cepas probióticas tienen un potencial antagónico significativo, ya que producen compuestos antimicrobianos de amplio espectro, como ácidos orgánicos (acético y láctico) y bacteriocina Guanochanga (2019, p.17). Las bacterias ácido-lácticas (BAL) principalmente los lactobacilos y las bifidobacterias presentan un alto potencial de inhibición contra enterobacterias como *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* etc. por lo mencionado anteriormente (Alvarado y Díaz, 2017; citado en Guanochanga, 2019, p. 18).

La mayoría de las bacterias biopotenciales pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces*). Pertenece al género *Lactobacillus*, que está muy extendido en muchos animales. Sin embargo, en los últimos años, los probióticos que contienen bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* han ganado importancia debido a que pueden desarrollarse como bacterias anaerobias opcionales y debido a que las esporas separadas les permiten resistir condiciones ambientales adversas. Proporciona crecimiento rápido, antagonismo de patógenos y formación de biopelículas en medio líquido (Alvarado y Díaz, 2017; citado en Guanochanga, 2019, p. 18).

1.2.1. Antagonismo bacteriano de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)

Las BAL produce componentes antimicrobianos basados en su función conservadora e inhibe una gran cantidad de microorganismos patógenos y dañinos, debido a que se producen y se convierten en uno de ellos sustancias como los ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y el tiocianato, las bacteriocinas son péptidos o proteínas biológicamente activos que tienen efectos bactericidas sobre receptores celulares específicos y se han estudiado por su actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cerebrum*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otros (Vázquez et al, 2009; citado en Churqui, 2020, p. 23).

La acumulación de ácidos lácticos y otros ácidos orgánicos reduce el pH del medio ambiente al inhibir las bacterias grampositivas y gramnegativas. El ácido láctico penetra fácilmente en la pared celular microbiana y se descompone y libera iones y aniones de hidrógeno, que interrumpen el metabolismo e inhiben la célula. Al crecer en presencia de oxígeno, las BAL producen peróxido de hidrógeno, que produce radicales hidroxilo, lo que provoca la peroxidación lipídica de la membrana y la susceptibilidad de las células microbianas a muchos microorganismos. (Ouwehand, 1998; citado en Churqui, 2020, p. 23).

El dióxido de carbono es el producto final de la fermentación heterogénea y se deriva de la descarboxilación de aminoácidos por BAL, lo que crea un ambiente anaeróbico, baja el pH y destruye la integridad de la pared celular microbiana y se genera diacetilo en el metabolismo intermedio. Parece tener una actividad antimicrobiana de hasta 200 µg/mL para levaduras y bacterias gramnegativas y 300 µg/mL para bacterias grampositivas no lactobacillus. (Ouwehand, 1998; citado en Churqui, 2020, p. 23).

1.2.2. Antibiograma

Alude Churqui (2020, p. 27) que el antibiograma se realiza para determinar la probabilidad de que un antibiótico concreto sea eficaz para detener el crecimiento de las bacterias u hongos que causan una infección, es utilizado cuando tenemos un cultivo positivo; cuando se tiene una infección y se han cultivado y aislado un tipo de bacterias en un cultivo a partir de una muestra obtenida de la zona de la infección; también es realizado cuando la infección no responde al tratamiento.

Se determina la susceptibilidad, que es un término utilizado para describir la condición en la que los microorganismos no pueden crecer en presencia de uno o más medicamentos antimicrobianos. Las pruebas de susceptibilidad determinan la efectividad potencial de un agente antimicrobiano

en el organismo que causa una infección y / o determina si el organismo ha desarrollado resistencia a ciertos antibióticos. Los resultados de esta prueba pueden usarse para predecir el efecto potencial en el paciente. Aunque los virus son microorganismos, la prueba de su resistencia a los medicamentos antivirales se realiza de forma diferente.

Las bacterias y los hongos tienen el potencial de desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos en cualquier momento. Esto significa que los antibióticos que una vez se usaron para inhibir el crecimiento pueden dejar de ser efectivos. Las pruebas de susceptibilidad son una forma de determinar si este es el caso cuando el cultivo es positivo ante la presencia de patógenos. Primero, se debe realizar un cultivo del área infectada en una muestra del sitio donde se sospecha infección para ver si hay bacterias u hongos presentes que puedan estar causando la infección. Durante el proceso de cultivo, los patógenos, si están presentes, son aislados, separados de cualquier otro microorganismo presente, e identificados mediante pruebas bioquímicas, enzimáticas o moleculares (Churqui, 2020, p. 27).

Una vez que se identifican, es posible determinar si se necesita una prueba de susceptibilidad. Cada patógeno se prueba individualmente para determinar la capacidad de los antibióticos para inhibir su crecimiento. Esto se puede medir directamente combinando el patógeno y el agar para observar el efecto del antibiótico sobre el crecimiento bacteriano. El cultivo suele tardar 24-48 horas en obtener resultados. Una vez que se completa el cultivo y se obtiene una muestra pura del microorganismo, la prueba de susceptibilidad puede demorar al menos 24-48 horas adicionales, según el método utilizado. El cultivo de hongos y micobacterias puede llevar de 6 a 8 semanas debido a su lento crecimiento. (Churqui, 2020, p. 38).

El antibiograma tiene cuatro usos principales. Determinar el tratamiento antibiótico correcto para el paciente porque es necesario saber si el organismo responsable de la infección tiene un mecanismo de resistencia a los antibióticos e incluirlo en el tratamiento. Supervisar la confirmación del tratamiento empírico. La aplicación de técnicas de investigación de resistencias es epidemiología. Tiene utilidad diagnóstica ya que el perfil de resistencia puede conducir en algunos casos a la identificación de la bacteria. (Sánchez y Feris, 1998; citados en Churqui, 2020, p. 26).

1.3. Sustrato

Tabla 1-1. Requisitos microbiológicos de la leche fresca de vaca.

| REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS | |
|--|------------------------------|
| Conteo de Células somáticas | Máx. 500 000 Unidades por ml |
| Numeración de microorganismos (mesófilos, aerobios y facultativos viables, por ml) | Máx. 1 000 000 ufc |
| Numeración de Coliformes, por ml | Máx. 1 000 ufc |

Fuente: (INDECOPI, 2015; citados en Valdivia, 2017, p.04)

Tabla 2-1. Requisitos físicos y químicos de la leche fresca de vaca.

| REQUISITOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LA LECHE DE VACA | |
|---|----------------------------|
| Materia Grasa (g/100 g) | Mín. 3,2 |
| Sólidos No Graso (g/100 g) | Mín. 8,2 |
| Sólidos Totales (g/100 g) | Mín. 11,4 |
| Impurezas macroscópicas, expresadas en mg de impurezas por 500 cm ³ de leche | Máx. 0,5 mg (grado 2) |
| Acidez, expresada en g de ácido láctico por 100 g de leche | Mín. 0,14% Máx. 0,18% |
| Densidad a 20 °C (g/cm ³) | Mín. 1,0296 Máx. 1,0340 |
| Índice de Refracción del Suero, 20 °C (Lectura refractométrica 37,5) | Mín. 1,34179 |
| Ceniza Total (g/100 g) | Máx. 0,7 |
| Alcalinidad de la ceniza total ml HCl 0,1 N/100 g | Máx. 0,7 cm ³ |
| Índice Crioscópico | Máx. -0,540 °C |
| Sustancias conservadoras y cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza | Ausencia |
| Prueba de Alcohol (74% v/v Mínimo) | No coagulable |
| Tratamiento que disminuye o modifique sus componentes originales | Ninguno |
| Prueba de la Reductasa con azul de metileno | Mín. 4 h |

Fuente: (INDECOPI, 2015; citados en Valdivia, 2017, p.05).

1.3.1. Definición física y sus propiedades

A continuación, se detalla las características de la leche de acuerdo con Valdivia (2017, p. 06):

a) El olor o aroma

La leche fresca es fácil de detectar, pero debido a que es ácida o contiene coliformes, tiene el olor característico del estiércol de vaca y se le llama "olor a vaca".

b) Sabor

La leche fresca tiene un sabor medio dulce, neutro debido a la lactosa que contiene.

c) Densidad de la leche

Está relacionada con la combinación de sus diferentes componentes: el agua (1,000 g/ml); la grasa (0,931 g/ml); proteína (1,346 g/ml); lactosa (1,666 g/ml) minerales (5,500 g/ml) y sólidos no grasos (S.N.G. =1,616 g/ml).

d) Acidez

La leche cruda tiene una acidez titulable que resulta de la reacción. Uno corresponde a la acidez natural de la leche cruda y el otro corresponde al ácido formado en la leche por la acción de bacterias contaminantes.

e) pH

Es el logaritmo del inverso de la concentración de iones de hidrógeno. Cuando la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-1} a 10^{-7} , corresponde a un pH de 1 a 7 es decir, medio ácido. Si la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-7} a 10^{-14} (pH 7 a 14) el medio será alcalino (el pH =7 es neutro). Dichas variaciones dependen del estado de sanidad de la leche y de los microorganismos responsables de convertir la lactosa en ácido láctico.

Tabla 3-1. Composición química de la leche, evaporada y concentrada azucarada (g/100 g).

| PRODUCTO | HUMEDAD | GRASA | PROTEÍNAS | CARBOHIDRATOS | CENIZAS/ MINERALES |
|----------------------------------|---------|-------|-----------|---------------|-----------------------|
| Leche Entera | 87 | 3,7 | 3,3 | 4,8 | 0,7 |
| Leche evaporadaentera | 73,5 | 8,0 | 6,5 | 9,5 | 1,3 - 1,6 |
| Leche Condensada Azucarada | 27 | 9 | 8 | 55 | 1,8 |

Fuente: (Vélez y Barbosa, 1998; citados en Valdivia, 2017, p.05).

1.3.2. Composición de la leche

Según distintos autores mencionados por Valdivia (2017, p. 06) se puede describir a la composición de la leche como:

Castillo y Chávez (2008; citados en Valdivia, 2017, p. 07), afirman que la leche es un alimento muy complejo y se han encontrado más de 100.000 especies moleculares diferentes. Hay muchos factores que pueden afectar la composición de la leche tal como variaciones de raza, variaciones

de ganado a ganado, grupo de manejo y variaciones de consideraciones de alimentación, variaciones estacionales y variaciones geográficas con todo esto, solo puedes dar la composición aproximada de la leche.

Dubach (2010; citado en Valdivia, 2017, p. 07), señala que la leche está formada por 7/8 de agua y 1/8 de sólidos, que constituyen su parte nutritiva.

Magariños (2010; citado en Valdivia, 2017, p. 08), señala que las propiedades más importantes de la leche son su volatilidad, variabilidad y complejidad. Cuando se trata de variabilidad, desde el punto de vista composicional, podemos hablar de leche en lugar de una sola leche debido a las diferencias naturales entre especies o por región o ubicación de una misma especie.

Tabla 4-1. Composición típica de la leche cruda de vaca.

| CONTENIDO | | | |
|--------------------|------|------|------|
| | (a) | (b) | (c) |
| Nutriente | | | |
| Agua, % | | 86.9 | 87,0 |
| Lactosa, % | 4.6 | 4.9 | 4,8 |
| Grasa, % | 3.5 | 4.0 | 4,0 |
| Proteína, % | 3.25 | 3.5 | 3,5 |
| Sales minerales, % | 0.65 | 0.7 | 0,7 |

Fuente: (Catillos y Chávez,2008; Magariños, 2010; Dubach, 2010 citados en Valdivia, 2017, p. 07).

1.4. Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias del ácido láctico (LAB) son microorganismos que se han utilizado en la industria alimentaria durante décadas para dar a los alimentos las propiedades sensoriales y reológicas deseadas. LAB tiene la capacidad de almacenar productos comestibles para una variedad de metabolitos, incluidas las bacteriocinas. Estos son péptidos derivados de ribosomas que actúan principalmente formando poros en la membrana celular de las bacterias e induciendo la apoptosis. Las bacteriocinas son activas contra una variedad de patógenos y son estables a diferentes valores de pH y temperaturas. Los compuestos de bacteriocinas tienen potencial para aplicarse a la industria alimentaria y se está considerando el uso de bacteriocinas en forma libre. Estas aplicaciones pueden prevenir la contaminación por patógenos. También se han propuesto estrategias para aumentar su actividad, como el tratamiento térmico y la aplicación en forma de liposomas o películas. (Heredia et al., 2017; pp.01-08).

Las colonias son de tamaño mediano a pequeño, convexas, completamente opacas y libres de pigmentación. Sus requerimientos nutricionales son complejos e incluyen carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos que se encuentran en el medio Man Rogosa and Sharpe (MRS) utilizado para el cultivo en laboratorio. (García et al., 2016: pp. 02-03).

Indica García et al., (2016, p.12) que estas bacterias se caracterizan además por:

- a) Débil capacidad biosintética para producir su policonstrucción a varios aminoácidos, nucleobases, vitaminas y ácidos grasos. Su metabolismo carece de la capacidad de sintetizar el hemo de porfirina y carece de citocromos, lo que impide la respiración aeróbica y anaeróbica.
- b) Bacterias microaerobias anaerobias facultativas.
- c) El ciclo de Krebs no está funcionando, obteniendo energía de la fosforilación a nivel de sustrato mientras oxida los carbohidratos.

Alude Moreno (2017, p. 14) menciona que es altamente resistente a los ácidos y puede sobrevivir a un pH inferior a 5. Esto representa una ventaja competitiva sobre otras cepas no resistentes que crecen en medios neutros o básicos porque BAL permite la acidificación citoplasmática y consume menos energía para ajustar el pH interno.

1.4.1. Características generales de las bacterias ácido- lácticas

Según Nagua (2016, p. 10) Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias grampositivas, esporógenas, pigmentadas, negativas a la catalasa y en su mayoría negativas a la reducción de nitratos que crecen en un rango de pH de 4,0 a 4,5. Los anaerobios facultativos o anaerobios microaerobios se clasifican en bacterias ácido homolácticas o bacterias ácido heterolácticas, dependiendo de si el metabolismo es fermentable y el ácido láctico es el único producto fermentado o está asociado a la formación de otros compuestos.

Las bacterias homocigotas del ácido láctico producen ácido láctico como principal producto de la fermentación. Todos estos microorganismos son miembros de varias especies del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Además de las bacterias del ácido láctico, las bacterias del ácido heteroláctico producen dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico y etanol durante la fermentación. (Nagua 2016, p. 10).

Este tipo de fermentación tiene lugar en bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

Las bacterias del ácido láctico son microorganismos autotróficos. En definitiva, las bacterias ácido-lácticas requieren muchos componentes que no pueden sintetizar por sí mismas (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas, vitaminas del grupo B, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, etc.). En medio de cultivo (Nagua,2016, p. 10).

Los altos requerimientos nutricionales (superiores a los humanos) y la cantidad de energía que se obtiene de la fermentación determinan el hábitat natural que favorece el desarrollo de estas bacterias: la leche y sus derivados, los intestinos humanos y animales y las mucosas. Una planta bien dañada y podrida. Explica Nagua (2016, p. 11) que con respecto a las temperaturas en que se desarrollan estos microorganismos, los hay: mesófilos, que crecen entre 25-30°C y termófilos, cuyo rango de temperatura se encuentra entre 40-44°C.

Desde un punto de vista filogenético, se definen los 12 géneros de bacterias del ácido láctico: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Aloicoccus* y *Weissera*. Estos géneros se encuentran taxonómicamente dentro del filo Firmicutes y ordenan las bacterias del ácido láctico en la clase Bacilli (Nagua, 2019, pp. 11-15).

1.4.2. *Lentilactobacillus parakefiri*

Lentilactobacillus parakefiri es una especie del género *Lentilactobacillus* que se aisló por primera vez de los granos de kéfir, de ahí su nombre. Su tipo de cepa es GCL (Takizawa et al., 2017).

1.4.2.1. Taxonomía

Tabla 5-1. Taxonomía de la bacteria ácido-láctica *Lentilactobacillus parakefiri*.

| | |
|---------|------------------|
| Clase | Bacilos |
| Orden | Lactobacillales |
| Familia | Lactobacillaceae |
| Genero | Lactobacillus |

Fuente: (Takizawa et al., 2020).

1.4.2.2. Características Bioquímicas

Obligatoriamente hetero fermentativo (produce ácido L-Lactc y Co2 por hetero fermentación). Leche cuajada, resultados positivos para la hidrólisis de arginina (NH3 DE ARGININA),

fermentación de: L-arabinosa, galactosa, glucosa (con producción de gas), lactosa, maltosa y ribosa. Resultados negativos para catalasa, hidrólisis de esculina, producción de H₂O, oxidasa, fermentación de: amigdalina, celobiosa, esculina, fructosa, gluconato (ácido), manitol, manosa, rafinosa, salicina, sorbitol y sacarosa. Resultados variables para la fermentación de melezitosa y melibiosa (ABIS, 2020, p. 03)

1.4.3. *Lactobacillus malefermentans*

Se ha aislado una nueva especie de *Lactobacillus* hetero fermentativo de la cerveza de fermentación superior en la que aparece como contaminante. El organismo se distingue principalmente por el hecho de que fermenta únicamente glucosa, maltosa e inulina y, en consecuencia, se le ha denominado *L. malefermentans*. (Parker y Walker, 1943, p. 07).

1.4.3.1. Caracteres fisiológicos

Sugiere Russel y Walker (1953, p. 12) las diferentes características fisiológicas que presenta la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus malefermentans*:

- Relación con la temperatura: en la cerveza sin lúpulo el rango óptimo para el crecimiento mide 25-34 °C con una temperatura mínima de 10 °C y una temperatura máxima de 37 °C. Relación con el oxígeno: anaerobio facultativo.
- Relación con el ion hidrógeno concentración: en la cerveza sin lúpulo el valor óptimo de pH es 4,3 con límites 4.1 y 6.9.
- Resistencia al calor: matado por calentamiento durante 15 min. a 60-65 °C en cerveza sin lúpulo.
- Resistencia al antiséptico del lúpulo, marcadamente restringida.

1.4.3.2. Características Bioquímicas

Menciona Russel y Walker (2016, p. 12) las diferentes características bioquímicas que presenta la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus malefermentans* al ser aislado de la cerveza:

- Reducción de nitratos, ninguna.
- Formación de indol, ninguno.
- Licuefacción de gelatina, ninguna.
- Acción sobre la leche de tornasol, sin cambios.

- Hidratos de carbono utilizados.
- En un medio de doble digestión de caseína suplementado con auto lisado de levadura el organismo atacó fuertemente la glucosa, maltosa e inulina, en todos los casos con producción de ácido, pero sin gas recogido en los tubos de Durham.
- Dulcitol fue atacado levemente. La inulina produjo más ácido que la glucosa.
- El organismo no ha afectado a otros carbohidratos.
- Natura del ácido producido a partir de glucosa. El ácido láctico se estimó mediante conversión a acetaldehído después de la desproteización del medio con cobre, sulfato e hidróxido de calcio y, después de una desproteización similar de otra muestra del medio, se estimó el ácido acético después de la destilación en la presencia de ácido sulfúrico.
- La relación molecular de ácido láctico a ácido acético en se encontró que el medio era 100: 38. En un experimento separado, el ácido láctico fue aislado como la sal de zinc por el método de Pederson, Peterson y Fred (1926) y estaba ópticamente inactivo.

1.4.4. Cultivos iniciadores

Manifiesta Nagua (2016, p. 09) que la capacidad acidificante de las LAB es una propiedad técnicamente interesante para la industria alimentaria. De hecho, el concepto de cultivo "iniciador" o iniciador se utiliza en relación con el cultivo puro o mezcla de bacterias del ácido láctico utilizadas en la producción de productos fermentados. Por su maravilloso efecto acidificante. El cultivo "iniciador" siempre ha sido una especie homoláctica, incluyendo especies heterolácticas como la subespecie *Leuconostoc mesenteroides* cuando se requieren componentes de sabor y aroma. Cremoso. Los cultivos iniciadores comúnmente utilizados están compuestos principalmente por especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.

Los cultivos iniciadores generalmente se clasifican según la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias del ácido láctico que los componen, y existen tres tipos: mesófilos, termófilos y mixtos. Los cultivos mesófilos se utilizan en procesos de fermentación con una temperatura óptima de 20-30°C, mientras que los cultivos termófilos se utilizan en un rango de temperatura de 30-50°C (Olivera 2011, p. 07).

Los cultivos mixtos se utilizan en procesos de fermentación que tienen lugar a 30-40 °C. El cultivo iniciador puede ser puro (compuesto por una única cepa), mixto (es decir, una mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definidas) o artesanal (una mezcla no definida de bacterias del ácido láctico naturales). La comercialización de los productos fermentados se puede realizar por liofilización, deshidratación, congelación o en estado líquido (Olivera 2011, p. 07).

1.5. Aislamiento de microorganismos

Indica Leyva et al., (2015, p. 07) que la incapacidad de cultivar bacterias en un hábitat particular fue reemplazada parcialmente por la capacidad de aislar y caracterizar el material genético de la comunidad microbiana que habita ese entorno. Mediante el examen de los genomas de los microorganismos contenidos en la muestra, se puede reconstruir la estructura poblacional de la comunidad. El conjunto de genomas de microorganismos en una determinada muestra o hábitat se denomina metagenómica. Este tipo de investigación comienza con el análisis de ácidos nucleicos e involucra microorganismos que aún no han sido cultivados en condiciones.

