



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO *in vitro*, DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS E IDENTIFICADAS
MOLECULARMENTE DEL CONTENIDO RUMINAL DE VACAS
FISTULADAS**

AUTOR: GUANOCHANGA AMORES, ERIKA JOHANNA

DIRECTOR: Dr. RUEDA ORTIZ, DARWIN ARTURO

SANGOLQUÍ

2019



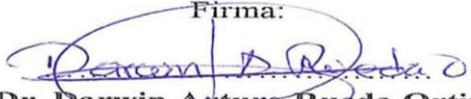
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO in vitro, DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS E IDENTIFICADAS MOLECULARMENTE DEL CONTENIDO RUMINAL DE VACAS FISTULADAS*” fue realizado por la señorita *Guanochanga Amores, Erika Johanna* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de octubre de 2019

Firma:


Dr. Darwin Arturo Rueda Ortiz
CC: 0400688727



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Guanochanga Amores, Erika Johanna*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Evaluación del potencial antagónico in vitro, de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 29 de octubre de 2019

Firma:

Guanochanga Amores Erika Johanna

CC: 1723333009



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

*Yo, **Guanochanga Amores, Erika Johanna** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del potencial antagónico in vitro, de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.***

Sangolquí, 29 de octubre de 2019

Firma:

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dotted line. The signature is stylized and appears to read 'Erika Johanna Amores Guanochanga'.

Guanochanga Amores Erika Johanna

CC: 1723333009

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida, por haber confiado en mí, por motivarme y brindarme todo su amor.

AGRADECIMIENTO

Agradezco

A Dios y a la Virgen María por haberme guiado, por iluminar mi camino y brindarme la fortaleza necesaria para enfrentar los problemas que se presentaron a lo largo de mi vida.

A mi madre Rocío por haber caminado junto a mí en todo momento, por su amor, comprensión y ternura.

A mi padre Geovanny por ser el pilar fundamental de mi vida, por los valores que me inculcó por aconsejarme en los momentos más tristes de mi vida.

A mi hermano William, por sus enseñanzas de superación, amor y lealtad. Por estar conmigo en todo momento aconsejándome y siendo mi confidente.

A mis profesores Dr. Darwin Rueda, Ing. Diego Vela y Dr. Carlos Chiriboga por la confianza que depositaron en mí, por sus enseñanzas y tiempo brindado para lograr culminar el proyecto de investigación.

Al Ing. Gustavo Naranjo por su apoyo y enseñanzas durante toda la investigación.

A mis amigos Gary y David por haber sido una parte fundamental en mi vida, por su confianza, amor y apoyo incondicional en todo momento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS**CARÁTULA**

CERTIFICADO DEL DIRECTOR	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii

CAPÍTULO I**INTRODUCCIÓN**

1.1	Antecedentes	1
1.2	Justificación.....	2
1.3	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
1.4	Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II**REVISIÓN DE LITERATURA**

2.1	Generalidades del ganado bovino	5
2.2	Generalidades de la digestión	7

2.2.1	Proceso digestivo de terneros.....	11
2.3	Problemas digestivos en terneros.....	12
2.4	Probióticos	15
2.4.1	Antagonismo	16

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1	Área de estudio.....	20
3.2	Ubicación del lugar de investigación	20
3.2.1	Ubicación Geográfica.....	20
3.2.2	Ubicación Ecológica	20
3.3	Secuestro de bacterias	21
3.4	Aislamiento de bacterias	22
3.4.1	Pruebas bioquímicas complementarias	23
3.4.2	Identificación molecular de bacterias.....	24
3.4.2.1	Extracción de ADN.....	24
3.4.2.2	Secuenciación del gen 16S ADNr.....	25
3.5	Evaluación del antagonismo	26
3.5.1	Bacterias indicadoras	26
3.5.2	Pruebas de antagonismo en concentración fija	26
3.5.3	Efecto de la concentración de las Bacterias ácido lácticas	28
3.6	Cinética de crecimiento.....	29

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Aislamiento bacteriano	30
4.2	Pruebas Bioquímicas.....	33
4.3	Identificación molecular.....	35
4.4	Pruebas de antagonismo In vitro.....	39
4.4.1	Bacterias indicadoras	39
4.4.2	Pruebas de antagonismo en concentración fija	39
4.4.3	Efecto de la concentración de las BAL.....	44
4.5	Cinética de crecimiento.....	46