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas con otros tipos de microorganismos. Los cultivos de estas mezclas se llaman por ello cultivos mixtos. Sin embargo, el conocimiento de los microorganismos se consigue mediante el estudio de cepas aisladas, cultivadas en el laboratorio en cultivos puros (o axénicos). En ocasiones el estudio molecular conduce a la caracterización de los microorganismos, aún en poblaciones mixtas. Sin embargo, la identificación bacteriana y la caracterización completa solo es posible tras el aislamiento de la bacteria y la obtención de cultivos puros. Por ello el primer problema al estudiar una bacteria es su aislamiento del resto de los microorganismos presentes (en una muestra patológica, de agua, de suelo, de alimentos, etc.). Una vez que se ha logrado el aislamiento es posible obtener la bacteria de interés en cultivo puro (UGR,2018, p.01).

Es la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan. El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de Petri.

Según la UGR (2018, p.01) El procedimiento utilizado es tomar una pequeña muestra en un asa de platino y extenderla sobre la superficie del medio. Las células bacterianas se aíslan y fijan en el medio. Después de la incubación en condiciones apropiadas, cada célula viva produce colonias visibles como resultado de la división celular continua. Cada colonia bacteriana tiene ciertas características en términos de forma, límites, altura, tamaño, consistencia, etc. Los tipos de bacterias presentes en la muestra original se muestran como diferentes tipos de colonias. A partir de colonias bien aisladas, es posible obtener un cultivo puro de cada especie bacteriana presente en la muestra original.

1.5.1. Obtención de cultivos puros

En comparación con las plantas y los animales, la morfología de los microorganismos suele ser demasiado simple para proporcionar una base para una clasificación razonable y una identificación fiable. Así, hasta hace poco, la identificación de microorganismos requería el aislamiento de cultivos puros (o cultivos convencionales definidos), seguido de numerosos fisiológicos y bioquímicos. Los microbiólogos se consideran exitosos debido a su capacidad para cultivar microorganismos. Por lo tanto, cualquier método de identificación de poblaciones microbianas específicas en la naturaleza, sin mejoramiento inmediato, podría ser revolucionario porque puede cambiar las propiedades de los microorganismos y cerrar las brechas metodológicas que aún existen en comparación con la botánica y la zoología. (Leyva et al., 2015: p.10).

Menciona Gallut (2016, p. 13) que un cultivo de un microorganismo en un medio nutritivo, por ejemplo, en tubos inclinados con agar nutritivo. Para ello, se aisló un pequeño número de grupos bacterianos de una sola colonia. Con su ayuda, se trasplanta un nuevo medio, creando vetas muy apretadas. La incubación en condiciones adecuadas asegurará cultivos limpios. Este proceso se puede repetir para cada tipo de colonia. Se obtendrá una colección de cultivos puros aislados que coexisten con la muestra original.

Se recomienda un segundo aislamiento antes de obtener cultivos puros, si todas las colonias de la segunda placa son iguales, puedes usar una de ellas para crear un cultivo puro. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, su pureza puede comprobarse fácilmente mediante tinción de Gram. Mantener cultivos limpios de microorganismos en el laboratorio mediante resiembra masiva (transferencia de un medio a otro), una porción se puede liofilizar para su conservación (Gallut, 2016. p.15).

1.5.2. Técnicas de aislamiento

De acuerdo con Gallut (2016, p.19), Durante el aislamiento se generaron cultivos mixtos y puros. El material aislante puede obtenerse a partir de materiales matriz como agua, aire, partículas de suelo o tejido eucariota, a partir de la separación física de dos o más microorganismos necesarios para obtener cultivos seminales puros. Medio de cultivo puro que consta de una sola cepa de microorganismos.

Existen varios métodos para separar físicamente las células microbianas, siendo quizás el más común la separación celular por difusión en un medio sólido. Introducido hace más de un siglo por Robert Koch, el principio básico de la separación de bacterias por difusión en una placa de

Petri es tomar una colonia bacteriana, inocularla con una nueva placa de Petri y, cuando se divide, se formarán las colonias visibles para los humanos, a simple vista o con un microscopio. Luego, estas colonias se pueden separar entre sí con diferentes instrumentos, como anillos o palillos de dientes, según el tamaño de la colonia. Este proceso está determinado por el paso de aislamiento (células de puntos), el paso de crecimiento (formación de colonias) y el paso de aislamiento real (división de colonias). Otra técnica común es aislar bacterias diluyéndolas hasta su extinción en un medio líquido. Para recuperar algunos taxones, se diseñan cultivos de acuerdo con sus necesidades nutricionales o se les agregan químicos específicos. (Gallut, 2016, p. 19).

Tabla 6-1. Principales técnicas de aislamiento de microorganismos.

| Técnica | Descripción |
|---|---|
| Modificación del medio de cultivo. | Diseñar el vehículo, cambiar la composición, agregar químicos específicos, reducir el contenido orgánico. |
| Dilución por extinción. | Diluir el medio hasta que se aislen las células individuales. |
| Modificación de las condiciones de crecimiento. | Ajuste el tiempo de incubación, la masa del inóculo y las condiciones de aireación. |
| Micromanipulación | El dispositivo utilizado permite la eliminación de filamentos de cianobacterias |

Fuente: Tomado de (Gallut, 2016, p. 12).

1.6. Inhibición frente a patógenos de importancia en alimentos

En la búsqueda de nuevas herramientas para controlar la presencia de patógenos en los alimentos, descubrieron que muchas bacterias del ácido láctico secretan pequeños péptidos antibacterianos llamados bacteriófagos. Además de secretar estas sustancias antibacterianas, las bacterias del ácido láctico tienen la capacidad de inhibir patógenos a través de compuestos como el ácido láctico, el diacetilo y el peróxido de hidrógeno. (Espinoza y Pincay, 2002, p. 16)

La actividad antibacteriana de los ácidos orgánicos consiste en reducir el pH y la forma molecular no disociada, lo que provoca la acidificación del citoplasma, mientras que los ácidos no disociados son lipofílicos y pueden difundirse pasivamente a través de la membrana. Los ácidos no disociados actúan interrumpiendo el gradiente electroquímico de protones o alterando la permeabilidad de la membrana celular, interrumpiendo el sistema de transporte de sustrato. La mayoría de las cepas BAL producen diacetilo por fermentación con ácido cítrico. Compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias gramnegativas al reaccionar con la arginina (Espinoza y Pincay, 2002, p. 24).

El peróxido de hidrógeno es uno de los principales metabolitos producidos por *Lactobacillus* durante su crecimiento y puede ser producido por varios mecanismos. Generalmente se forma por reducción directa de oxígeno en una reacción catalizada por alfa-glicerofosfato oxidasa o lactato oxidasa Espinoza y Pincay (2002, p. 24). La acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio se debe a la falta de catalasa en las bacterias *Lactobacillus*. Esta acumulación puede alcanzar niveles que inhiben el crecimiento de otros microorganismos debido a que el H₂O₂ es un compuesto citotóxico debido a su capacidad para generar radicales hidroxilos oxidantes altamente reactivos, otro efecto de la producción de peróxido de hidrógeno es la alteración de la estructura básica de las proteínas celulares. (Espinoza y Pincay, 2002, p. 28).

1.6.1. Salmonella spp

Son bacterias Gram negativas no esporuladas, anaerobias facultativas, mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 35 – 37 °C y un rango de 5 - 46 °C.

El género *Salmonella* está constituido por dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. Mediante la serotipificación basada en el esquema, de Kauffmann-White, que consiste en la caracterización, por aglutinación de los antígenos somáticos O, de los antígenos flagelares H y del antígeno capsular Vi, se han descrito más de 2.400 serotipos. Desde el punto de vista epidemiológico *Salmonella* spp. se puede clasificar en tres grupos:

- a) Las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- b) Las que infectan sólo al hombre: *Salmonella* Tipi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Paratyphi C y que se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.
- c) Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: *S. Abortuseis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves (ISP, 2016, p. 3)

1.6.2. Estafilococo aureus

Se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También *S. aureus*

es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (Sánchez, 2017, p. 7).

S. epidermidis es un miembro de la flora normal de la piel, pero exagera las infecciones de la piel y los anexos, invade cuerpos extraños y es una causa de infección profunda en huéspedes inmunocomprometidos Sánchez (2017, p. 9). Hasta hace poco, los representantes de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* dieron positivo para catalasa.

Junto con los géneros *Planococcus* y *Stomacoccus*, pertenecen a la familia *Micrococaceae*. Los estudios genéticos han demostrado que *Staphylococcus* y *Micrococcus* no están relacionados. El género *Staphylococcus* se incluye temporalmente en la familia *Bacillus* junto con otros géneros como *Bacillus*, *Gamela*, *Listeria* y *Planococcus*. Los estafilococos son cocos grampositivos, catalasa positivos y el di aminoácido del peptidoglucano es la L-lisina. Hay alrededor de 30 especies de estafilococos, las más importantes son: *S. Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus epidermidis* (Sánchez, 2017, p. 12).

1.6.3. Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes fue aislada por primera vez por E.G.D. Murray et al. Durante una epidemia animal en 1926, principalmente cobayas y conejos. Originalmente llamada mononucleosis bacteriana debido a un aumento de monocitos en la sangre de los animales infectados, más tarde se denominó *Listeria hepatolytica* en honor a Joseph Lister, pionero en el campo de la esterilización, y finalmente en 1940 se denominó *Listeria monocytogenes*. La principal vía de transmisión es a través del consumo de alimentos contaminados, aunque también se han dado casos de transmisión directa de animal a humano y de humano a humano.

Listeria monocytogenes es una bacteria anaeróbica grampositiva pequeña, no formadora, móvil, que forma regiones hemolíticas estrechas en agar sangre (Rodríguez, 2018, p. 4).

De las seis especies del género *Listeria*: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *L. marthii*, sólo *L. monocytogenes* es patogénica para el hombre (Rodríguez, 2018, p. 8).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

El presente trabajo de Investigación se desarrollará en la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, ubicada en Av. Panamericana Sur km 1 ½ en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador para lo cual se hará uso de las instalaciones de:

- Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias en el Área de Microbiología.

El presente trabajo experimental tendrá una duración de 60 días.

2.2. Condiciones meteorológicas

Tabla 7-2. Condiciones meteorológicas.

| VARIABLES | PROMEDIO |
|----------------------|----------|
| Temperatura (°C) | 13,20 |
| Humedad Relativa (%) | 66,46 |
| Precipitación (mm) | 550,80 |
| Heliofanía (h/luz) | 165,15 |

Fuente: (Estación Agrometeorológica de la F.R.N. DE LA ESPOCH, 2016, p. 4)

2.3. Unidades experimentales

Se realizarán 15 unidades experimentales para la investigación se utilizará 135 mililitros de sustrato empleado y en cada repetición se pondrá 9 ml de sustrato (leche entera), para la muestra en total se utilizará 15 mililitros de muestra especificando que se utilizará 1 mililitro por muestra.

2.4. Materiales, Equipos e Insumos

2.4.1. Materiales

- Guantes.
- Jabón, detergente y desinfectante.

- Mandil.
- Cofia.
- Mascarilla.
- Placas Petri film para los análisis microbiológicos.
- Papel Aluminio
- Cajas Petri.
- Tubos de ensayo.
- Probeta.
- Bureta.
- Puntas.
- Pipeta.
- Mechero.
- Gradillas.
- Tanque de gas.
- Asa para siembra.
- Gember.
- Matraz Erlenmeyer.
- Vasos de precipitación.
- Frascos termo resistentes.
- Libreta de apuntes.
-

2.4.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar.
- Estufas.
- Incubadora.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- Balanzas de precisión.
- ph – metro.
- Micropipeta.
- Cuenta colonias.
- Bortex.
- Brixometro.

2.4.3. Insumos

- Alcohol.
- Agua destilada.
- Agar (SS Agar Salmonella Shigella Agar).
- Caldo (Listeria Half- Fraser Broth Base).
- Agar (BBL MacConkey).
- Agar y Caldo (MRS).
- Agar Nutritivo
- Leche (Vita).
- NaOH.
- Fenolftaleína.
- Solución A y B de Fehling's solución.
- H₂SO₄.
- OH amílico.

2.5. Tratamiento y diseño experimental

Para la presente investigación se va a utilizar un diseño completamente al azar donde se considerará como tratamientos a las Bacterias Ácido Lácticas cada uno con 5 repeticiones.

2.5.1. Esquema del experimento

Tabla 8-2. Esquema experimental.

| Bacterias ácido- Lácticas + Patógeno | Código | Repetición |
|--|--------|------------|
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Salmonella spp</i> | L0S0 | 5 |
| | L1S1 | |
| | L2S2 | |
| | L3S3 | |
| | L4S4 | |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Estafilococo aureus</i> | L0E0 | 5 |
| | L1E1 | |
| | L2E2 | |
| | L3E3 | |
| | L4E4 | |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | L0L0 | 5 |
| | L1L1 | |
| | L2L2 | |

| | | |
|---|-------|---|
| | L3L3 | |
| | L4L4 | |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Salmonella</i> spp | LM0S0 | 5 |
| | LM1S1 | |
| | LM2S2 | |
| | LM3S3 | |
| | LM4S4 | |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Estafilococo aureus</i> | LM0E0 | 5 |
| | LM1E1 | |
| | LM2E2 | |
| | LM3E3 | |
| | LM4E4 | |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | LM0L0 | 5 |
| | LM1L1 | |
| | LM2L2 | |
| | LM3L3 | |
| | LM4L4 | |
| <i>Cultivo Mixto</i> + <i>Salmonella</i> spp | CM0S0 | 5 |
| | CM1S1 | |
| | CM2S2 | |
| | CM3S3 | |
| | CM4S4 | |
| <i>Cultivo Mixto</i> + <i>Estafilococo aureus</i> | CM0E0 | 5 |
| | CM1E1 | |
| | CM2E2 | |
| | CM3E3 | |
| | CM4E4 | |
| <i>Cultivo Mixto</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | CM0L0 | 5 |
| | CM1L1 | |
| | CM2L2 | |
| | CM3L3 | |
| | CM4L4 | |

Realizado por: Garzón, Jannis, 2021.

2.5.2. Análisis estadístico y prueba de significancia

Para la estimación de las diferentes variables de la presente investigación los resultados experimentales serán analizados mediante las siguientes pruebas estadísticas:

- Análisis de varianza (ADEVA) para las diferencias;
- Separación de medias mediante la prueba de Tukey con ($p < 0,05$) de significancia.

2.5.3. Procedimiento experimental

2.5.4. Patógenos

2.5.4.1. Aislamiento de patógenos y cultivo de patógenos

2.5.4.1.1. *Salmonella spp*

Según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529 (2013, p. 7), menciona que:

Cuando el tiempo de incubación del medio de tetrasulfato de selenita alcance las 18 a 24 h, tape e inocule los anillos de cultivo en tiras sobre la superficie seca de la placa de agar Salmonella-Shigella (SS) para permitir la recolección de colonias aisladas (primera subimplantación). Agar Salmonella-Shigella. Las colonias de Salmonella más comunes son lechosas o transparentes, incoloras o crema, con o sin centro negro.

2.5.4.1.2. *Estafilococo aureus*

Para la determinación de Staphylococcus aureus en productos lácteos. Incube a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$; si no hay colonias de color rojo púrpura o solo las hay, la prueba está completa; no se necesita disco. Todas las colonias de color rojo púrpura se contaron como S. aureus. - Si aparecen colonias de un color diferente al rojo púrpura, reemplace la placa e incube nuevamente a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 3 horas. Cuento las áreas rosadas como Staphylococcus aureus (AOAC, 2013; citado en Cuellar, 2015).

2.5.4.1.3. *Listeria monocytogenes*

Según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN – ISO 11290 (2018, p. 6), menciona que:

Verificación cualitativa: Agregue los aditivos deseados al caldo Fraser de concentración media que ha sido inoculado con muestras de alimentos e incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Tomar 0,1 mL de muestra y agregar a tubos que contengan 10 mL de caldo Fraser completo, incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

2.5.5. Bacterias ácido- lácticas (BAL)

2.5.5.1. Reactivación y cultivo de bacterias ácido- lácticas (BAL)

Las muestras se tomaron del suelo de bosque primario Cashca Totoras y posteriormente enriquecidas en caldo MRS, sembrar la superficie de la placa por aislamiento en estría, dilución 10^{-6} Incubar las placas en posición invertida, en condiciones microaerófilas a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $72 \pm 3\text{h}$ (Castillo y Chávez, 2008; citados en Valdivia, 2017, p. 15).

2.5.6. Antagonismo microbiano

2.5.6.1. Siembra de (BAL) + Patógeno + Sustrato de leche entera

- En un tubo con 9 ml de Sustrato de leche entera siembre 1 ml de (BAL).
- Mezcle rápido y vacíe en una caja de Petri con agar nutritivo, deje solidificar.
- Enseguida siembre en el centro de la placa una estría recta de los patógenos
- Incube a 37°C por 24 hrs (Churqui, 2020, p. 27) (Seimc,20211.p.22).

2.5.6.2. Evaluación del antagonismo con recuento microbiano

- Pasadas las 24, 48, 72, 96 hrs evaluar cuál de los dos microorganismos tiene un crecimiento (Ramírez, 2017, p. 04) (NTE INEN 1 529-5, 2016, p. 6).

2.6. Análisis físico- químicos al sustrato (leche entera)

2.6.1. Acidez titulable

2.6.1.1. Principio

Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN 13 (1983, p. 2), señala que:

La acidez titulable de la leche se la puede expresar formalmente como la cantidad de ácido láctico y determinada mediante procedimientos normalizados. Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador.

2.6.2. pH INEN 701:2009

2.6.2.1. Preparación de la muestra

Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización menciona que:

- La muestra de leche debe tener una temperatura inicial de 20°C
- Colocar 50ml de leche en un vaso de precipitación.
- Utilizar el pH-metro para detectar la cantidad de pH de la leche

Tabla 9-2. Requisitos fisicoquímicos de la leche esterilizada de larga vida.

| Muestra | Unidades | Leche entera | | Semi Descremada | | Descremada | |
|-----------|----------|--------------|-----|-----------------|-----|------------|-----|
| | | Min | Max | Min | Max | Min | Max |
| pH a 20°C | - | 6.4 | 6.8 | 6.4 | 6.8 | 6.4 | 6.8 |

Fuente: (INEN 701, 2009, p. 5)

2.6.3. Grasa INEN – ISO 2446

2.6.3.1. Método Gember

Según NTE INEN – ISO 2446 (2013, p.3), el procedimiento empírico para dar un valor al contenido de grasa, ya sea como una fracción de masa o como una concentración de masa - en función de la capacidad de la pipeta de la leche utilizada - que es el mismo que, o tiene una conocida relación a, el valor obtenido por el método de referencia especificado en la norma ISO 1211

NOTA La fracción de masa se expresa en gramos de grasa por 100 g de leche y la concentración de masa en gramos de grasa por 100 ml de leche.

2.6.3.2. Principio

La grasa de la leche en un butirómetro se separa por centrifugación después de disolver la proteína con ácido sulfúrico, la separación siendo ayudado por la adición de una pequeña cantidad de alcohol iso-amílico. El butirómetro se graduará para dar una lectura directa del contenido de grasa (NTE INEN – ISO 2446, 2013, p.3).

2.6.4. Azúcares

2.6.4.1. Azúcares totales

La medición realizada para azúcares totales se utilizó el Brixómetro utilizando la cantidad de 1 gota como muestra para la determinación de dicha prueba.

2.6.4.2. Azúcares reductores

2.6.4.2.1. Procedimiento

Método de Fehling. Estandarización y cálculo del factor “f” de la solución de Fehling. Los azúcares reductores reducen en medio alcalino los iones cúpricos del Reactivo de Fehling a iones cuproso, los cuales pueden ser determinados por gravimetría o titulación con permanganato de potasio o yodo y tiosulfato de sodio (COVENIN 3219, 1996, p. 2).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS RESULTADOS

3.1. Caracterización del sustrato leche entera “VITA”

En la tabla 10-3, se reporta los resultados de la caracterización del sustrato de la leche entera “VITA”, la misma que presenta un pH de 6.78, grasa 3.0% y azúcares totales de 10.97°Brix. Resultados que se ajustan a las normas INEN 701 (2009, p. 5) y COVENIN 3219 (1996, p. 2) como se observa en Tabla 11- 3, por lo tanto, se puede indicar que el sustrato es aceptable y puede considerarse como un sustrato antagonista microbiano.

Tabla 10-3: Caracterización del sustrato de leche entera “VITA”.

| MUESTRA | pH | Acidez titulable (%) | Grasa (%) | Azúcares Totales (°Brix) | Azúcares Reductores (%) |
|----------|------|----------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|
| Sustrato | 6,78 | 0,174 | 3,0 | 10,97 | 0,775 |

Fuente: (Garzón J. 2022).

Tabla 11-3: Norma INEN Leche

| Muestra | Unidades | Leche entera | | Semi Descremada | | Descremada | |
|---------------------|----------------------|--------------|------|-----------------|-------|------------|-------|
| | | Min | Max | Min | Max | Min | Max |
| pH a 20°C | - | 6.4 | 6.8 | 6.4 | 6.8 | 6.4 | 6.8 |
| Acidez titulable | (%) fracción de masa | 0,13 | 0,18 | 0,13 | 0,18 | 0,13 | 0,18 |
| Grasa | (%) fracción de masa | 3,0 | - | ≥ 1,0 | < 3,0 | - | < 1,0 |
| Azúcares totales | °BRIX | 10 | 20 | 10 | 20 | 20 | 11 |
| Azúcares reductores | % (fracción de masa) | | 1.4 | | 1.4 | | 1.4 |

Fuente: (INEN 701, 2009, p. 5); COVENIN 3219 (1996, p. 2).

3.2. Efecto antagónico de bacterias ácido-lácticas aisladas de suelo de bosque primario Cashca Totoras

3.2.1. Antagonismo microbiano de bacterias Ácido-lácticas con *Salmonella spp.*

En la Tabla 12-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 12-3: Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en diferentes medios de cultivo.

| Periodo | Medio de cultivo | | | Prob. | E.E | C.V |
|-----------|------------------|----------|----------|--------|----------|------|
| | LMS | LPS | MS | | | |
| 24 horas* | 4,98E+07 | 4,92E+07 | 4,96E+07 | 0.9699 | 3,26E+06 | 0,88 |
| 48 horas* | 5,94E+07 | 6,08E+07 | 5,18E+07 | 0.0040 | 1,66E+06 | 0,36 |
| 72 horas* | 1,05E+09 | 1,19E+09 | 1,15E+09 | 0.0619 | 3,65E+07 | 0,35 |
| 96 horas* | 7,28E+08 | 6,89E+08 | 6,20E+08 | 0.3684 | 5,17E+07 | 0,84 |

* Valores ajustados mediante logaritmo natural

LMS: *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella* spp.

LPS: *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella* spp.

MS: Cultivo Mixto Vs *Salmonella* spp.se establece como

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

Fuente: Garzón J. 2022

3.2.1.1. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 24 horas de siembra

A las 24 horas el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella* spp (LMS) el crecimiento fue de 4.98×10^7 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella* spp (LPS) se observó 4.92×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella* spp. (MS) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 4.96×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias lo que concuerda con los resultados obtenidos Diaz et al., (2007a: pp. 37-42) mencionando que el microorganismo tiene la capacidad de elaborar ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares, por lo tanto, se consideran microorganismos homofermentadores, teniendo una viabilidad de 10^6 UFC/ml lo cual se establece como requisito principal para el recuento microbiológico en viabilidad.

3.2.1.2. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 48 horas de siembra

Teniendo relación con los resultados obtenidos en la investigación de Diaz et al., (2007b: pp. 37-42) establece que la viabilidad existente en el medio de crecimiento empleando un producto lácteo no afecta a la bacteria ácido láctica presente por lo cual podemos comparar que al transcurso de las 48 horas el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados registraron diferencias significativas estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias

determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 5.94×10^7 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella spp* (LPS) se observó 6.08×10^7 UFC/ml y al manejar el Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 5.18×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo invierten en el desarrollo de las bacterias presentes en el medio de cultivo.

3.2.1.3. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 72 horas de siembra

Mediante las 72 horas de crecimiento de bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias significativas estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 1.05×10^9 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella spp* (LPS) se observó 1.19×10^9 UFC/ml y al manejar el Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.15×10^9 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 72 horas los medios de cultivo influyen en el desarrollo de las bacterias presentes en el medio de cultivo, por tal manera se puede instaurar que Diaz et al., (2007a: pp. 37-42), indica que para llegar a una viabilidad aceptable alta en el crecimiento microbiano se debe tomar en cuenta diversos parámetros en donde se reporta que el pH aceptable para el crecimiento de bacterias ácido lácticas oscila entre el 3.5 – 4.5 tomando en cuenta la humedad y temperatura a las cuales se muestren expuestas en su crecimiento, dependiendo de las condiciones expuestas las bacterias ácido lácticas darán formación al ácido orgánico (ácido láctico).

3.2.1.4. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 96 horas de siembra

Al transcurrir las 96 horas de la siembra de bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias significativas estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 7.28×10^8 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella spp* (LPS) se observó 6.89×10^8 UFC/ml y al manejar el Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 6.20×10^8 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 96 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias presentes en el medio de cultivo.

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de las bacterias con los diferentes medios de cultivo medidos en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias hasta las 48 horas presenta un ligero incremento de la carga inicial,

pero de 48 a 72 horas existe un desarrollo elevado llegando en el caso del cultivo LPS con una carga de $1,19 \times 10^9$ UFC/ml; y para de estas cantidades reducirse a las 96 horas de siembra En la Tabla 13-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas:

Tabla 13-3: Valoración del crecimiento de la *Salmonella spp* en diferentes medios de cultivo.

| Periodo | MEDIOS DE CULTIVOS | | | Prob. | E.E | CV |
|---------|--------------------|----------|----------|--------|----------|------|
| | LMS | LPS | MS | | | |
| 24* | 1,48E+06 | 1,46E+06 | 1,46E+06 | 0.9571 | 1,23E+05 | 1,3 |
| 48* | 7,60E+05 | 8,00E+05 | 9,60E+05 | 0.6604 | 1,54E+05 | 2,96 |
| 72* | 2,80E+05 | 5,20E+05 | 1,50E+05 | 0.1334 | 1,12E+05 | 5,54 |
| 96* | 0,00E+00 | 3,50E+05 | 1,00E+05 | 0.5100 | 1,66E+05 | 8,53 |

* Valores ajustados mediante logaritmo natural

LMS: *Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp.*

LPS: *Lentilactobacillus parakefiri Vs Salmonella spp.*

MS: Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.*

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.1.5. Crecimiento de *Salmonella spp* a las 24 horas de siembra

En las 24 horas después de la siembra el crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella spp*) por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 1.48×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri Vs Salmonella spp* (LPS) se obtuvo 1.46×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de patógenos fue de 1.46×10^6 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas.

3.2.1.6. Crecimiento de *Salmonella spp* a las 48 horas de siembra

Mientras en las 48 horas después de la siembra el crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella spp*) por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 7.60×10^5 UFC/ml, con

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella spp* (LPS) se obtuvo 8.00×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de patógenos fue de 1.54×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas

3.2.1.7. Crecimiento de *Salmonella spp* a las 72 horas de siembra

Transcurridas las 72 horas después de la siembra el crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella spp*) por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 2.80×10^5 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella spp* (LPS) presento 5.20×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.* (MS) la presencia de patógenos fue de 1.50×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 72 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas.

3.2.1.8. Crecimiento de *Salmonella spp* a las 96 horas de siembra

En el transcurso de las 96 horas el crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella spp*) por efecto de los medios de cultivo utilizados se registraron diferencias significativas estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella spp* (LMS) el crecimiento fue de 0 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella spp* (LPS) se obtuvo 3.50×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.*(MS) la presencia de patógenos fue de 1×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 96 horas los medios de cultivo influyeron en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas, comparando con la investigación de Di Schiav et al., (2015: p.31) la acción antimicrobiana se debe a la alteración del pH en el medio de cultivo, con ácidos orgánicos como el ácido láctico que es formado por las bacterias ácido lácticas por ende la viabilidad de la *Salmonella spp* es baja, teniendo en cuenta la temperatura, nutrientes y humedad en la cual se encuentran expuestos cabe mencionar que el ácido láctico conlleva a una desnaturalización de las proteínas y afecta el funcionamiento de la membrana celular por medio del ion lactato en el ciclo energético de los microorganismos expuestos.

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella spp*) con los diferentes medios de cultivo medidos en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias patógenas hasta las 24 horas presenta un

ligero incremento de la carga inicial, pero de 48 a 72 horas existe una disminución en el caso del cultivo LMS con una carga de 0 UFC/ml

3.2.2. Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs Salmonella.

3.2.2.1. Efecto del cultivo Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp.

Durante los diferentes periodos de evaluación se observó que las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *Salmonella* spp, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas $4,98 \times 10^7$ UFC/ml y de la *Salmonella* $1,48 \times 10^6$ UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de $1,05 \times 10^9$ UFC/ml y $2,80 \times 10^5$ UFC/ml en la *Salmonella* spp registrándose al final del estudio (96 horas) ausencia de bacterias patógenas y una presencia de $7,28 \times 10^8$ UFC/ml de bacterias ácido lácticas (ver Tabla 14-3), resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse hasta desaparecer lo que concuerda con el autor después de haber pasado las 24 horas de crecimiento microbiano Duque et al., (2018: p. 24) manifiesta que los resultados obtenidos de bacterias ácido lácticas asiladas de leche cruda presentaron una actividad nula frente al patógeno *Salmonella* spp, tomando en cuenta que es una bacteria Gran- negativa lo que indica la presencia de bicapas lipídicas inhibitorias, interacciones entre antagonistas como bacterias y microorganismos, sin descartar la actividad inhibitoria de las bacterias ácido lácticas frente a dicho patógeno ya que este puede generar mecanismos alternos como la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, reuterina o mediante mecanismos de exclusión competitiva tomando en cuenta la investigación de Sánchez y Tromps, (2014: p. 6) en donde se menciona que las cepas de bacterias ácido lácticas presentan un antagonismo base frente a la *Salmonella* spp debido a las diferentes alteraciones del comportamiento de las cepas expuestas a experimento donde se reporta a dos factores siendo estos las enzimas proteolíticas, las cuales dan paso a la inhibición de origen proteico; y el segundo factor el cambio y alteración de la cantidad de pH presente en el medio de crecimiento dando de esta manera una inhibición frente a la *Salmonella* spp.

Tabla 14-3: Efecto antagónico del medio de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Salmonella* spp.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lactobacillus</i> | | Prob. |
|--|----------|-----------------------|------------------------|------------|
| | | <i>malefermentans</i> | <i>Salmonella</i> spp. | |
| Lactobacillus malefermentans + Salmonella spp | 24 horas | 4,98E+07 | 1,48E+06 | 9,9319E-05 |
| | 48 horas | 5,94E+07 | 7,60E+05 | 1,1224E-06 |
| | 72 horas | 1,05E+09 | 2,80E+05 | 1,3111E-05 |
| | 96 horas | 7,28E+08 | 0,00E+00 | 0,00015306 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.2.2. Crecimiento bacteriano en el medio de cultivo *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella* spp.

En los diferentes periodos de evaluación se pudo observar (Tabla 15-3), que las bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *Salmonella* spp, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas $4,98 \times 10^7$ UFC/ml y de la *Salmonella* $1,48 \times 10^6$ UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de $1,18 \times 10^9$ UFC/ml y de *Salmonella* spp fue a las 48 horas con un crecimiento de $8,50 \times 10^5$ UFC/ml registrándose al final del estudio (96 horas) una carga de bacterias patógenas de $3,25 \times 10^5$ UFC/ml y una presencia de $6,88 \times 10^8$ UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse su carga microbiana teniendo una inhibición baja frente a las bacterias ácido lácticas por lo cual Di Schiav et al., (2015: p.46), determina que esto se debe a los niveles de concentración de los productos de fermentación formados por las bacterias ácido lácticas, ya que por ejemplo los niveles de producción de ácido láctico depende de la especie e incluso del tipo de cepa a utilizar.

Tabla 15-3: Efecto antagónico del medio de cultivo *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Salmonella* spp.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lentilactobacillus</i> | | Prob. |
|--|----------|---------------------------|------------------------|------------|
| | | <i>parakefiri</i> | <i>Salmonella</i> spp. | |
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Lentilactobacillus parakefiri + Salmonella spp | 24 horas | 4,98E+07 | 1,48E+06 | 0,00144688 |
| | 48 horas | 6,13E+07 | 8,50E+05 | 7,2295E-05 |
| | 72 horas | 1,18E+09 | 5,50E+05 | 9,4776E-06 |
| | 96 horas | 6,88E+08 | 3,25E+05 | 0,0007379 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.2.3. Crecimiento bacteriano en el medio de cultivo mixto Vs *Salmonella* spp.

En los diferentes periodos de evaluación se pudo observar que las bacterias ácido lácticas (*Cultivo mixto*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *Salmonella* spp, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 5.00×10^7 UFC/ml y de la *Salmonella* $1,38 \times 10^6$ UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.14×10^9 UFC/ml y de *Salmonella* spp fue a las 24 horas con un crecimiento de 1.38×10^6 UFC/ml registrándose al final del estudio (96 horas) una carga de bacterias patógenas de 2.50×10^4 UFC/ml y una presencia de 5.91×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas (ver Tabla 16-3) , los resultados mostraron que con el aumento de bacterias ácido lácticas, las bacterias patógenas tendieron a disminuir su carga microbiana estableciendo que los niveles de inhibición mencionados en Makras (citado en Cruz, 2017b: p.9), demuestra que la principal causa de la inhibición de la *Salmonella* spp en un medio sintético depende de la baja de pH a niveles de 5 y 4.5.

Tabla 16-3: Efecto antagónico del medio de Cultivo mixto Vs *Salmonella* spp.

| Medio de cultivo | Periodo | Cultivo mixto | <i>Salmonella</i> spp. | Prob |
|--|----------|---------------|------------------------|------------|
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Cultivo mixto + <i>Salmonella</i> spp | 24 horas | 5,00E+07 | 1,38E+06 | 2,5025E-05 |
| | 48 horas | 5,08E+07 | 8,00E+05 | 2,0855E-05 |
| | 72 horas | 1,14E+09 | 1,25E+05 | 6,1514E-05 |
| | 96 horas | 5,91E+08 | 2,50E+04 | 0,00038728 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.3. Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas con *Estafilococos aureus*

En la Tabla 17-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

3.2.3.1. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 24 horas de siembra

A las 24 horas el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de $4,48 \times 10^7$ UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se obtuvo 3.64×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus* (ME) la presencia de bacterias ácido lácticas

Tabla 17-3: Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en diferentes medios de cultivo.

| Periodo | MEDIO DE CULTIVO | | | Prob. | E.E | CV |
|---------|------------------|----------|----------|----------|----------|------|
| | LME | LPE | ME | | | |
| 24* | 4,48E+07 | 4,48E+07 | 4,16E+07 | 0.3919 | 4,23E+06 | 1,36 |
| 48* | 6,60E+07 | 6,30E+07 | 6,80E+07 | 0.1274 | 1,66E+06 | 0,31 |
| 72* | 1,17E+09 | 6,72E+07 | 1,01E+09 | <0.00001 | 2,93E+07 | 0,33 |
| 96* | 6,80E+08 | 7,15E+08 | 6,20E+08 | 0.3384 | 5,72E+07 | 0,88 |

* Valores asignados mediante logaritmo natural

LME: *Lactobacillus malefermentans* Vs *Estafilococo aureus*.

LPE: *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Estafilococo aureus*.

ME: Cultivo Mixto Vs *Estafilococo aureus*.

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

Fuente: (Garzón J. 2022)

fue de 4.16×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias ácido lácticas.

3.2.3.2. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 48 horas de siembra

En relación con las 48 horas de la siembra el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 6.60×10^7 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 6.30×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus* (ME) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 6.80×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias.

3.2.3.3. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 72 horas de siembra

El crecimiento de las bacterias ácido lácticas a las 72 horas por efecto de los medios de cultivo utilizados registraron diferencias altamente significativas estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 1.17×10^9 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 6.72×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus* (ME) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.01×10^9 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 72 horas los medios de cultivo influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias ácido lácticas.

3.2.3.4. Crecimiento de bacterias ácido-lácticas a las 96 horas de siembra

En las 96 horas realizada la siembra se analizó el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 6.80×10^8 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 7.15×10^8 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus* (ME) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 6.20×10^8 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 96 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de bacterias, las bacterias ácido lácticas producen un conjunto de sustancias antimicrobianas como son los ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxidos de hidrogeno, reuterina y bacteriocinas a las cuales se les das el uso de biopreservadoras evitando la presencia de patógenos en productos alimenticios específicamente en lácteos (Parra, 2010: p. 7).

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de las bacterias ácido lácticas con los diferentes medios de cultivo medidos en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias LME y ME hasta las 48 horas presenta un ligero incremento de la carga inicial, pero de 48 a 72 horas existe un desarrollo elevado llegando en el caso del cultivo LME con una carga de $1,17 \times 10^9$ UFC/ml; y para de estas cantidades reducirse a las 96 horas de siembra a diferencia de la LEP presenta un crecimiento de carga microbiana a las 72 horas de siembra con total de 6.72×10^7 UFC/ml teniendo un crecimiento elevado a las 92 horas con una carga microbiana de 6.20×10^8 UFC/ml.

En la Tabla 18-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 18-3: Valoración del crecimiento de las *S. aureus* en diferentes medios de cultivo.

| PERIODO | LME | LPE | ME | PROB. | E.E | CV |
|---------|----------|----------|----------|--------|----------|------|
| 24* | 1,12E+06 | 1,24E+06 | 1,62E+06 | 0.5140 | 2,58E+05 | 2,9 |
| 48* | 1,80E+06 | 1,94E+06 | 1,44E+06 | 0.0704 | 1,55E+05 | 1,31 |
| 72* | 1,04E+06 | 6,40E+05 | 6,80E+05 | 0.0308 | 8,49E+04 | 2,26 |
| 96* | 5,60E+05 | 4,20E+05 | 5,60E+05 | 0.2655 | 6,98E+04 | 3,55 |

* Valores asignados mediante logaritmo natural

LME: *Lactobacillus malefermentans* Vs *Estafilococo aureus*.

LPE: *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Estafilococo aureus*.

ME: Cultivo Mixto Vs *Estafilococo aureus*.

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.3.5. Crecimiento de *S. aureus* a las 24 horas de siembra

En las 24 horas realizada la siembra se analizó el crecimiento de *S. aureus* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 1.12×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 1.24×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *Salmonella spp.*(ME) la presencia de *S. aureus* fue de 1.62×10^6 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas.

3.2.3.6. Crecimiento de *S. aureus* a las 48 horas de siembra

Al cumplir las 48 horas realizada la siembra se analizó el crecimiento de las *S. aureus* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 1.80×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 1.94×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus*.(ME) la presencia de *S. aureus* fue de 6.20×10^8 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias.

3.2.3.7. Crecimiento de *S. aureus* a las 72 horas de siembra

Transcurridas las 72 horas realizada la siembra se observó el crecimiento de *S. aureus* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), ya que las

medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 1.04×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 6.40×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus*.(ME) la presencia de *S. aureus* fue de 6.80×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas.

3.2.3.8. Crecimiento de *S. aureus* a las 96 horas de siembra

Pasadas las 96 horas de siembra se observó el crecimiento de *S. aureus* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *S. aureus* (LME) el crecimiento fue de 5.60×10^5 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *S. aureus* (LPE) se observó 4.20×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *S. aureus*.(ME) la presencia de *S. aureus* fue de 5.60×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias patógenas, lo que con cuerda con Arlanzón (2018: p. 47), estableciendo que el *S. aureus* emplea una temperatura de crecimiento óptimo a los 30°C con un pH de 4.7 inicial, transcurridas las 48 horas se observó un declive de crecimiento de células viables para lo cual influyó los niveles de pH bajando a 3.5 teniendo una menor cantidad de oxígeno en la parte media e inferior, lo cual acelera la muerte de las bacterias patógenas

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de *S. aureus* con los diferentes medios de cultivo medidos en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias LME y LPE hasta las 48 horas existe un desarrollo elevado llegando en el caso del cultivo LPE con una carga de 1.94×10^6 UFC/ml; y para de estas cantidades reducirse a las 96 horas de siembra a diferencia de la ME presenta un crecimiento de carga microbiana a las 24 horas de siembra con total de 1.62×10^6 UFC/ml.

3.2.4. Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs *S. aureus*.

3.2.4.1. Efecto del cultivo *Lactobacillus malefermentans* Vs *Estafilococos aureus*.

Tabla 19-3: Efecto antagónico del medio de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Estafilococos aureus*.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | <i>Estafilococos aureus</i> | Prob. |
|------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------|
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Lactobacillus | 24 horas | 4,48E+07 | 1,12E+06 | 1,02E-04 |
| malefermentans | + 48 horas | 6,60E+07 | 1,80E+06 | 2,86E-06 |
| <i>S. aureus</i> | 72 horas | 1,17E+09 | 1,04E+06 | 4,11E-06 |
| | 96 horas | 6,80E+08 | 5,60E+05 | 8,88E-05 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

Durante diferentes intervalos de evaluación (ver Tabla 19-3), se observó que las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *S. aureus*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 4.48×10^7 UFC/ml y de la *S. aureus* $1,12 \times 10^6$ UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.17×10^9 UFC/ml y 1.80×10^6 UFC/ml en la *S. aureus* a las 48 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) 5.60×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 6.80×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse hasta desaparecer, por lo cual los resultados concuerdan con Churqui, (2020: p. 42) ya que los microorganismos aislados representan una potencial alternativa para poder inactivar al *S. aureus* en las distintas etapas de tiempos evaluados resultando sensible sobre las bacterias ácido lácticas obteniendo una inhibición alta debido a los compuestos orgánicos formados por las bacterias inhibitorias.

3.2.4.2. Efecto del cultivo *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Estafilococos aureus*.

En los periodos de evaluación (ver Tabla 20-3), se identificó que las bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *S. aureus*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 3.64×10^7 UFC/ml y de la *S. aureus* 1.24×10^6 UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 6.72×10^9 UFC/ml y 1.94×10^6 UFC/ml en la *S. aureus* a las 48 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) 4.20×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 7.15×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse por ende Crespo, (2018: p.22) menciona que estos resultados se atribuyen a que dichos péptidos o bacteriocinas poseen un espectro de acción más bien reducido, preferentemente en contra de bacterias Gram-positivas. Teniendo en cuenta que otros estudios reportados, si bien no presentan amplios resultados de inhibición de estos péptidos frente a microorganismos Gram-negativos, algunas de las cepas de BAL utilizadas han sido efectivas en el control del crecimiento en organismos que presentan dichas características, es decir que algunas bacteriocinas, pueden presentar un espectro más amplio en contra de algunas bacterias.

Tabla 20-3: Efecto antagónico del medio de *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Estafilococos aureus*.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | <i>Estafilococos aureus</i> | Prob. |
|--|----------|--------------------------------------|-----------------------------|----------|
| Lentilactobacillus parakefiri + <i>S. aureus</i> | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| | 24 horas | 3,64E+07 | 1,24E+06 | 2,10E-04 |
| | 48 horas | 6,30E+07 | 1,94E+06 | 1,02E-06 |
| | 72 horas | 6,72E+07 | 6,40E+05 | 1,20E-06 |
| | 96 horas | 7,15E+08 | 4,20E+05 | 1,43E-04 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.4.3. Efecto del cultivo mixto Vs *Estafilococos aureus*

En los periodos de evaluación realizados se determinó la carga correspondiente de las bacterias ácido lácticas (*Cultivo mixto*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *S. aureus*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 4.16×10^7 UFC/ml y de la *S. aureus* 1.62×10^6 UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.01×10^9 UFC/ml y 1.62×10^6 UFC/ml en la *S. aureus* a las 24 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) 5.60×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 8.06×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas (ver Tabla 21-3) del cultivo mixto, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas se reducen los patógenos, la acción de las bacteriocinas está determinada por composición de la membrana citoplasmática, y como lo expresa Monroy (citado en López, 2018: p. 24) las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas se lleva a cabo por la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos; después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica formando poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana.

Tabla 21-3: Efecto antagónico del medio de Cultivo mixto Vs *Estafilococos aureus*.

| Medio de cultivo | Periodo | Cultivo mixto | <i>Estafilococos aureus</i> | Prob. |
|----------------------------------|----------|---------------|-----------------------------|----------|
| Cultivo mixto + <i>S. aureus</i> | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| | 24 horas | 4,16E+07 | 1,62E+06 | 8,26E-04 |
| | 48 horas | 6,80E+07 | 1,44E+06 | 8,41E-07 |
| | 72 horas | 1,01E+09 | 6,80E+05 | 2,67E-06 |
| | 96 horas | 8,06E+08 | 5,60E+05 | 9,05E-05 |

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.5. Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas con *Listeria monocytogenes*.

En la Tabla 22-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 22-3: Valoración del crecimiento de las bacterias ácido lácticas en diferentes medios de cultivo.

| Periodo | LML | LPL | ML | Prob. | E.E | CV |
|---------|----------|----------|----------|--------|----------|------|
| 24* | 4,64E+07 | 4,62E+07 | 5,06E+07 | 0.4251 | 2,73E+06 | 0,74 |
| 48* | 6,98E+07 | 6,04E+07 | 6,48E+07 | 0.0361 | 2,19E+06 | 0,44 |
| 72* | 1,11E+09 | 1,07E+09 | 1,11E+09 | 0.4454 | 2,69E+07 | 0,27 |
| 96* | 8,54E+08 | 8,36E+08 | 8,11E+08 | 0.8192 | 3,84E+07 | 0,51 |

* Valores asignados mediante logaritmo natural

LML: *Lactobacillus malefermentans* Vs *Listeria monocytogenes*.

LPL: *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Listeria monocytogenes*.

ML: Cultivo Mixto Vs *Listeria monocytogenes*.

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

Fuente: (Garzón J. 2022)

3.2.5.1. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 24 horas de siembra

Las 24 horas después de haber sido realizada la siembra se observó el crecimiento de Bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 4.64×10^7 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 4.64×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* (ML) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 5.06×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de este tipo de bacterias ácido lácticas.

3.2.5.2. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 48 horas de siembra

Mediante las 48 horas de siembra se estableció el crecimiento de bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados se registraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 6.98×10^7 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 6.04×10^7 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L.*

monocytogenes .(ML) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 6.48×10^7 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo influyen en el desarrollo de las bacterias ácido lácticas.

3.2.5.3. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 72 horas de siembra

Durante el transcurso de 72 de siembra de microorganismo se observó el crecimiento de bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 1.11×10^9 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 1.07×10^9 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* .(ML) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.11×10^9 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 72 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias ácido lácticas.

3.2.5.4. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a las 96 horas de siembra

En el transcurso de las 96 horas se estableció el crecimiento de bacterias ácido lácticas por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 8.54×10^8 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 8.36×10^8 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* .(ML) la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 8.11×10^8 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 96 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, cabe recalcar que las bacterias inhiben los patógenos y los microorganismos alternativos a través de los alimentos mediante la perturbación de membrana y permeabilidad inestable, plasma por formación de poros transitorios o canales de iones. Provocando una liberación inmediata de iones y compuestos de bajo peso molecular y ATP intracelular, causando trastornos metabólicos al drenar los protones. El motor (PFM) es un gradiente electroquímico que contiene potencial de membrana y pH requeridos para crear la mayor parte del proceso de metabolismo celular mediante energía, por lo que suprime la generación de energía, síntesis de polímeros, finalmente consideran la muerte celular (Klaenhammer citado en Crespo, 2018: p. 24).

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de bacterias ácido lácticas con los diferentes medios de cultivo los cuales se encuentran en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias LML, LPL y ML hasta las 72 horas

existe un desarrollo elevado llegando en el caso del cultivo LPM y ML con una carga de 1.11×10^9 UFC/ml; y para de estas cantidades reducirse a las 96 horas de siembra.

En la Tabla 23-3, se muestra los resultados obtenidos a partir del protocolo realizado; donde se evidencia resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 23-3: Valoración del crecimiento de la *Listeria monocytogenes* en diferentes medios de cultivo.

| Periodo | LML | LPL | ML | Prob. | E.E | CV |
|---------|----------|----------|----------|--------|----------|------|
| 24* | 1,56E+06 | 1,38E+06 | 1,22E+06 | 0.2492 | 1,45E+05 | 1,7 |
| 48* | 1,48E+06 | 1,26E+06 | 1,82E+06 | 0.0718 | 1,52E+05 | 1,85 |
| 72* | 1,30E+06 | 8,20E+05 | 8,80E+05 | 0.0572 | 1,38E+05 | 2,29 |
| 96* | 5,60E+05 | 5,80E+05 | 3,80E+05 | 0.2023 | 1,06E+05 | 4,49 |

* Valores asignados mediante logaritmo natural

LML: *Lactobacillus malefermentans* Vs *Listeria monocytogenes*.

LPL: *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Listeria monocytogenes*.

ML: Cultivo Mixto Vs *Listeria monocytogenes*.

E. E: Error estándar de la media

CV: Coeficiente de variación

Prob> 0.05: no existen diferencias significativas

Prob<0.05: existen diferencias significativas

Prob< 0.01: existen diferencias altamente significativas

3.2.5.5. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de siembra

A las primeras 24 horas se estableció el crecimiento de *L. monocytogenes* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 1.56×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 1.38×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* (ML) la presencia *L. monocytogenes* de fue de 1.22×10^6 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 24 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias patógenas.

3.2.5.6. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* a las 48 horas de siembra

A las 48 horas de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 1.48×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 1.26×10^6 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* (ML) la presencia de *L.*

monocytogenes fue de 1.82×10^6 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 48 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias patógenas.

3.2.5.7. *Crecimiento de Listeria monocytogenes a las 72 horas de siembra*

Transcurridas las 72 horas de siembra microbiana se estableció el crecimiento de *L. monocytogenes* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 1.30×10^6 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 8.20×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* (ML) la presencia de *L. monocytogenes* fue de 1.22×10^6 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 72 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias patógenas.

3.2.5.8. *Crecimiento de Listeria monocytogenes a las 96 horas de siembra*

Durante las 96 horas de siembra microbiana se estableció el crecimiento de *L. monocytogenes* por efecto de los medios de cultivo utilizados no se registraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), ya que las medias determinadas con el empleo de *Lactobacillus malefermentans* Vs *L. monocytogenes* (LML) el crecimiento fue de 5.60×10^5 UFC/ml, con *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *L. monocytogenes* (LPL) se observó 5.80×10^5 UFC/ml y al emplearse Cultivo Mixto Vs *L. monocytogenes* (ML) la presencia de *L. monocytogenes* fue de 3.80×10^5 UFC/ml; determinando por consiguiente que a las 96 horas los medios de cultivo no influyen en el desarrollo de las bacterias patógenas.

Se puede observar el comportamiento del crecimiento de *L. monocytogenes* con los diferentes medios de cultivo establecidos en función del tiempo de siembra, notándose que con todos los sustratos el crecimiento de las bacterias LML y LPL hasta las 48 horas existe un desarrollo elevado llegando en el caso del cultivo LML con una carga de 1.56×10^6 UFC/ml; y para de estas cantidades reducirse a las 96 horas de siembra a diferencia de la ML presenta un crecimiento de carga microbiana a las 48 horas de siembra con total de 1.82×10^6 UFC/ml.

3.2.6. *Antagonismo microbiano de bacterias ácido lácticas Vs Listeria monocytogenes.*

3.2.6.1. Efecto del cultivo *Lactobacillus malefermentans* Vs *Listeria monocytogenes*.

Tabla 24-3: Efecto antagónico del medio de *Lactobacillus malefermentans* Vs *Listeria monocytogenes*.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | Prob. |
|------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------|----------|
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Lactobacillus | 24 horas | 4,64E+07 | 1,56E+06 | 5,29E-05 |
| malefermentans + | L. 48 horas | 6,98E+07 | 1,48E+06 | 6,70E-07 |
| monocytogenes | 72 horas | 1,11E+09 | 1,30E+06 | 1,05E-06 |
| | 96 horas | 8,54E+08 | 5,60E+05 | 3,60E-05 |

Fuente: Garzón J. 2022

En los periodos de evaluación (ver Tabla 24-3, Figura 44-3), realizados se determinó la carga correspondiente de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *L. monocytogenes*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 4.64×10^7 UFC/ml y de la *L. monocytogenes* 1.56×10^6 UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.11×10^9 UFC/ml y 1.56×10^6 UFC/ml en la *L. monocytogenes* a las 24 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) obteniendo 5.60×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 8.54×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse. Los principales componentes químicos de las bacterias son los aminoácidos saturados positivamente como la arginina y la glicina pueden interactuar con la membrana celular bacteriana o células de soporte, las BAL fabricantes de bacteriocinas se auto resguardan de la toxicidad de sus combinados mediante una proteína de exención codificada en el mismo operón de la bacteriocina, regularizada por sistema de transducción de señal de tres mecanismos celular (Klaenhammer citado en Crespo, 2018: p. 24).

3.2.6.2. Efecto del cultivo *Lactobacillus parakefiri* Vs *Listeria monocytogenes*.

Tabla 25-3: Efecto antagónico del medio de *Lentilactobacillus parakefiri* Vs *Listeria monocytogenes*.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lactobacillus</i> | <i>Listeria</i> | Prob. |
|--------------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------|
| | | <i>malefermentans</i> | <i>monocytogenes</i> | |
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Lentilactobacillus | 24 horas | 4,62E+07 | 1,38E+06 | 5,00E-05 |
| parakefiri + | L. 48 horas | 6,04E+07 | 1,26E+06 | 9,21E-06 |
| monocytogenes | 72 horas | 1,07E+09 | 8,20E+05 | 2,14E-06 |
| | 96 horas | 8,36E+08 | 5,80E+05 | 5,65E-06 |

Fuente: Garzón J. 2022

En los periodos de evaluación realizados se determinó la carga correspondiente de las bacterias ácido lácticas (*Lentilactobacillus parakefiri*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *L. monocytogenes*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 4.62×10^7 UFC/ml y de la *L. monocytogenes* 1.38×10^6 UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.07×10^9 UFC/ml y 1.38×10^6 UFC/ml en la *L. monocytogenes* a las 24 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) obteniendo 5.80×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 8.36×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse por lo tanto las características de los extractos, tales como el efecto a tratamiento térmico, la estabilidad a diferentes pH y el comportamiento frente a enzimas proteolíticas que permitan obtener mayor información sobre el tipo de sustancia antimicrobiana presente y definir a través de técnicas moleculares su identidad como compuesto tipo bacteriocina, descartando la actividad antimicrobiana por compuestos como ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno (Fanegas et al., 2017: p.7).

3.2.6.3. Efecto del cultivo mixto Vs *Listeria monocytogenes*

Tabla 26-3: Efecto antagónico del medio de *Cultivo mixto* Vs *Listeria monocytogenes*.

| Medio de cultivo | Periodo | <i>Lactobacillus</i> | <i>Listeria</i> | Prob. |
|------------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------|
| | | <i>malefermentans</i> | <i>monocytogenes</i> | |
| | 0 horas | 1,00E+06 | 1,00E+05 | - |
| Cultivo mixto + | L. 24 horas | 5,06E+07 | 1,22E+06 | 1,36E-05 |
| monocytogenes | 48 horas | 6,48E+07 | 1,82E+06 | 4,99E-06 |
| | 72 horas | 1,11E+09 | 8,80E+05 | 4,90E-07 |
| | 96 horas | 8,71E+08 | 3,80E+05 | 4,27E-06 |

Fuente: Garzón J. 2022

En el tiempo transcurrido evaluación realizados se identificó la carga correspondiente de las bacterias ácido lácticas (*Cultivo mixto*) presentan un mayor crecimiento con respecto a las bacterias patógenas como la *L. monocytogenes*, por cuanto a las 24 horas la presencia de bacterias ácido lácticas 5.06×10^7 UFC/ml y de la *L. monocytogenes* 1.22×10^6 UFC/ml, siendo más notoria la diferencia a las 72 horas de siembra ya que la presencia de bacterias ácido lácticas fue de 1.11×10^9 UFC/ml y 1.82×10^6 UFC/ml en la *L. monocytogenes* a las 48 horas, registrándose al final del estudio (96 horas) obteniendo 3.80×10^5 UFC/ml una carga microbiana de bacterias patógenas y una presencia de 8.71×10^8 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, resultados que demuestran que a medida que incrementan las bacterias ácido lácticas las bacterias patógenas tienen a reducirse. Además los aislados con actividad antimicrobiana pueden ser utilizados en la formulación, la capacidad antimicrobiana exhibida frente a *Listeria monocytogenes*, podría ser una alternativa eficiente para el control de este patógeno, principalmente en quesos frescos y madurados (Fanegas et al., 2017: p.7).

CONCLUSIONES

Al caracterizar al sustrato de la leche “VITA” en los parámetros de pH, acidez titulable, grasa, azúcares totales y reductores obteniendo valores aceptables según la norma INEN 701 estableciendo que la leche “VITA” es apta para ser un sustrato.

Los patógenos se aislaron de diferentes productos alimentarios, estableciéndose las siguientes poblaciones: *Salmonella spp*, *Estafilococo aureus* y *Listeria monocytogenes*, para posteriormente ser manipulados en el antagonismo microbiano.

En relación al efecto antagónico se determinó que el mejor tratamiento fue para el *Lactobacillus malefermentans* la inhibición alta frente a la *Salmonela spp* llegando a disminuir por completo el crecimiento del patógeno, en relación al tratamiento del cultivo de *Lentilactobacillus parakefiri* el mejor resultado de inhibición fue para el *Estafilococos aureus* presentando niveles de inhibición bajos, y realizando la evaluación de inhibición de la *L. monocytogenes* presento valores con un mejor rendimiento respecto al *Cultivo mixto*.

RECOMENDACIONES

Mediante el empleo de otros sustratos determinar el efecto antagónico microorganismos benéficos frente a diferentes patógenos.

Emplear diferentes microorganismos aislados de bosques primarios para determinar el efecto antagónico frente a diversos patógenos.

BIBLIOGRAFIA

ALVARADO, C. & DIAZ, C. citado en GUANOCHANGA AMORES, Erika Johanna. Evaluación del potencial antagónico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura, Agropecuaria. Ecuador. 2019. p. 18 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21186/1/T-IASA%20I-005565.pdf>

ABIS. *Biomechical identification data base versión: Bacillus* [en línea], 2020, (United State of America) p. 03 [Consulta: 20 abril 2022]. Disponible en: https://www.tgw1916.net/bacteria_Bacillus_input.php

AOAC, 2013.citado en CUELLAR MILÁN, Darwin Abel. Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano [En línea] (Trabajo de titulación). Zamorano, Agroindustria alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 2015.p. 05[Consulta: 2022-04-28] Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/200328aa-a093-4625-a402-af79c92784e0/content>

CASTILLO & CHÁVEZ citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 07 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

CASTILLO & CHÁVEZ citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 15 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

CASTILLO & CHÁVEZ, MAGARIÑOS, DUBACH citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 07 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

COVENIN 3219. *Leche - determinación de azúcares. Métodos de Feheling*

CRESPO NARVAEZ, Karla Alexandra. Bacterias ácido-lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad del Azuay, Facultad de Ciencias y Tecnología. Cuenca. 2018. p. 22 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en:

<https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/8595/5/14262.pdf>

CHURQUI VILCA, Jesús Madona. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de puno. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela profesional de biología, Ciencias biológicas. Perú. 2020. p. 27 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible

en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

CHURQUI VILCA, Jesús Madona. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de puno. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela profesional de biología, Ciencias biológicas. Perú. 2020. p. 38 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible

en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

DIAZ, R. RAMÍREZ, J. ANZULES, J. HERNANDEZ, ALDO. & SAONA, R. “Viabilidad de *Lactobacillus paracasei* en co-cultivo con otras bacterias lácticas en leche descremada fermentada de cabra”. *Revista Dialnet*. [En línea], 2017, Cumbres 03(01), pp. 37-42 [Consulta: 2022-05-26]. Disponible en:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6550737>

Di Schiavi, María. Rebagliati, Juan. & Libonatti, Carina. Análisis comparativo entre ácido láctico y ácido cítrico en la desinfección de las carcasas de pollos en el sector de trozado, en una planta de faena [En línea] (Trabajo monográfico). UNCPBA, Facultad de ciencias veterinarias. Tandil. 2015. p. 31 [Consulta: 2022-05-27]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/487061785/Di-Schiavi-Maria-de-los-Angeles-Facultad-de-Ciencias-Veterinarias-pdf>

Di Schiavi, María. Rebagliati, Juan. & Libonatti, Carina. Análisis comparativo entre ácido láctico y ácido cítrico en la desinfección de las carcasas de pollos en el sector de trozado, en una planta de faena [En línea] (Trabajo monográfico). UNCPBA, Facultad de ciencias veterinarias. Tandil. 2015. p. 46 [Consulta: 2022-05-27]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/487061785/Di-Schiavi-Maria-de-los-Angeles-Facultad-de-Ciencias-Veterinarias-pdf>

DUBACH citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 07 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en:

<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

DUQUE CORTÉS, Juan Camilo, MEJIA RIVERA, Luisa Fernanda & OYOLA VENEGAS, Yuli Fabiana. Evaluación del efecto inhibitorio de extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas (BAL) frente al crecimiento de *Salmonella spp.* [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Libre Colombia, Colombia. 2018. p. 24 [Consulta: 2022-04-29]. Disponible en:

<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/17606/EVALUACION%20DEL%20EFECTO%20INHIBITORIO.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO. *Estación Agrometeorológica* [blog]. [Consulta: 28 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.espoch.edu.ec/index.php/estacion-meteorologica.html>

ESPINOZA VACA, Héctor Aníbal. & PINCAY AGUIRRE, Guisella Elizabeth Relación del extracto de *Piper carpubya* Y *Momordica charantia* sobre la inhibición de patógenos in vitro y el tipo de interacción [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López, Programa de posgrados. Ecuador . 2022. p. 19 [Consulta: 2022-05-30]. Disponible en:

<https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1681/1/TTMAI30D.pdf>

ESPINOZA VACA, Héctor Aníbal. & PINCAY AGUIRRE, Guisella Elizabeth Relación del extracto de *Piper carpubya* Y *Momordica charantia* sobre la inhibición de patógenos in vitro y el tipo de interacción [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López, Programa de posgrados. Ecuador . 2022. p. 24 [Consulta: 2022-05-30]. Disponible en:

<https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1681/1/TTMAI30D.pdf>

ESPINOZA VACA, Héctor Aníbal. & PINCAY AGUIRRE, Guisella Elizabeth Relación del extracto de *Piper carpubya* Y *Momordica charantia* sobre la inhibición de patógenos in vitro y el tipo de interacción [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politecnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López, Programa de posgrados. Ecuador . 2022. p. 24 [Consulta: 2022-05-30]. Disponible en:

<https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1681/1/TTMAI30D.pdf>

FANEGAS, M. LONDOÑO, A. ZULETA, M. BURITICA, M. AGUDELO, S. & VALENCIA, J. “Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano ”. *Revista Scielo* [En línea] 2017. p. 07. 15(01) [Consulta: 2022-05-28]. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612017000100006

GALLUT RUBIO, Priscila. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de santidpac, bahía concepción México [En línea] (Trabajo de titulación). Centro de investigaciones biológicas del norte, Programa de posgrados. México . 2016. p. 12 [Consulta: 2022-05-16]. Disponible en:

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/424/1/gallut_p.pdf

GALLUT RUBIO, Priscila. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de santidpac, bahía concepción México [En línea] (Trabajo de titulación). Centro de investigaciones biológicas del norte, Programa de posgrados. México . 2016. p. 13 [Consulta: 2022-05-16]. Disponible en:

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/424/1/gallut_p.pdf

GALLUT RUBIO, Priscila. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de santidpac, bahía concepción México [En línea] (Trabajo de titulación). Centro de investigaciones biológicas del norte, Programa de posgrados. México . 2016. p. 15 [Consulta: 2022-05-16]. Disponible en:

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/424/1/gallut_p.pdf

GALLUT RUBIO, Priscila. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de santidpac, bahía concepción México [En línea] (Trabajo de titulación). Centro de investigaciones biológicas del norte, Programa de posgrados. México . 2016. p. 19 [Consulta: 2022-05-16]. Disponible en:

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/424/1/gallut_p.pdf

GARCIA, O.F, GIL, M.M & GARCIA, O.P.P. “Activation of diacetyl/acetone pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic grow”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, n° 7 (2016) (United States of America) pp. 02-03.

GARCIA, O.F, GIL, M.M & GARCIA, O.P.P. “Activation of diacetyl/acetone pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic grow”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, n° 7 (2016) (United States of America) p. 12.

GUANOCHANGA AMORES, Erika Johanna. Evaluación del potencial antagónico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura, Agropecuaria. Ecuador. 2019. p. 03 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21186/1/T-IASA%20I-005565.pdf>

GUANOCHANGA AMORES, Erika Johanna. Evaluación del potencial antagónico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura, Agropecuaria. Ecuador. 2019. p. 17 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21186/1/T-IASA%20I-005565.pdf>

HEREDIA CASTRO, P. & HÉRNÁNDEZ MENDOZA, A. & GONZÁLEZ CÓRDOVA, A. & ALLEJO CORDOBA, B. “Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en queso”. *Inter ciencia* [En línea], 2017, México 42(6), pp, 340 -346 [Consulta: 2022-04-20]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/339/33951621002/html/>

INDECOPI citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios físico químicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 04 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en:

<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

INDECOPI citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 05 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

INEN 13. *Leche. Determinación de la acidez titulable*

INSTITUTO DE SALUD PUBLICA. “Salmonella spp”. *Instituto de salud pública de Chile* [En línea] 2014. p. 06. 09(13) [Consulta: 2022-05-23]. Disponible en:

<https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnSalmonella-12052020A.pdf>

KLAENHAMMER citado en CRESPO NARVAEZ, Karla Alexandra. Bacterias ácido-lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad del Azuay, Facultad de Ciencias y Tecnología. Cuenca. 2018. p. 24 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en:

<https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/8595/5/14262.pdf>

LEYVA DE LA CRUZ, M. MAYA ZAMUDIO, M. CORONA CRUZ, A. GONZALEZ DE LA CRUZ, U. & ROJAS HERRERA, R. “Importancia y estudios de las comunidades en los recursos y productos pesqueros.” *Revista Scielo* [En línea] 2015. p. 07. 2(04) [Consulta: 2022-05-08]. Disponible en:

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008

LEYVA DE LA CRUZ, M. MAYA ZAMUDIO, M. CORONA CRUZ, A. GONZALEZ DE LA CRUZ, U. & ROJAS HERRERA, R. “Importancia y estudios de las comunidades en los

recursos y productos pesqueros.” *Revista Scielo* [En línea] 2015. p. 10. 2(04) [Consulta: 2022-05-13]. Disponible en:

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008

LUCHINI, N , BRODERICK, G, COMBS, D. “Preservation of ruminal microorganisms for in vitro determination of ruminal protein”. *J Anim Sci* [En línea] 1996. p.p. 1134–1143. [Consulta: 2022-05-13] Disponible en:

<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v10n2/2448-6698-rmcp-10-02-315.pdf>

MAGARIÑOS citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 08 [Consulta: 2022-04-20]. Disponible en:

<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

MAKRAS, L. citado en CRUZ RIVERA, J. “Identificación de bacterias acidolácticas antagonicas de *Salmonella enterica* var. Typhimurium aisladas de queso artesanal.” *Revista Scielo* [En línea] 2017. p. 9. 8(04) [Consulta: 2022-05-26]. Disponible en:

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000400785&lng=en&nrm=iso

MONROY, P. citado en CRESPO NARVAEZ, Karla Alexandra. Bacterias ácido-lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad del Azuay, Facultad de Ciencias y Tecnologia. Cuenca. 2018. p. 24 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en:

<https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/8595/5/14262.pdf>

MORENO RIAÑO, Cindy Paola. Evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia volúbilis* L para la conformación de un consorcio

microbiano en condiciones in vitro [En línea] (Trabajo de titulación) Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias. Disponible en:

<https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/2844/1/Evaluaci%C3%B3n%20del%20antagonismo%20y%20sinergismo%20en%20aislados%20microbianos%20obtenidos%20de%20plukenetia%20vol%C3%Babilis%20L%20para%20la%20conformaci%C3%B3n%20de%20un%20consorcio%20microbiano%20en%20condiciones%20in%20vitro..pdf>

NAGUA SERRANO, M. “Caracterización de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador.” *Revista Avances en ciencias e ingenierías* [En línea] 2014. p. 09. 6(01) [Consulta: 2022-05-15]. Disponible en:

<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/155/157>

NAGUA SERRANO, M. “Caracterización de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador.” *Revista Avances en ciencias e ingenierías* [En línea] 2014. p. 10. 6(01) [Consulta: 2022-05-15]. Disponible en:

<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/155/157>

NAGUA SERRANO, M. “Caracterización de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador.” *Revista Avances en ciencias e ingenierías* [En línea] 2014. p. 11. 6(01) [Consulta: 2022-05-15]. Disponible en:

<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/155/157>

NAGUA SERRANO, M. “Caracterización de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador.” *Revista Avances en ciencias e ingenierías* [En línea] 2014. pp. 11 - 15. 6(01) [Consulta: 2022-05-15]. Disponible en:

<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/155/157>

NTE INEN-ISO 11290-1. *Microbiología de la cadena alimentaria — método horizontal para la detección y recuento de listeria monocytogenes y de listeria spp. — parte 1: método de detección (iso 11290-1:2017, idt).*

NTE INEN-ISO 2446. *Leche - determinación del contenido de grasa (idt).*

NTE INEN 1529-10:2013. *Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad.*

NTE INEN 701. *Leche larga vida. Requisitos*

NTE INEN 1 529-5. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.*

OLIVERA, Jorge. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de la leche. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la república. Unidad de Tecnología de alimentos, Facultad de Agronomía. Perú. 2011. p. 07 [Consulta: 2022-04-29]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1331/1/uy24-15316.pdf>

OLIVERA, Jorge. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de la leche. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la república. Unidad de Tecnología de alimentos, Facultad de Agronomía. Perú. 2011. p. 23 [Consulta: 2022-04-29]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1331/1/uy24-15316.pdf>

OUWEHAND, C. citado en CHURQUI VILCA, Jesús Madona. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de Puno. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela profesional de biología, Ciencias biológicas. Perú. 2020. p. 23 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

PARRA GONZALEZ, E. “Actividad antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (*Zea mays*L.) bajo diferentes condiciones de cultivo”. *Revista Iberoamericana de Ciencias* [En línea] 2017. p. 06. 8(04) [Consulta: 2022-05-15]. ISSN 2334-2501 Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>

PARRA GONZALEZ, E. “Actividad antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (*Zea mays*L.) bajo diferentes condiciones de cultivo”. *Revista Iberoamericana de Ciencias* [En línea] 2017. p. 07. 8(04) [Consulta: 2022-05-15]. ISSN 2334-2501 Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>

PARKER & WALKER.“ *Lactobacillus malefermentans* n.sp., isolated from beer”. *Microbiology*, vol. 8, n° 1 (1943) (Unite State of America) p. 07. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-8-1-160?crawler=true>

RADICE, M. & MARÍN, M. & GIOVANAKIS, M. & ALMUZARA, M & LIMANSKY, A. & BANTAR, C. & GALAS, M. & GUTKIND, J. “Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología”. *Revista argentina de microbiología* [En línea], 2011, Argentina 43(1), pp. 136-153[Consulta: 2022-04-18]. ISSN 0325-7541 Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/Criterios-de-ensayo-interpretaci%C3%B3n-e-informe-de-las-pruebas-de.pdf>

RAMÍREZ, J. “Análisis de técnica de recuento de microorganismos”. *Revista programa de microbiología*. [En línea], 2017, Pereira 01(01), p. 04 [Consulta: 2022-05-26]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/331757003_Analisis_de_tecnicas_de_recuento_de_Microorganismos

RODRIGUEZ AUAD, P. “Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*”. [En línea] 2018. p. 04. 35(06) [Consulta: 2022-05-25]. Disponible en:

<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n6/0716-1018-rci-35-06-0649.pdf>

RODRIGUEZ AUAD, P. “Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*”. [En línea] 2018. p. 04. 35(06) [Consulta: 2022-05-25]. Disponible en:

<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n6/0716-1018-rci-35-06-0649.pdf>

RUSSEL & WALKER.“ *Lactobacillus malefermentans* n.sp., isolated from beer”. *J Gen Microbiol*, vol. 1, n° 8 (1953) (Unite State of America) p. 12.

SALAGATA TIRADO, Karla Liliana. Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su uso potencial como probiótico. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Estatal Amazónica, Ingeniería Agroindustrial. Ecuador. 2018. p. 01 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en:

<http://201.159.223.17/bitstream/123456789/694/1/T.AGROIN.B.UEA.0069.pdf>

SÁNCHEZ, J. & FERIS, J. citado CHURQUI VILCA, Jesús Madona. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de puno. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela profesional de biología, Ciencias biológicas. Perú. 202. p. 26 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

SANCHEZ, L. & TROMPS, J. “Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico”. *Scielo Revista de salud animal* [En línea] 2014. p. 06. 36(02) [Consulta: 2022-05-10]. ISSN 0253-570X Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200008

SANCHEZ, N. citado en GUANOCHANGA AMORES, Erika Johanna. Evaluación del potencial antagónico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura, Agropecuaria. Ecuador.

2019. p. 16 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en:
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21186/1/T-IASA%20I-005565.pdf>

SANCHEZ, Y. “Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de β -lactamasas y resistente a la meticilina”. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyaca* [En línea] 2018. p. 07. 05(01) [Consulta: 2022-05-24]. Disponible en:

<https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/302>

SANCHEZ, Y. “Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de β -lactamasas y resistente a la meticilina”. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyaca* [En línea] 2018. p. 09. 05(01) [Consulta: 2022-05-24]. Disponible en:

<https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/302>

SANCHEZ, Y. “Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de β -lactamasas y resistente a la meticilina”. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyaca* [En línea] 2018. p. 12. 05(01) [Consulta: 2022-05-24]. Disponible en:

<https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/302>

SEIME. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.*

TAKIZAWA, Y, KOBAYASHI, H, KAMINUMA, E, SAKAMOTO, M, OHKUMA, M, NAKAMURA, Y, ARITA M, & TOHNO, M. “Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*”. *Biosci Microbiota*, vol. 36, n° 3 (2017) pp. 129 – 134.

TAKIZAWA, Y, KOBAYASHI, H, KAMINUMA, E, SAKAMOTO, M, OHKUMA, M, NAKAMURA, Y, ARITA M, & TOHNO, M. “Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*”. *Biosci Microbiota*, vol. 36, n° 3 (2017) p. 130

URG. *Aislamiento microbiano.* [blog]. España. Universidad de Granada, [Consulta: 2022-05-18]. Disponible en:

<https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-iv/pb-iv-2-introduccion.htm>

VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 0 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 06 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

VÁZQUEZ, M., SUÁREZ H. & ZAPATA S. citado en CHURQUI VILCA, Jesús Madona. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expandidos en tres mercados de la ciudad de Puno. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela profesional de biología, Ciencias biológicas. Perú. 2020. p. 23 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13606/Churqui_Vilca_Jesus_Madona.pdf?sequence=3&isAllowed=y

VÉLEZ, J. & BARBOSA, G. citado en VALDIVIA CALIXTO, Jorge Andrés. Cambios fisicoquímicos, sensoriales y nutricionales, debido a la evaporación de la leche fresca entera [En línea] (Trabajo monográfico). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 2017. p. 05 [Consulta: 2022-04-18]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3101/valdivia-calixto-jorge-andres.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

VÉLEZ ZEA, J. & GUTIÉRREZ RAMÍREZ, Luz. & MONTOYA CAMPUZANO, O. “Evaluación de la Actividad Bactericida de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas en Calostro de Cerdas Frente a *Salmonella typhimurium*”. Facultad Nacional de Agronomía [En línea], 2015,

Medellin 68(1), pp. 7482 – 7486 [Consulta: 2022-04-15]. ISSN 7481-7486 Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v68n1/v68n1a09.pdf>

VILLAMIL, C. citado en GUANOCHANGA AMORES, Erika Johanna. Evaluación del potencial antagonico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura, Agropecuaria. Ecuador. 2019. p. 03 [Consulta: 2022-04-13]. Disponible en:
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21186/1/T-IASA%201-005565.pdf>

D.B.A.I.
Ing. Cristian Castilla



ANEXOS

ANEXO A: PRUEBA DE pH EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).



Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO B: RESULTADOS DE pH REALIZADOS A LA LECHE VITA (SUSTRATO).

| MUESTRA | RESULTADO | | | RESULTADO PROMEDIO |
|---------|-----------|------|------|-----------------------|
| | R1 | R2 | R3 | |
| M1 | 6,77 | 6,70 | 6,76 | 6,74 |
| M2 | 6,80 | 6,78 | 6,77 | 6,78 |
| M3 | 6,77 | 6,72 | 6,77 | 6,75 |
| M4 | 6,76 | 6,74 | 6,77 | 6,76 |
| M5 | 6,80 | 6,79 | 6,80 | 6,80 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO C: PRUEBA DE ÁCIDEZ TITULABLE EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).



Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO D: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ÁCIDEZ TITULABLE DE LA LECHE VITA (SUSTRATO).

| MUESTRA | RESULTADO | | | RESULTADO |
|---------|-----------|-------|-------|-----------|
| | R1 | R2 | R3 | PROMEDIO |
| M1 | 0,171 | 0,174 | 0,176 | 0,174 |
| M2 | 0,175 | 0,173 | 0,175 | 0,174 |
| M3 | 0,172 | 0,175 | 0,172 | 0,173 |
| M4 | 0,171 | 0,174 | 0,172 | 0,172 |
| M5 | 0,171 | 0,175 | 0,175 | 0,174 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO E: PRUEBA DE GRASA EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).



Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO F: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE GRASA EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).

| MUESTRA | RESULTADO | | | RESULTADO | PORCENTAJE |
|---------|-----------|-------|-------|-----------|------------|
| | R1 | R2 | R3 | PROMEDIO | (%) |
| M1 | 0,030 | 0,032 | 0,031 | 0,031 | 3,1 |
| M2 | 0,028 | 0,030 | 0,029 | 0,029 | 2,9 |
| M3 | 0,030 | 0,032 | 0,030 | 0,031 | 3,1 |
| M4 | 0,028 | 0,027 | 0,028 | 0,028 | 2,8 |
| M5 | 0,030 | 0,029 | 0,030 | 0,030 | 3,0 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO G: PRUEBA DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).



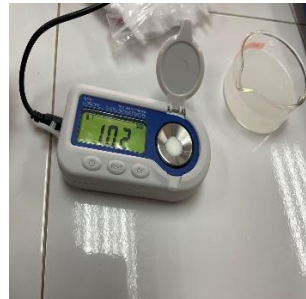
Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO H: RESULTADOS DE LA PRUBA DE AÚCARES REDUCTORES EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).

| MUESTRA | RESULTADO | | | RESULTADO | PORCENTAJE |
|---------|-----------|-------|-------|-----------|------------|
| | R1 | R2 | R3 | PROMEDIO | (%) |
| M1 | 39,00 | 40,00 | 39,00 | 39,33 | 0,738 |
| M2 | 40,00 | 40,00 | 40,00 | 40,00 | 0,750 |
| M3 | 42,00 | 41,00 | 41,00 | 41,33 | 0,775 |
| M4 | 39,00 | 40,00 | 40,00 | 39,67 | 0,744 |
| M5 | 40,00 | 40,00 | 40,00 | 40,00 | 0,750 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO I: PRUEBA DE AZÚCARES TOTALES EN LA LECHE VITA (SUSTRATO).



Fuente: Garzón J. 2022

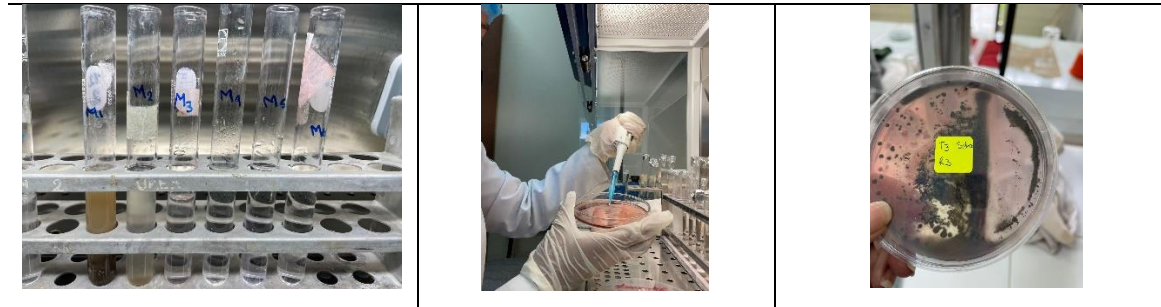
ANEXO J: RESULTADOS DE AZUCARES TOTALES EN LA LECHE VITA(SUSTRATO).

| MUESTRA | RESULTADO | | | RESULTADO |
|---------|-----------|-------|-------|-----------|
| | R1 | R2 | R3 | PROMEDIO |
| M1 | 11,00 | 11,00 | 10,90 | 10,97 |
| M2 | 10,80 | 10,90 | 10,90 | 10,87 |
| M3 | 11,20 | 11,00 | 11,00 | 11,07 |
| M4 | 11,00 | 10,80 | 10,90 | 10,90 |
| M5 | 10,90 | 11,00 | 11,00 | 10,97 |

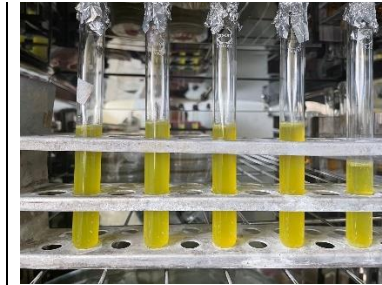
Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO K: OBTENCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS.

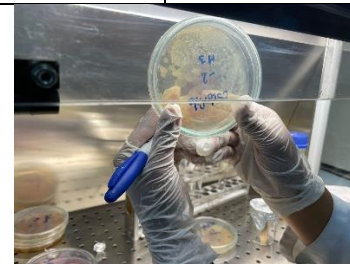
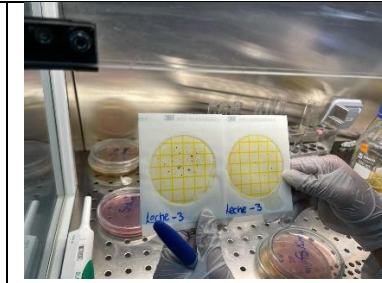
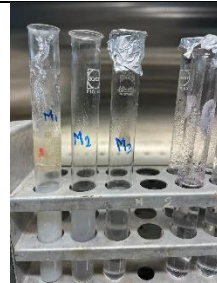
Salmonella spp



Listeria monocytogenes



Estafilococo aureus



Fuente: Garzón J. 2022

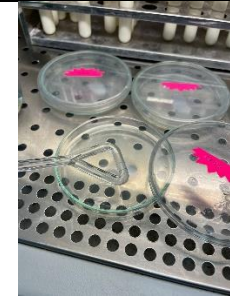
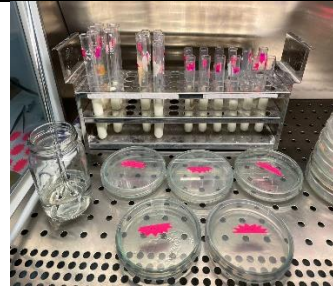
ANEXO L: PURIFICACION Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.



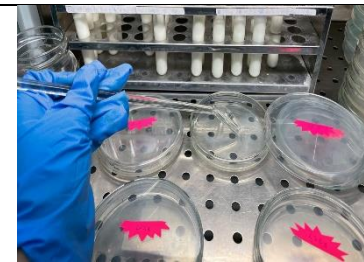
Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO M: REALIZACIÓN DEL ANTAGONISMO DE (*L. malefermentans* Vs *Salmonella* spp).

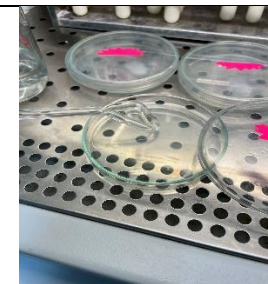
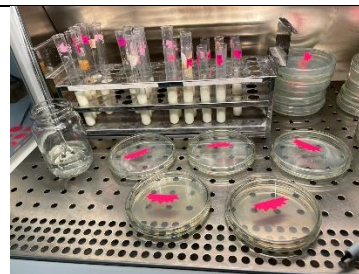
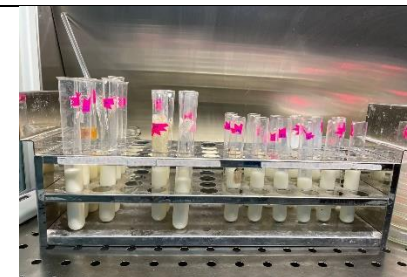
Salmonella spp



Listeria monocytogenes

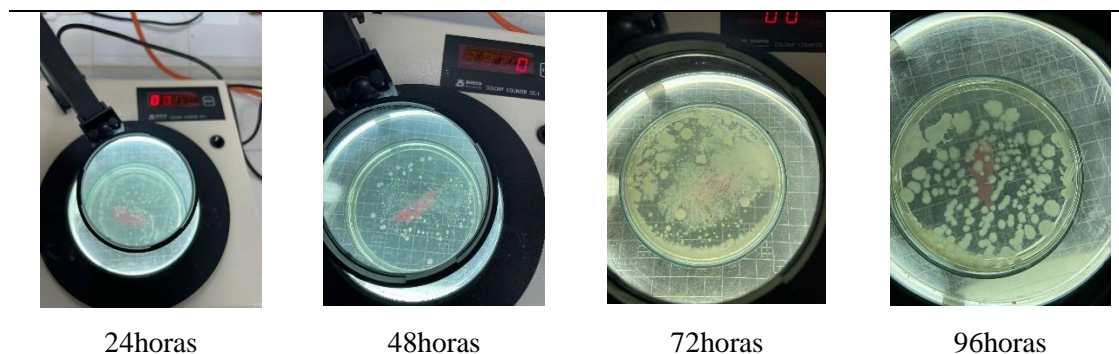


Estafilococo aureus



Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO N: CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI (*L. Malefermentans* Vs *Salmonella* spp).



Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Salmonella</i> spp | LM0S0 | 58 | 13 | 62 | 5 | 1170 | 1 | 867 | 0 |
| | LM1S1 | 55 | 17 | 63 | 11 | 975 | 2 | 672 | 0 |
| | LM2S2 | 54 | 15 | 59 | 5 | 997 | 4 | 867 | 0 |
| | LM3S3 | 43 | 15 | 55 | 10 | 953 | 4 | 542 | 0 |
| | LM4S4 | 39 | 14 | 58 | 7 | 1170 | 3 | 693 | 0 |

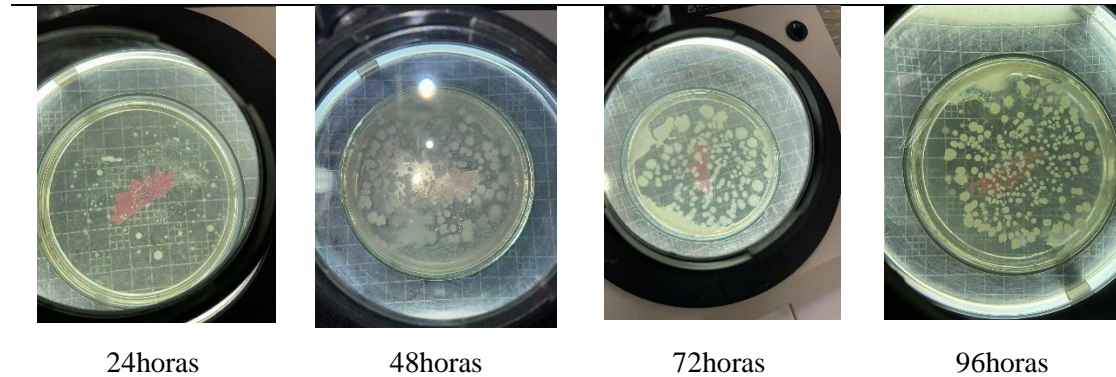
Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|-------------------------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|--------------------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> | | 5,8 | | | | | | | |
| | LM0S0 | $\times 10^7$ | $1,3 \times 10^6$ | $6,2 \times 10^7$ | 5×10^5 | $1,170 \times 10^9$ | 1×10^5 | $8,67 \times 10^8$ | 0 |
| | LM1S1 | $5,5 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^6$ | $6,3 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^6$ | $9,75 \times 10^8$ | 2×10^5 | $6,72 \times 10^8$ | 0 |

| | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|---|
| + <i>Salmonella</i> <i>spp</i> | LM2S2 | 5,4x10 ⁷ | 1,5× 10 ⁶ | 5,9x10 ⁷ | 5x10 ⁵ | 9,97x10 ⁸ | 4x10 ⁵ | 8,67x10 ⁸ | 0 |
| | LM3S3 | 4,3x10 ⁷ | 1,5× 10 ⁶ | 5,5x10 ⁷ | 1x10 ⁶ | 9,53x10 ⁸ | 4x10 ⁵ | 5,42x10 ⁸ | 0 |
| | LM4S4 | 3,9x10 ⁷ | 1,4× 10 ⁶ | 5,8x10 ⁷ | 7x10 ⁵ | 1,170x10 ⁹ | 3x10 ⁵ | 6,93x10 ⁸ | 0 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO O: RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (*L. Malefermentans* Vs *L. monocytogenes*.)



Fuente: Garzón J. 2022

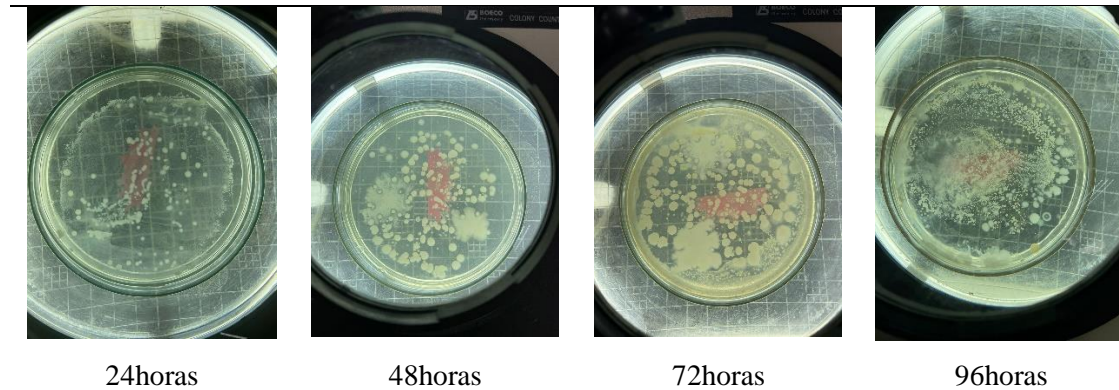
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus</i> <i>malefermentans</i> + <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> | LM0L0 | 42 | 12 | 72 | 15 | 1148 | 15 | 975 | 8 |
| | LM1L1 | 38 | 16 | 65 | 17 | 1170 | 12 | 672 | 5 |
| | LM2L2 | 46 | 15 | 73 | 14 | 1018 | 12 | 845 | 2 |
| | LM3L3 | 54 | 19 | 68 | 12 | 1127 | 10 | 910 | 6 |
| | LM4L4 | 52 | 16 | 71 | 16 | 1083 | 16 | 867 | 7 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | LM0L0 | 4,2×10 ⁷ | 1,2x10 ⁶ | 7,2x10 ⁷ | 1,5x10 ⁶ | 1,148x10 ⁹ | 1,5x10 ⁶ | 9,75x10 ⁸ | 8×10 ⁵ |
| | LM1L1 | 3,8x10 ⁷ | 1,6×10 ⁶ | 6,5x10 ⁷ | 1,7x10 ⁶ | 1,170x10 ⁹ | 1,2x10 ⁶ | 6,72x10 ⁸ | 5×10 ⁵ |
| | LM2L2 | 4,6x10 ⁷ | 1,5×10 ⁶ | 7,3x10 ⁷ | 1,4x10 ⁶ | 1,018x10 ⁹ | 1,2x10 ⁶ | 8,45x10 ⁸ | 2×10 ⁵ |
| | LM3L3 | 5,4x10 ⁷ | 1,9×10 ⁶ | 6,8x10 ⁷ | 1,2x10 ⁶ | 1,127x10 ⁹ | 1x10 ⁶ | 9,10x10 ⁸ | 6×10 ⁵ |
| | LM4L4 | 5,2x10 ⁷ | 1,6×10 ⁶ | 7,1x10 ⁷ | 1,6x10 ⁶ | 1,083x10 ⁹ | 1,6x10 ⁶ | 8,67x10 ⁸ | 7×10 ⁵ |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO P: CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE (*L. malefermentans* Vs *E. aureus*).



Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Estafilococo aureus</i> | LM0S0 | 39 | 12 | 61 | 17 | 1170 | 10 | 715 | 7 |
| | LM1S1 | 42 | 16 | 68 | 15 | 1148 | 11 | 520 | 6 |
| | LM2S2 | 38 | 12 | 69 | 18 | 1322 | 9 | 823 | 6 |

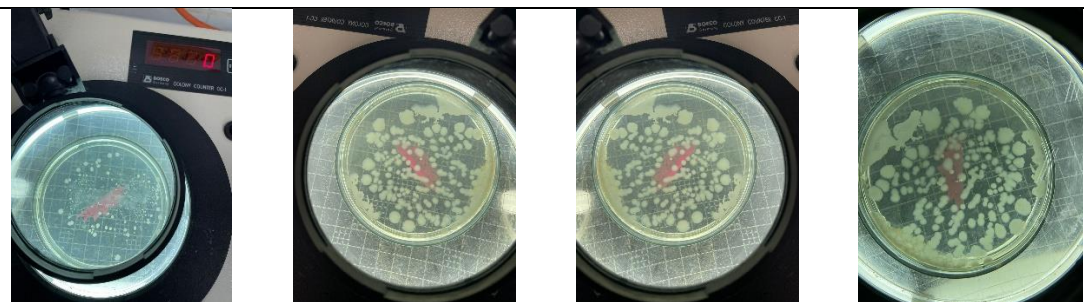
| | | | | | | | | |
|-------|----|---|----|----|------|----|-----|---|
| LM3S3 | 51 | 9 | 62 | 26 | 1105 | 12 | 628 | 5 |
| LM4S4 | 54 | 7 | 70 | 14 | 1105 | 10 | 715 | 4 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lactobacillus</i> | LM0S0 | 3,9×10 ⁷ | 1,2×10 ⁶ | 6,1×10 ⁷ | 1,7×10 ⁶ | 1,17×10 ⁹ | 1×10 ⁶ | 7,15×10 ⁸ | 7×10 ⁵ |
| | LM1S1 | 4,2×10 ⁷ | 1,6×10 ⁶ | 6,8×10 ⁷ | 1,5×10 ⁶ | 1,148×10 ⁹ | 1,1×10 ⁶ | 5,20×10 ⁸ | 6×10 ⁵ |
| <i>malefermentans</i> + <i>Estafilococo</i> | LM2S2 | 3,8×10 ⁷ | 1,2×10 ⁶ | 6,9×10 ⁷ | 1,8×10 ⁶ | 1,322×10 ⁹ | 9×10 ⁵ | 8,23×10 ⁸ | 6×10 ⁵ |
| | LM3S3 | 5,1×10 ⁷ | 9×10 ⁵ | 6,2×10 ⁷ | 2,6×10 ⁶ | 1,105×10 ⁹ | 1,2×10 ⁶ | 6,28×10 ⁸ | 5×10 ⁵ |
| <i>aureus</i> | LM4S4 | 5,4×10 ⁷ | 7×10 ⁵ | 7×10 ⁷ | 1,4×10 ⁶ | 1,105×10 ⁹ | 1×10 ⁶ | 7,15×10 ⁸ | 4×10 ⁵ |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO Q: CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE *L. parakefiri* Vs *Salmonella* spp.



24horas

48horas

72horas

96horas

Fuente: Garzón J. 2022

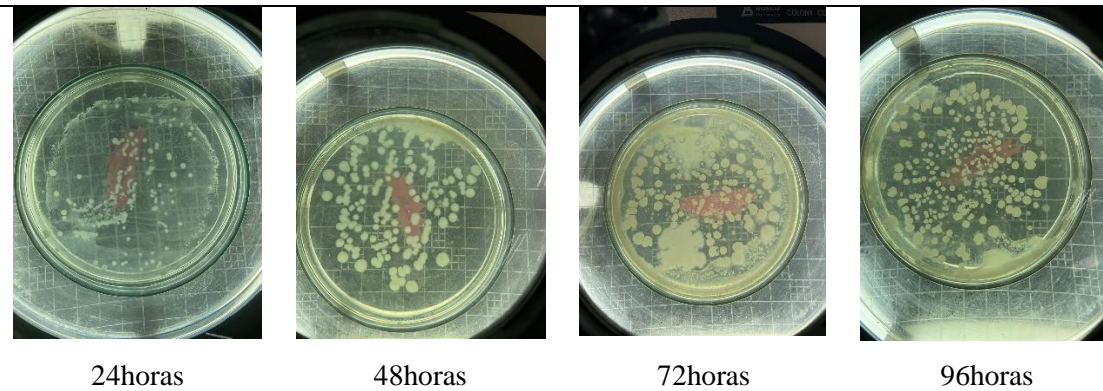
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Salmonella spp</i> | L0S0 | 47 | 14 | 59 | 6 | 1235 | 4 | 693 | 1 |
| | L1S1 | 35 | 19 | 61 | 5 | 1192 | 1 | 585 | 0 |
| | L2S2 | 59 | 15 | 68 | 10 | 1235 | 7 | 758 | 1 |
| | L3S3 | 55 | 13 | 56 | 6 | 1148 | 3 | 585 | 4 |
| | L4S4 | 50 | 12 | 60 | 13 | 1127 | 11 | 823 | 8 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Salmonella spp</i> | L0S0 | $4,7 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^6$ | $5,9 \times 10^7$ | 6×10^5 | $1,235 \times 10^9$ | 4×10^5 | $6,93 \times 10^8$ | 8×10^5 |
| | L1S1 | $3,5 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^6$ | $6,1 \times 10^7$ | 5×10^5 | $1,192 \times 10^9$ | 1×10^5 | $5,85 \times 10^8$ | 0 |
| | L2S2 | $5,9 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^6$ | $5,8 \times 10^7$ | 1×10^6 | $1,235 \times 10^9$ | 7×10^5 | $7,58 \times 10^8$ | 1×10^5 |
| | L3S3 | $5,5 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^6$ | $5,5 \times 10^7$ | 6×10^5 | $1,148 \times 10^9$ | 3×10^5 | $5,85 \times 10^8$ | 4×10^5 |
| | L4S4 | 5×10^7 | $1,2 \times 10^6$ | 6×10^7 | $1,3 \times 10^6$ | $1,127 \times 10^9$ | $1,1 \times 10^6$ | $8,23 \times 10^8$ | 8×10^5 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO R: CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE (*L. parakefiri* Vs *L. monocytogenes*).



Fuente: Garzón J. 2022

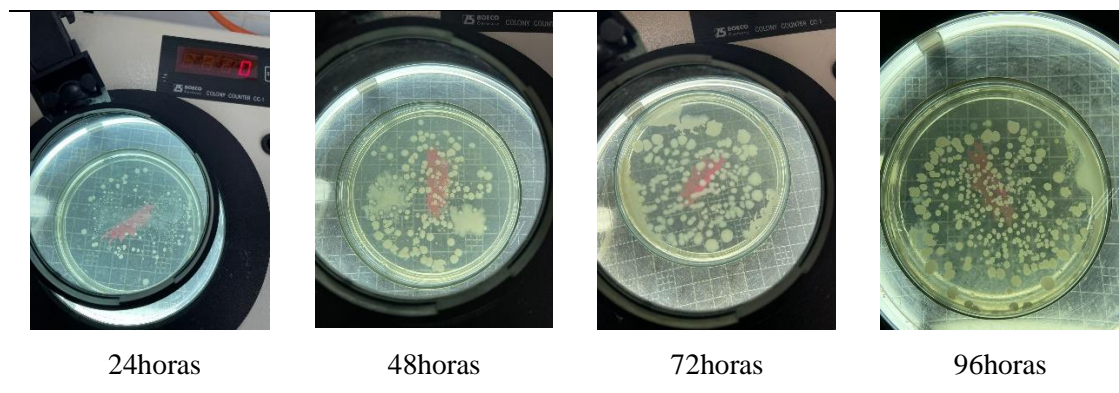
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | L0L0 | 41 | 14 | 63 | 10 | 1018 | 7 | 910 | 5 |
| | L1L1 | 46 | 19 | 68 | 17 | 1170 | 9 | 888 | 4 |
| | L2L2 | 55 | 15 | 60 | 19 | 1018 | 9 | 802 | 7 |
| | L3L3 | 50 | 11 | 59 | 10 | 1105 | 10 | 737 | 6 |
| | L4L4 | 39 | 10 | 52 | 7 | 1018 | 6 | 845 | 7 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> | L0L0 | $4,1 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^6$ | $6,3 \times 10^7$ | 1×10^6 | $1,018 \times 10^9$ | 7×10^5 | $9,10 \times 10^8$ | 5×10^5 |
| | L1L1 | $4,6 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^6$ | $6,8 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^6$ | $1,170 \times 10^9$ | 9×10^5 | $8,88 \times 10^8$ | 4×10^5 |
| | L2L2 | $5,5 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^6$ | 6×10^7 | $1,9 \times 10^6$ | $1,018 \times 10^9$ | 9×10^5 | $8,02 \times 10^8$ | 7×10^5 |
| | L3L3 | 5×10^7 | $1,1 \times 10^6$ | $5,9 \times 10^7$ | 1×10^6 | $1,105 \times 10^9$ | 1×10^6 | $7,37 \times 10^8$ | 6×10^5 |
| | L4L4 | $3,9 \times 10^7$ | 1×10^6 | $5,2 \times 10^7$ | 7×10^5 | $1,018 \times 10^9$ | 6×10^5 | $8,45 \times 10^8$ | 7×10^5 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO S: CONTEO DE COLONIAS EN LA CAJA PETRI DE (*L. parakefiri* Vs *E. aureus*).



Fuente: Garzón J. 2022

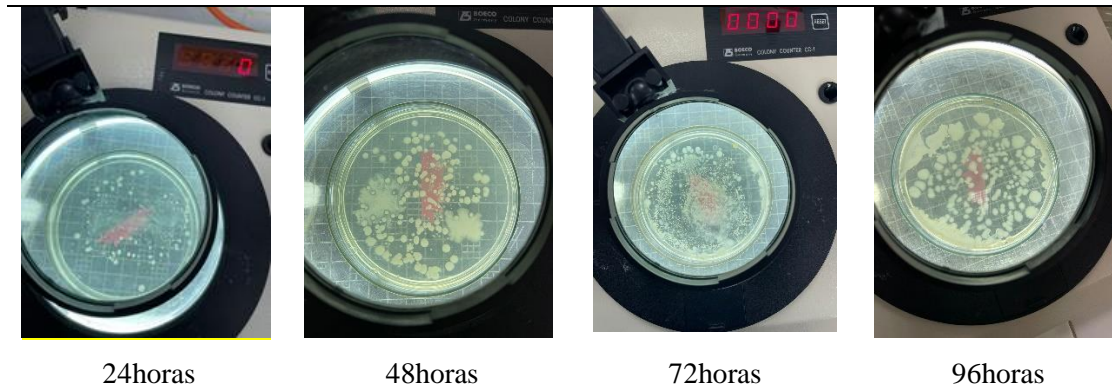
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Estafilococos aureus</i> | L0E0 | 41 | 10 | 58 | 16 | 65 | 9 | 542 | 7 |
| | L1E1 | 37 | 13 | 65 | 19 | 67 | 6 | 628 | 4 |
| | L2E2 | 29 | 7 | 67 | 20 | 72 | 3 | 780 | 1 |
| | L3E3 | 29 | 15 | 62 | 24 | 69 | 5 | 737 | 4 |
| | L4E4 | 46 | 17 | 63 | 18 | 63 | 9 | 888 | 5 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Estafilococos aureus</i> | L0E0 | 4,1×10 ⁷ | 1×10 ⁶ | 5,8×10 ⁷ | 1,6×10 ⁶ | 6,5×10 ⁷ | 9×10 ⁵ | 5,42×10 ⁸ | 7×10 ⁵ |
| | L1E1 | 3,7×10 ⁷ | 1,3×10 ⁶ | 6,5×10 ⁷ | 1,9×10 ⁶ | 6,7×10 ⁷ | 6×10 ⁵ | 6,28×10 ⁸ | 4×10 ⁵ |
| | L2E2 | 2,9×10 ⁷ | 7×10 ⁵ | 6,7×10 ⁷ | 2×10 ⁶ | 7,2×10 ⁷ | 3×10 ⁵ | 7,80×10 ⁸ | 1×10 ⁵ |
| | L3E3 | 2,9×10 ⁷ | 1,5×10 ⁶ | 6,2×10 ⁷ | 2,4×10 ⁶ | 6,9×10 ⁷ | 5×10 ⁵ | 7,37×10 ⁸ | 4×10 ⁵ |
| | L4E4 | 4,6×10 ⁷ | 1,7×10 ⁶ | 6,3×10 ⁷ | 1,8×10 ⁶ | 6,3×10 ⁷ | 9×10 ⁵ | 8,88×10 ⁸ | 5×10 ⁵ |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO T: RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (*Cultivo mixto Vs Salmonella spp*).



Fuente: Garzón J. 2022

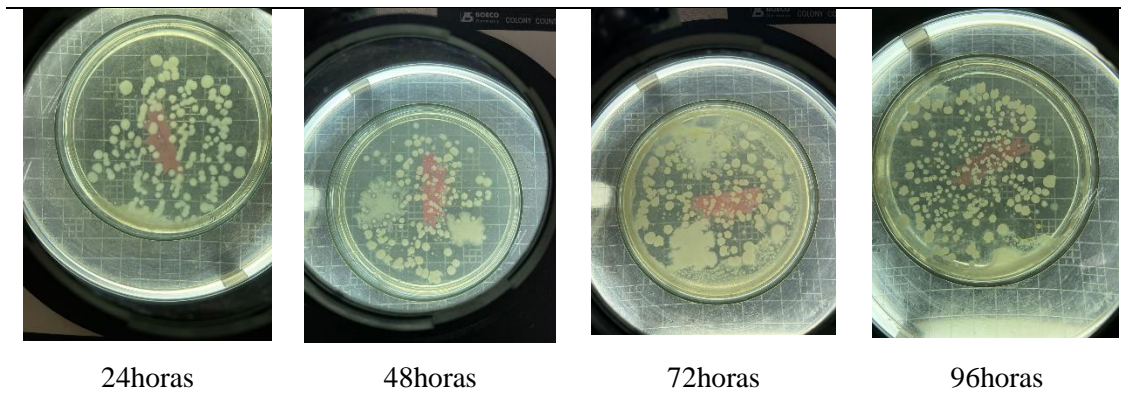
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Salmonella spp</i> | M0S0 | 48 | 18 | 56 | 16 | 1170 | 1 | 737 | 0 |
| | M1S1 | 52 | 19 | 49 | 10 | 1105 | 2 | 650 | 1 |
| | M2S2 | 50 | 12 | 48 | 5 | 1040 | 2 | 542 | 0 |
| | M3S3 | 52 | 11 | 52 | 8 | 1192 | 1 | 672 | 0 |
| | M4S4 | 46 | 13 | 54 | 9 | 1235 | 0 | 498 | 0 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Salmonella spp</i> | M0S0 | 4,8×10 ⁷ | 1,8× 10 ⁶ | 5,6x10 ⁷ | 1,6x10 ⁶ | 1,170x10 ⁹ | 1x10 ⁵ | 7,37x10 ⁸ | 0 |
| | M1S1 | 5,2x10 ⁷ | 1,9× 10 ⁶ | 4,9x10 ⁷ | 1x10 ⁶ | 1,105x10 ⁹ | 2x10 ⁵ | 6,50x10 ⁸ | 1x10 ⁵ |
| | M2S2 | 5x10 ⁷ | 1,2× 10 ⁶ | 4,8x10 ⁷ | 5x10 ⁵ | 1,040x10 ⁹ | 2x10 ⁵ | 5,42x10 ⁸ | 0 |
| | M3S3 | 5,2x10 ⁷ | 1,1× 10 ⁶ | 5,2x10 ⁷ | 8x10 ⁵ | 1,192x10 ⁹ | 1x10 ⁵ | 6,72x10 ⁸ | 0 |
| | M4S4 | 4,6x10 ⁷ | 1,3× 10 ⁶ | 5,4x10 ⁷ | 9x10 ⁵ | 1,235x10 ⁹ | 0 | 4,98x10 ⁸ | 0 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO U: RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (*Cultivo mixto Vs L. monocytogenes*).



Fuente: Garzón J. 2022

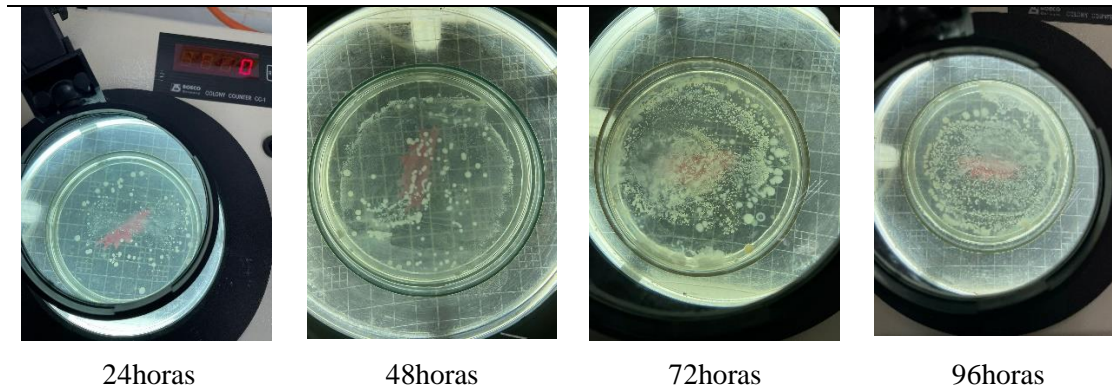
| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Listeria monocytogenes</i> | M0L0 | 43 | 15 | 68 | 18 | 1127 | 10 | 910 | 4 |
| | M1L1 | 52 | 17 | 72 | 21 | 1040 | 16 | 802 | 9 |
| | M2L2 | 49 | 10 | 63 | 15 | 1083 | 7 | 802 | 2 |
| | M3L3 | 56 | 9 | 59 | 19 | 1170 | 5 | 953 | 1 |
| | M4L4 | 53 | 10 | 62 | 18 | 1127 | 6 | 888 | 3 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|---|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Listeria monocytogenes</i> | M0L0 | $4,3 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^6$ | $6,8 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^6$ | $1,127 \times 10^9$ | 1×10^6 | $9,10 \times 10^8$ | 4×10^5 |
| | M1L1 | $5,2 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^6$ | $7,2 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^6$ | $1,040 \times 10^9$ | $1,6 \times 10^6$ | $8,02 \times 10^8$ | 9×10^5 |
| | M2L2 | $4,9 \times 10^7$ | 1×10^6 | $6,3 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^6$ | $1,083 \times 10^9$ | 7×10^5 | $8,02 \times 10^8$ | 2×10^5 |
| | M3L3 | $5,6 \times 10^7$ | 9×10^5 | $5,9 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^6$ | $1,170 \times 10^9$ | 5×10^5 | $9,53 \times 10^8$ | 1×10^5 |
| | M4L4 | $5,3 \times 10^7$ | 1×10^6 | $6,2 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^6$ | $1,127 \times 10^9$ | 6×10^5 | $8,88 \times 10^8$ | 3×10^5 |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO V: RESULTADO DEL ANTAGONISMO DE (*Cultivo mixto Vs E. aureus*).



Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Estafilococo aureus</i> | M0S0 | 27 | 8 | 68 | 14 | 953 | 5 | 867 | 5 |
| | M1S1 | 31 | 10 | 66 | 15 | 932 | 6 | 932 | 4 |
| | M2S2 | 44 | 14 | 74 | 17 | 1018 | 9 | 910 | 7 |
| | M3S3 | 58 | 29 | 67 | 11 | 1040 | 6 | 650 | 6 |
| | M4S4 | 48 | 20 | 65 | 15 | 1105 | 8 | 672 | 7 |

Fuente: Garzón J. 2022

| MUESTRA | REPETICIÓN | 24horas | | 48horas | | 72horas | | 96horas | |
|--|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO | BAL | PATOGENO |
| <i>Cultivo Mixto + Estafilococo aureus</i> | M0S0 | 2,7×10 ⁷ | 8×10 ⁵ | 6,8×10 ⁷ | 1,4×10 ⁶ | 9,53×10 ⁸ | 5×10 ⁵ | 8,67×10 ⁸ | 7×10 ⁵ |
| | M1S1 | 3,1×10 ⁷ | 1×10 ⁶ | 6,6×10 ⁷ | 1,5×10 ⁶ | 9,32×10 ⁸ | 6×10 ⁵ | 9,32×10 ⁸ | 6×10 ⁵ |
| | M2S2 | 4,4×10 ⁷ | 1,4×10 ⁶ | 7,4×10 ⁷ | 1,7×10 ⁶ | 1,018×10 ⁹ | 9×10 ⁵ | 9,10×10 ⁸ | 6×10 ⁵ |
| | M3S3 | 5,8×10 ⁷ | 2,9×10 ⁶ | 6,7×10 ⁷ | 1,1×10 ⁶ | 1,040×10 ⁹ | 6×10 ⁵ | 6,50×10 ⁸ | 5×10 ⁵ |
| | M4S4 | 4,8×10 ⁷ | 2×10 ⁶ | 6,5×10 ⁷ | 1,5×10 ⁶ | 1,105×10 ⁹ | 8×10 ⁵ | 6,72×10 ⁸ | 4×10 ⁵ |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO W: CUADROS DE ADEVA Y COMPARACION DE MEDIAS (MS, LMS, LPS Vs *Salmonella spp*).

BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Análisis a las 24h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | Fcal | p-valor |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|
| TRATAMIENTO | 9,33E+11 | | 2 | 4,67E+11 | 0,01 |
| Error | 6,39E+14 | | 12 | 5,32E+13 | 0,9913 |
| Total | 6,40E+14 | | 14 | | |

P-valor > 0.05: no existen diferencias estadísticas

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.26339

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| MS | 17.72 | 4,96E+07 | A | 0.07 |
| LMS | 17.71 | 4,98E+07 | A | 0.07 |
| LPS | 17.70 | 4,92E+07 | A | 0.7 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 48h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|
| TRATAMIENTO | 2,35E+14 | | 2 | 1,17E+14 | 8,54 |
| Error | 1,65E+14 | | 12 | 1,37E+11 | 0,049 |
| Total | 3,99E+14 | | 14 | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.10830

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|------------------|-------|------|
| LPS | 17.92 | 6,08E+07 | A | 0.03 |
| LMS | 17.90 | 5,94E+07 | A | 0.03 |
| MS | 17.76 | 5,18E+07 | B | 0.03 |

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (p<0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 72h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|-------|
| TRATAMIENTO | 4,78E+16 | | 2 | 2,39E+16 | 3,59 | 0,599 |
| Error | 7,99E+16 | | 12 | 6,65E+15 | | |
| Total | 1,28E+17 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.12403

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| LPS | 20.89 | 1,19E+09 | A | 0.03 |
| MS | 80.96 | 1,15E+09 | A | 0.03 |
| LMS | 2077 | 1,05E+09 | A | 0.03 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p > 0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 96h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 3,01E+16 | | 2 | 1,51E+16 | 1,13 | 0,3559 |
| Error | 1,60E+17 | | 12 | 1,34E+16 | | |
| Total | 1,90E+17 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.28920

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| LMS | 20.39 | 7,28E+08 | A | 0.08 |
| LPS | 20.34 | 6,89E+08 | A | 0.08 |
| MS | 20.44 | 6,20E+08 | A | 0.08 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p > 0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Salmonella spp

Análisis a las 24h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 1,33E+09 | 2 | 6,67E+08 | 0,01 | 0,9913 |
| Error | 9,12E+11 | 12 | 7,60E+10 | | |
| Total | 9,13E+11 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.30998

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| LMS | 14.20 | 1,48E+06 | A | 0.08 |
| LPS | 14.18 | 1,46E+06 | A | 0.08 |
| MS | 14.17 | 1,46E+06 | A | 0.08 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 48h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 1,12E+11 | 2 | 5,60E+10 | 0,47 | 0,6349 |
| Error | 1,42E+12 | 12 | 1,19E+11 | | |
| Total | 1,54E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.67688

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| MS | 13.71 | 9,60E+05 | A | 0.18 |
| LPS | 13.52 | 8,00E+05 | A | 0.18 |
| LMS | 13.49 | 7,60E+05 | A | 0.18 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 72h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 3,23E+11 | | 2 | 1,61E+11 | 2,59 | 0,1201 |
| Error | 6,86E+11 | | 12 | 6,24E+10 | | |
| Total | 1,01E+12 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 1.22316

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| LPS | 12.88 | 5,20E+05 | A | 0.31 |
| LMS | 12.43 | 2,80E+05 | A | 0.31 |
| MS | 11.86 | 1,50E+05 | A | 0.34 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 96h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 5,00E+10 | | 2 | 5,00E+10 | 0,45 | 0,5485 |
| Error | 3,30E+11 | | 12 | 1,10E+11 | | |
| Total | 3,80E+11 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 3.70239

| Tratam | Medias | Medias ajustadas | Rango | E.E. |
|--------|--------|---------------------|-------|------|
| LMS | - | - | A | - |
| LPS | 12.38 | 3,50E+05 | B | 0.52 |
| MS | 11.51 | 1,00E+05 | B | 1.04 |

Medias con letras diferente difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO X: CUADROS DE ADEVA Y COMPARACION DE MEDIAS (ME, LME, LPE Vs S. aureus).

BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Análisis a las 24h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 1,80E+14 | | 2 | 8,99E+13 | 1 | 0,3956 |
| Error | 1,08E+15 | | 12 | 8,96E+13 | | |
| Total | 1,25E+15 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.40122

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LME | 17.61 | 4,48E+07 | A | 0.11 |
| ME | 17.51 | 4,16E+07 | A | 0.11 |
| LPE | 17.39 | 4,48E+07 | A | 0.11 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 48h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 6,33E+13 | | 2 | 3,17E+13 | 2,29 | 0,1438 |
| Error | 1,66E+14 | | 12 | 1,38E+13 | | |
| Total | 2,29E+14 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.9435

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ME | 18.04 | 6,80E+07 | A | 0.03 |
| LME | 18.00 | 6,60E+07 | A | 0.03 |
| LPE | 17.96 | 6,30E+07 | A | 0.03 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 72h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----|----------|----------------|
| TRATAMIENTO | 3,55E+18 | | 2 | 1,77E+18 | 414,14 <0,0001 |
| Error | 5,14E+17 | | 12 | 1,77E+18 | |
| Total | 3,60E+18 | | 14 | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.10913

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LME | 20.88 | 1,17E+09 | A | 0.03 |
| ME | 20.73 | 1,01E+09 | B | 0.03 |
| LPE | 18.02 | 6,72E+07 | C | 0.03 |

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 96h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----|----------|------------|
| TRATAMIENTO | 4,23E+16 | | 2 | 2,12E+16 | 1,3 0,3093 |
| Error | 1,96E+17 | | 12 | 1,63E+16 | |
| Total | 2,38E+17 | | 14 | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.30163

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ME | 20.50 | 6,20E+08 | A | 0.08 |
| LPE | 20.37 | 7,15E+08 | A | 0.08 |
| LME | 20.33 | 6,80E+08 | A | 0.08 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Estafilococos aureus

Análisis a las 24h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 6,81E+11 | 2 | 3,41E+11 | 1,03 | 0,3882 |
| Error | 3,99E+12 | 12 | 3,32E+11 | | |
| Total | 4,67E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.68518

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ME | 14.19 | 1,62E+06 | A | 0.18 |
| LPE | 13.99 | 1,24E+06 | A | 0.18 |
| LME | 13.89 | 1,12E+06 | A | 0.18 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 48h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 6,65E+11 | 2 | 3,33E+11 | 2,76 | 0,1029 |
| Error | 1,44E+12 | 12 | 1,20E+11 | | |
| Total | 2,11E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.31742

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LPE | 14.47 | 1,94E+06 | A | 0.08 |
| LME | 14.38 | 1,80E+06 | A | 0.08 |
| ME | 14.17 | 1,44E+06 | A | 0.08 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 72h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 4,85E+11 | | 2 | 2,43E+11 | 6,74 | 0,0109 |
| Error | 4,32E+11 | | 12 | 3,60E+10 | | |
| Total | 9,17E+11 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.51599

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LME | 13.85 | 1,04E+06 | A | 0.14 |
| ME | 13.40 | 6,80E+05 | AB | 0.14 |
| LPE | 13.29 | 6,40E+05 | B | 0.14 |

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

Análisis a las 96h de siembra

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 6,53E+10 | | 2 | 3,27E+10 | 1,34 | 0,2978 |
| Error | 2,92E+11 | | 12 | 2,43E+10 | | |
| Total | 3,57E+11 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.78315

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LME | 13.22 | 5,60E+05 | A | 0.21 |
| ME | 13.22 | 5,60E+05 | A | 0.21 |
| LPE | 12.78 | 4,20E+05 | A | 0.21 |

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO Y: CUADROS DE ADEVA Y COMPARACION DE MEDIAS (*ML, LML, LPL Vs S. aureus*).

BACTERIAS ACIDO LACTICAS

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 6,17E+13 | 2 | 3,09E+13 | 0,83 | 0,4603 |
| Error | 4,47E+14 | 12 | 3,73E+13 | | |
| Total | 5,09E+14 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.22041

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ML | 17.74 | 5,06E+07 | A | 0.06 |
| LML | 17.64 | 4,62E+07 | A | 0.06 |
| LPL | 17.64 | 4,62E+07 | A | 0.06 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 2,21E+14 | 2 | 1,11E+14 | 4,63 | 0,0324 |
| Error | 2,87E+14 | 12 | 2,39E+13 | | |
| Total | 5,08E+14 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.13261

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LML | 18.06 | 6,98E+07 | A | 0.04 |
| ML | 17.98 | 6,48E+07 | AB | 0.04 |
| LPL | 17.91 | 6,04E+07 | B | 0.04 |

Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (p>0.05)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 6,31E+15 | 2 | 3,15E+15 | 0,87 | 0,4444 |
| Error | 4,36E+16 | 12 | 3,63E+15 | | |
| Total | 4,99E+16 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.09364

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ML | 20.82 | 1,11E+09 | A | 0.02 |
| LML | 20.82 | 1,11E+09 | A | 0.02 |
| LPL | 20.78 | 1,07E+09 | A | 0.02 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|-----|---------|
| TRATAMIENTO | 2,99E+15 | 2 | 1,50E+15 | 0,2 | 0,819 |
| Error | 8,84E+16 | 12 | 7,37E+15 | | |
| Total | 9,14E+16 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.17654

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ML | 20.58 | 8,11E+08 | A | 0.05 |
| LML | 20.56 | 8,54E+08 | A | 0.05 |
| LPL | 20.54 | 8,36E+08 | A | 0.05 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

Listeria monocytogenes

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 2,89E+11 | 2 | 1,45E+11 | 1,37 | 0,2914 |
| Error | 1,27E+12 | 12 | 1,06E+11 | | |
| Total | 1,56E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.40445

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LML | 14.25 | 1,56E+06 | A | 0.11 |

| | | | | |
|-----|-------|----------|---|------|
| LPL | 14.11 | 1,38E+06 | A | 0.11 |
| ML | 13.98 | 1,22E+06 | A | 0.11 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 7,96E+11 | 2 | 3,98E+11 | 3,44 | 0,0659 |
| Error | 1,39E+12 | 12 | 1,16E+11 | | |
| Total | 2,18E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.40445

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| ML | 14.41 | 1,82E+06 | A | 0.12 |
| LML | 14.20 | 1,48E+06 | A | 0.12 |
| LPL | 13.98 | 1,26E+06 | A | 0.12 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|----------|------|---------|
| TRATAMIENTO | 6,84E+11 | 2 | 3,42E+11 | 3,61 | 0,0591 |
| Error | 1,14E+12 | 12 | 9,47E+10 | | |
| Total | 1,82E+12 | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.53130

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LML | 14.07 | 1,30E+06 | A | 0.14 |
| LPL | 13.60 | 8,20E+05 | A | 0.14 |
| ML | 13.60 | 8,80E+05 | A | 0.14 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor | |
|-------------|----------|----|----|----------|---------|--------|
| TRATAMIENTO | 1,21E+11 | | 2 | 6,07E+10 | 1,09 | 0,3674 |
| Error | 6,68E+11 | | 12 | 5,57E+10 | | |
| Total | 7,89E+11 | | 14 | | | |

Fuente: Garzón J. 2022

CUADRO DE MEDIAS

Test: Tukey Alfa= 0.05 DMS= 0.53130

| Tratam | Medias ajustadas | Medias transformadas | Rango | E.E. |
|--------|------------------|----------------------|-------|------|
| LPL | 13.25 | 5,80E+05 | A | 0.26 |
| LML | 13.14 | 5,60E+05 | A | 0.26 |
| ML | 12.59 | 3,80E+05 | A | 0.26 |

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($p > 0.05$)

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO Z: PRUEBA T STUDEN PARA (*Bacterias ácido lácticas vs Salmonella spp*)

Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LMS | 1 | 5,80E+07 | 1,30E+06 | 6,20E+07 | 5,00E+05 | 1,17E+09 | 1,00E+05 | 8,67E+08 | 0,00E+00 |
| LMS | 2 | 5,50E+07 | 1,70E+06 | 6,30E+07 | 1,10E+06 | 9,75E+08 | 2,00E+05 | 6,72E+08 | 0,00E+00 |
| LMS | 3 | 5,40E+07 | 1,50E+06 | 5,90E+07 | 5,00E+05 | 9,97E+08 | 4,00E+05 | 8,67E+08 | 0,00E+00 |
| LMS | 4 | 4,30E+07 | 1,50E+06 | 5,50E+07 | 1,00E+06 | 9,53E+08 | 4,00E+05 | 5,42E+08 | 0,00E+00 |
| LMS | 5 | 3,90E+07 | 1,40E+06 | 5,80E+07 | 7,00E+05 | 1,17E+09 | 3,00E+05 | 6,93E+08 | 0,00E+00 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: Salmonella spp.

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs Salmonella spp a las 24 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|------------------------------|----------------|
| | 24 horas | 24 horas |
| | Lactobacillus malefermentans | Salmonella spp |
| Media | 49800000 | 1480000 |
| Varianza | 6,87E+13 | 2,2E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,09760938 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |

| | |
|------------------|------------|
| Estadístico t | 13,0564079 |
| P(T<=t) una cola | 9,9319E-05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *Salmonella* spp a las 48 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| | 48 horas | |
| | Lactobacillus malefermentans | 48 horas <i>Salmonella</i> spp |
| Media | 59400000 | 760000 |
| Varianza | 1,03E+13 | 7,8E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,08925326 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 40,3924194 | |
| P(T<=t) una cola | 1,1224E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *Salmonella* spp a las 72 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|---------------------------------|--------------------------|
| | 72 horas | 72 horas |
| | Lactobacillus malefermentans | <i>Salmonella</i> spp |
| Media | 1053000000 | 280000 |
| Varianza | 1,165E+16 | 1,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,55426378 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 21,794822 | |
| P(T<=t) una cola | 1,3111E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *Salmonella* spp a las 96 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 96 horas | 96 horas |
|--|----------------|------------|
| | Lactobacillus | Salmonella |
| | malefermentans | spp |
| Media | 728200000 | 0 |
| Varianza | 1,94E+16 | 0 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 11,6906368 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00015306 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella* spp

| TRATAM | REPETICION | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LPS | 1 | 4,70E+07 | 1,40E+06 | 5,90E+07 | 6,00E+05 | 1,24E+09 | 4,00E+05 | 6,93E+08 | 1,00E+05 |
| LPS | 2 | 3,50E+07 | 1,90E+06 | 6,10E+07 | 5,00E+05 | 1,19E+09 | 1,00E+05 | 5,85E+08 | 0 |
| LPS | 3 | 5,90E+07 | 1,50E+06 | 6,80E+07 | 1,00E+06 | 1,24E+09 | 7,00E+05 | 7,58E+08 | 1,00E+05 |
| LPS | 4 | 5,50E+07 | 1,30E+06 | 5,60E+07 | 6,00E+05 | 1,15E+09 | 3,00E+05 | 5,85E+08 | 4,00E+05 |
| LPS | 5 | 5,00E+07 | 1,20E+06 | 6,00E+07 | 1,30E+06 | 1,13E+09 | 1,10E+06 | 8,23E+08 | 8,00E+05 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: Salmonella spp.

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella* spp a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 24 horas | 24 horas |
|--|---------------------------|-------------------|
| | <i>Lentilactobacillus</i> | <i>Salmonella</i> |
| | <i>parakefiri</i> | <i>spp</i> |
| Media | 49800000 | 1480000 |
| Varianza | 6,87E+13 | 2,2E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,09760938 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 13,0564079 | |
| P(T<=t) una cola | 9,9319E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella* spp a las 48 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 48 horas | 48 horas |
|--|---------------------------|-------------------|
| | <i>Lentilactobacillus</i> | <i>Salmonella</i> |
| | <i>parakefiri</i> | <i>spp</i> |
| Media | 59400000 | 760000 |
| Varianza | 1,03E+13 | 7,8E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,08925326 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 40,3924194 | |
| P(T<=t) una cola | 1,1224E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella spp* a las 72 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 72 horas | 72 horas |
|--|---------------------------|-------------------|
| | <i>Lentilactobacillus</i> | <i>Salmonella</i> |
| | <i>parakefiri</i> | <i>spp</i> |
| Media | 1053000000 | 280000 |
| Varianza | 1,165E+16 | 1,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,55426378 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 21,794822 | |
| P(T<=t) una cola | 1,3111E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *Salmonella spp* a las 96 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 96 horas | 96 horas |
|--|---------------------------|-------------------|
| | <i>Lentilactobacillus</i> | <i>Salmonella</i> |
| | <i>parakefiri</i> | <i>spp</i> |
| Media | 728200000 | 0 |
| Varianza | 1,94E+16 | 0 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |

| | |
|--------------------|------------|
| Grados de libertad | 4 |
| Estadístico t | 11,6906368 |
| P(T<=t) una cola | 0,00015306 |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *Salmonella spp*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| MS | 1 | 4,80E+07 | 1,80E+06 | 5,60E+07 | 1,60E+06 | 1,17E+09 | 1,00E+05 | 7,37E+08 | 0,00E+00 |
| MS | 2 | 5,20E+07 | 1,90E+06 | 4,90E+07 | 1,00E+06 | 1,11E+09 | 2,00E+05 | 6,50E+08 | 1,00E+05 |
| MS | 3 | 5,00E+07 | 1,20E+06 | 4,80E+07 | 5,00E+05 | 1,04E+09 | 2,00E+05 | 5,42E+08 | 0,00E+00 |
| MS | 4 | 5,20E+07 | 1,10E+06 | 5,20E+07 | 8,00E+05 | 1,19E+09 | 1,00E+05 | 6,72E+08 | 0,00E+00 |
| MS | 5 | 4,60E+07 | 1,30E+06 | 5,40E+07 | 9,00E+05 | 1,24E+09 | 0,00E+00 | 4,98E+08 | 0,00E+00 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: *Salmonella spp*.

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *Salmonella spp* a las 24 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| | 24 horas Cultivo mixto | 24 horas <i>Salmonella spp</i> |
| Media | 50000000 | 1375000 |
| Varianza | 8E+12 | 1,2917E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,26233033 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 3 | |
| Estadístico t | 35,2859567 | |
| P(T<=t) una cola | 2,5025E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *Salmonella spp* a las 48 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| | 48 horas Cultivo mixto | 48 horas <i>Salmonella spp</i> |
| Media | 50750000 | 800000 |
| Varianza | 7,5833E+12 | 4,6667E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,44826545 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 3 | |

| | |
|------------------|------------|
| Estadístico t | 37,5006059 |
| P(T<=t) una cola | 2,0855E-05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *Salmonella spp* a las 72 horas

| | 72horas Cultivo mixto | 72 horas <i>Salmonella</i> <i>spp</i> |
|--|--------------------------|---|
| Media | 1143000000 | 125000 |
| Varianza | 7,6393E+15 | 9166666667 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,92811377 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 3 | |
| Estadístico t | 26,1252018 | |
| P(T<=t) una cola | 6,1514E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *Salmonella spp* a las 96 horas

| | 96 horas Cultivo mixto | 96 horas <i>Salmonella spp</i> |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| Media | 590500000 | 25000 |
| Varianza | 7,0303E+15 | 2500000000 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,47308344 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 3 | |
| Estadístico t | 14,0885413 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00038728 | |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO AA: PRUEBA T STUDEN PARA (Bacterias acido lácticas vs *S. aureus*)

Lactobacillus malefermentans Vs *S. aureus*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LME | 1 | 3,90E+07 | 1,20E+06 | 6,10E+07 | 1,70E+06 | 1,17E+09 | 1,00E+06 | 7,15E+08 | 7,00E+05 |
| LME | 2 | 4,20E+07 | 1,60E+06 | 6,80E+07 | 1,50E+06 | 1,15E+09 | 1,10E+06 | 5,20E+08 | 6,00E+05 |
| LME | 3 | 3,80E+07 | 1,20E+06 | 6,90E+07 | 1,80E+06 | 1,32E+09 | 9,00E+05 | 8,23E+08 | 6,00E+05 |

| | | | | | | | | | |
|-----|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LME | 4 | 5,10E+07 | 9,00E+05 | 6,20E+07 | 2,60E+06 | 1,11E+09 | 1,20E+06 | 6,28E+08 | 5,00E+05 |
| LME | 5 | 5,40E+07 | 7,00E+05 | 7,00E+07 | 1,40E+06 | 1,11E+09 | 1,00E+06 | 7,15E+08 | 4,00E+05 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: *S. aureus*

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *S. aureus* a las 24 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | 24 horas | |
| | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | 24 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 44800000 | 1120000 |
| Varianza | 5,27E+13 | 1,17E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,76315188 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 12,9817297 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00010158 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *S. aureus* a las 48 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | 48 horas | |
| | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | 48 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 66000000 | 1800000 |
| Varianza | 1,75E+13 | 2,25E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,61734197 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 31,9604775 | |
| P(T<=t) una cola | 2,8565E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *S. aureus* a las 72 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | 72 horas | |
| | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | 72 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 1170000000 | 1040000 |
| Varianza | 8,0095E+15 | 1,3E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,74479922 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 29,178966 | |
| P(T<=t) una cola | 4,1063E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *S. aureus* a las 96 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | 96 horas | |
| | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | 96 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 680200000 | 560000 |
| Varianza | 1,2801E+16 | 1,3E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,03372102 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 13,4326473 | |
| P(T<=t) una cola | 8,8838E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *S. aureus*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LPE | 1 | 4,10E+07 | 1,00E+06 | 5,80E+07 | 1,60E+06 | 6,50E+07 | 9,00E+05 | 5,42E+08 | 7,00E+05 |
| LPE | 2 | 3,70E+07 | 1,30E+06 | 6,50E+07 | 1,90E+06 | 6,70E+07 | 6,00E+05 | 6,28E+08 | 4,00E+05 |
| LPE | 3 | 2,90E+07 | 7,00E+05 | 6,70E+07 | 2,00E+06 | 7,20E+07 | 3,00E+05 | 7,80E+08 | 1,00E+05 |
| LPE | 4 | 2,90E+07 | 1,50E+06 | 6,20E+07 | 2,40E+06 | 6,90E+07 | 5,00E+05 | 7,37E+08 | 4,00E+05 |
| LPE | 5 | 4,60E+07 | 1,70E+06 | 6,30E+07 | 1,80E+06 | 6,30E+07 | 9,00E+05 | 8,88E+08 | 5,00E+05 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: *S. aureus*

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *S. aureus* a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 24 horas | |
|--|--------------------------------------|---------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 24 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 36400000 | 1240000 |
| Varianza | 5,58E+13 | 1,58E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,45634537 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 10,7741302 | |
| P(T<=t) una cola | 0,0002104 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *S. aureus* a las 48 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 48 horas | |
|--|--------------------------------------|---------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 48 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 63000000 | 1940000 |
| Varianza | 1,15E+13 | 8,8E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,34791871 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 41,3778333 | |
| P(T<=t) una cola | 1,0194E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *S. aureus* a las 72 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 72 horas | |
|-------|--------------------------------------|---------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 72 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 67200000 | 640000 |

| | | |
|--|-------------|---------|
| Varianza | 1,22E+13 | 6,8E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,97164786 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 39,7233344 | |
| P(T<=t) una cola | 1,1998E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *S. aureus* a las 96 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|--------------------------------------|---------------------------|
| | 96horas | |
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 96 horas <i>S. aureus</i> |
| Media | 715000000 | 420000 |
| Varianza | 1,8034E+16 | 4,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,46456053 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 11,8895056 | |
| P(T<=t) una cola | 0,0001433 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *S. aureus*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ME | 1 | 2,70E+07 | 8,00E+05 | 6,80E+07 | 1,40E+06 | 9,53E+08 | 5,00E+05 | 8,67E+08 | 7,00E+05 |
| ME | 2 | 3,10E+07 | 1,00E+06 | 6,60E+07 | 1,50E+06 | 9,32E+08 | 6,00E+05 | 9,32E+08 | 6,00E+05 |
| ME | 3 | 4,40E+07 | 1,40E+06 | 7,40E+07 | 1,70E+06 | 1,02E+09 | 9,00E+05 | 9,10E+08 | 6,00E+05 |
| ME | 4 | 5,80E+07 | 2,90E+06 | 6,70E+07 | 1,10E+06 | 1,04E+09 | 6,00E+05 | 6,50E+08 | 5,00E+05 |
| ME | 5 | 4,80E+07 | 2,00E+06 | 6,50E+07 | 1,50E+06 | 1,11E+09 | 8,00E+05 | 6,72E+08 | 4,00E+05 |

BAL: Bacterias ácido lácticas

PAT: *S. aureus*

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *S. aureus* a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | <i>24BAL</i> | <i>24PAT</i> |
|--|--------------|--------------|
| Media | 41600000 | 1620000 |
| Varianza | 1,603E+14 | 7,22E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,96299581 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 7,54737382 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00082555 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *S. aureus* a las 48 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | <i>48BAL</i> | <i>48PAT</i> |
|--|--------------|--------------|
| Media | 68000000 | 1440000 |
| Varianza | 1,25E+13 | 4,8E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,51639778 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 43,4226522 | |
| P(T<=t) una cola | 8,4086E-07 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *S. aureus* a las 72 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | <i>72BAL</i> | <i>72PAT</i> |
|--|--------------|--------------|
| Media | 1009600000 | 680000 |
| Varianza | 4,8303E+15 | 2,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,59675618 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 32,5062649 | |
| P(T<=t) una cola | 2,67E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs *S. aureus* a las 96 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|------------|---------|
| | 96BAL | 96PAT |
| Media | 806200000 | 560000 |
| Varianza | 1,8176E+16 | 1,3E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,78943533 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 13,3710177 | |
| P(T<=t) una cola | 9,0457E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

ANEXO BB: PRUEBA T STUDEN PARA (Bacterias ácido lácticas vs *L. monocytogenes*)

Lactobacillus malefermentans Vs *L. monocytogenes*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LML | 1 | 4,20E+07 | 1,20E+06 | 7,20E+07 | 1,50E+06 | 1,15E+09 | 1,50E+06 | 9,75E+08 | 8,00E+05 |
| LML | 2 | 3,80E+07 | 1,60E+06 | 6,50E+07 | 1,70E+06 | 1,17E+09 | 1,20E+06 | 6,72E+08 | 5,00E+05 |
| LML | 3 | 4,60E+07 | 1,50E+06 | 7,30E+07 | 1,40E+06 | 1,02E+09 | 1,20E+06 | 8,45E+08 | 2,00E+05 |
| LML | 4 | 5,40E+07 | 1,90E+06 | 6,80E+07 | 1,20E+06 | 1,13E+09 | 1,00E+06 | 9,10E+08 | 6,00E+05 |
| LML | 5 | 5,20E+07 | 1,60E+06 | 7,10E+07 | 1,60E+06 | 1,08E+09 | 1,60E+06 | 8,67E+08 | 7,00E+05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *L. monocytogenes* a las 24 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|---|-------------------------------------|
| | 24 horas <i>Lactobacillus</i> <i>malefermentans</i> | 24 horas <i>L. monocytogenes</i> |
| Media | 46400000 | 1560000 |
| Varianza | 4,48E+13 | 6,3E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,60714286 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |

| | |
|--------------------|------------|
| Grados de libertad | 4 |
| Estadístico t | 15,3218802 |
| P(T<=t) una cola | 5,2922E-05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *L. monocytogenes* a las 48 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-----------------------|----------------------|
| | 24 horas | |
| | <i>Lactobacillus</i> | 24 horas <i>L.</i> |
| | <i>malefermentans</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 69800000 | 1480000 |
| Varianza | 1,07E+13 | 3,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,24634227 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 45,9632451 | |
| P(T<=t) una cola | 6,7005E-07 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *L. monocytogenes* a las 72 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|-----------------------|----------------------|
| | 24 horas | |
| | <i>Lactobacillus</i> | 24 horas <i>L.</i> |
| | <i>malefermentans</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 1109200000 | 1300000 |
| Varianza | 3,6307E+15 | 6E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,04065186 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 41,1069293 | |
| P(T<=t) una cola | 1,0465E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lactobacillus malefermentans Vs *L. monocytogenes* a las 96 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 24 horas | |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|
| | <i>Lactobacillus</i> | 24 horas <i>L.</i> |
| | <i>malefermentans</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 853800000 | 560000 |
| Varianza | 1,2788E+16 | 5,3E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0,45383666 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 16,8873195 | |
| P(T<=t) una cola | 3,6041E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *L. monocytogenes*

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LPL | 1 | 4,10E+07 | 1,40E+06 | 6,30E+07 | 1,00E+06 | 1,02E+09 | 7,00E+05 | 9,10E+08 | 5,00E+05 |
| LPL | 2 | 4,60E+07 | 1,90E+06 | 6,80E+07 | 1,70E+06 | 1,17E+09 | 9,00E+05 | 8,88E+08 | 4,00E+05 |
| LPL | 3 | 5,50E+07 | 1,50E+06 | 6,00E+07 | 1,90E+06 | 1,02E+09 | 9,00E+05 | 8,02E+08 | 7,00E+05 |
| LPL | 4 | 5,00E+07 | 1,10E+06 | 5,90E+07 | 1,00E+06 | 1,11E+09 | 1,00E+06 | 7,37E+08 | 6,00E+05 |
| LPL | 5 | 3,90E+07 | 1,00E+06 | 5,20E+07 | 7,00E+05 | 1,02E+09 | 6,00E+05 | 8,45E+08 | 7,00E+05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *L. monocytogenes* a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 24 horas | |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| | <i>Lentilactobacillus</i> | 24 horas <i>L.</i> |
| | <i>parakefiri</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 46200000 | 1380000 |
| Varianza | 4,27E+13 | 1,27E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0,27053581 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 15,544706 | |
| P(T<=t) una cola | 4,9992E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *L. monocytogenes* a las 48 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 48 horas | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 48 horas <i>L. monocytogenes</i> |
| Media | 60400000 | 1260000 |
| Varianza | 3,43E+13 | 2,63E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,62261083 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 23,8192931 | |
| P(T<=t) una cola | 9,2113E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *L. monocytogenes* a las 72 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 72 horas | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 72 horas <i>L. monocytogenes</i> |
| Media | 1065800000 | 820000 |
| Varianza | 4,8122E+15 | 2,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,61015956 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 34,3781091 | |
| P(T<=t) una cola | 2,1357E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Lentilactobacillus parakefiri Vs *L. monocytogenes* a las 96 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

| | 96 horas | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> | 96 horas <i>L. monocytogenes</i> |

| | | |
|--|-------------|---------|
| Media | 836400000 | 580000 |
| Varianza | 4,8043E+15 | 1,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,56045394 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 26,9354699 | |
| P(T<=t) una cola | 5,6473E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs L. monocytogenes

| TRATAM | REPET | 24BAL | 24PAT | 48BAL | 48PAT | 72BAL | 72PAT | 96BAL | 96PAT |
|--------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ML | 1 | 4,30E+07 | 1,50E+06 | 6,80E+07 | 1,80E+06 | 1,13E+09 | 1,00E+06 | 9,10E+08 | 4,00E+05 |
| ML | 2 | 5,20E+07 | 1,70E+06 | 7,20E+07 | 2,10E+06 | 1,04E+09 | 1,60E+06 | 8,02E+08 | 9,00E+05 |
| ML | 3 | 4,90E+07 | 1,00E+06 | 6,30E+07 | 1,50E+06 | 1,08E+09 | 7,00E+05 | 8,02E+08 | 2,00E+05 |
| ML | 4 | 5,60E+07 | 9,00E+05 | 5,90E+07 | 1,90E+06 | 1,17E+09 | 5,00E+05 | 9,53E+08 | 1,00E+05 |
| ML | 5 | 5,30E+07 | 1,00E+06 | 6,20E+07 | 1,80E+06 | 1,13E+09 | 6,00E+05 | 8,88E+08 | 3,00E+05 |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs L. monocytogenes a las 24 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|----------------------|----------------------|
| | 24 horas | 24 horas L. |
| | <i>Cultivo mixto</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 50600000 | 1220000 |
| Varianza | 2,43E+13 | 1,27E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,47816115 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 21,6101411 | |
| P(T<=t) una cola | 1,3562E-05 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs L. monocytogenes a las 48 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|----------------------|----------------------|
| | 48 horas | 48 horas L. |
| | <i>Cultivo mixto</i> | <i>monocytogenes</i> |

| | | |
|--|------------|---------|
| Media | 64800000 | 1820000 |
| Varianza | 2,67E+13 | 4,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,47312 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 27,7863157 | |
| P(T<=t) una cola | 4,9895E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs L. monocytogenes a las 72 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|----------------------|----------------------|
| | <i>72 horas</i> | <i>72 horas L.</i> |
| | <i>Cultivo mixto</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 1109400000 | 880000 |
| Varianza | 2,4513E+15 | 1,97E+11 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,80841407 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 49,7036503 | |
| P(T<=t) una cola | 4,9023E-07 | |

Fuente: Garzón J. 2022

Cultivo mixto Vs L. monocytogenes a las 96 horas

| Prueba t para medias de dos muestras emparejadas | | |
|--|----------------------|----------------------|
| | <i>96 horas</i> | <i>96 horas L.</i> |
| | <i>Cultivo mixto</i> | <i>monocytogenes</i> |
| Media | 871000000 | 380000 |
| Varianza | 4,514E+15 | 9,7E+10 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | -0,56152775 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 28,9001889 | |
| P(T<=t) una cola | 4,2664E-06 | |

Fuente: Garzón J. 2022



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 16 / 09 / 2022

| |
|--|
| INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S) |
| Nombres – Apellidos: Jannis Coralia Garzón Proaño |
| INFORMACIÓN INSTITUCIONAL |
| Facultad: Ciencias Pecuarias |
| Carrera: Agroindustria |
| Título a optar: Ingeniera Agroindustrial |
| f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz |


Ing. Cristhian Fernando Castillo



1813-DBRA-UTP-2022