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	48
5.2	Recomendaciones.....	49
5.3	Bibliografía	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Medios nutritivos para secuestro de bacterias del rumen.....</i>	21
Tabla 2	<i>Códigos de las muestras</i>	22
Tabla 3	<i>Pruebas bioquímicas metabolismo bacteriano.....</i>	23
Tabla 4	<i>Morfología de las colonias y Resultados de la Tinción Gram de los 21 aislados.....</i>	31
Tabla 5	<i>Pruebas Bioquímicas de las 21 cepas aisladas del rumen</i>	34
Tabla 6	<i>Identificación molecular de las cepas aisladas del rumen y una cepa aislada de heces de ternero.....</i>	36
Tabla 7	<i>Comparación de las 14 cepas con las bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank)</i>	37
Tabla 8	<i>Comparación con las bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences y Nucleotide collection (GenBank) de los 5 Bacilos Gram negativos.....</i>	38
Tabla 9	<i>Organismos indicadores para realizar pruebas de antagonismo</i>	39
Tabla 10	<i>Resultados de los halos de inhibición (mm) de las 14 Bacterias Ácido Lácticas frente a las 5 enterobacterias aisladas. Se muestra la media \pmDE de cada cepa BAL y de cada enterobacteria.....</i>	41
Tabla 11	<i>Evaluación cualitativa del potencial de inhibición de las Bacterias ácido lácticas frente a enterobacterias.....</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la distribución de los sensi-discos de las Bacterias Ácido Lácticas frente a Enterobacterias.....	28
Figura 2 Morfología de las colonias aisladas: A) Bacilos Gram (+);B) Bacilos Gram (-) Tipo 1; C) Bacilos Gram (-) Tipo 2	32
Figura 3 Tamaño de los halos de inhibición (mm): A) 0,35; B) 1,4; C) 2,4; D) >4	40
Figura 4 Tamaño del halo de inhibición a tres concentraciones: A) 3×10^8 UFC/ml; B) 6×10^8 UFC/ml; C) 12×10^8 UFC/ml	44
Figura 5 Promedio \pm D.E. del halo de inhibición bajo 3 concentraciones	45
Figura 6 Promedio \pm D.E. del halo de inhibición A) 4 cepas benéficas x 3 concentraciones; B) 5 cepas de enterobacterias x 3 concentraciones.....	46
Figura 7 Cinética de crecimiento de las cepas de <i>B. amyloliquefaciens</i> con mayor potencial antagonista.....	47

RESUMEN

Uno de los principales problemas de la ganadería es la mortalidad de los terneros al nacimiento causado por diarreas infecciosas, debido a la resistencia antimicrobiana generada por los antibióticos se ha optado por tratamientos preventivos como el uso de probióticos. Por lo cual en la presente investigación se obtuvieron bacterias ácido lácticas (BAL) del rumen de vacas fistuladas para evaluar su actividad antagonista *in vitro* frente a diversas enterobacterias causantes de diarreas y que en un futuro puedan ser usadas como probióticos. Las bacterias fueron aisladas a partir de medios de captura en bolsas de digestibilidad colocadas en el rumen. Estas fueron identificadas y seleccionadas por morfología de las colonias, tinción Gram, actividad bioquímica y secuenciación del gen 16S. Se evaluó el tamaño del halo de inhibición del enfrentamiento entre estos aislados BAL y enterobacterias, mediante la técnica de detección con sensi-discos como indicador de la actividad antagonista. Se obtuvieron 17 cepas bacterianas de las cuales 14 cepas Gram (+) correspondieron a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, mientras que los bacilos Gram (-) fueron identificados como *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* y 2 cepas de *Kosakonia sp.* Se encontró un efecto antagonista de las BAL frente a las enterobacterias con halos superiores a 2mm, siendo las cepas 5L22-01 y 0RR223-01 las que presentaron el mayor potencial de inhibición frente a las enterobacterias.

PALABRAS CLAVE

- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)**
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- **PROBIÓTICO**
- **POTENCIAL ANTAGONISTA**

ABSTRACT

One of the main problems of livestock is the mortality of calves at birth affected by infectious diarrhea, due to the antimicrobial resistance generated by antibiotics, preventive treatments such as the use of probiotics have been chosen. Therefore, in the present investigation lactic acid bacteria (LAB) were obtained from the rumen of fistulated cows to evaluate their antagonistic activity *in vitro* against various enterobacteria that cause diarrhea and that in the future can be used as probiotics. The bacteria were isolated from capture media in digestibility bags placed in the rumen. These were identified and selected by colony morphology, Gram staining, biochemical activity and sequencing of the 16S gene. The size of the halo of inhibition from confrontation between these BAL isolates and enterobacteria was evaluated, using the sensi-disc detection technique as an indicator of antagonistic activity. 17 bacterial strains were obtained, of which 14 Gram (+) strains corresponded to the species *Bacillus amyloliquefaciens*, while Gram (-) bacilli were identified as *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* and 2 strains of *Kosakonia sp.* An antagonistic effect of LABs against enterobacteria with halos greater than 2mm was found, with strains 5L22-01 and 0RR223-01 being the ones with the greatest potential for inhibition against enterobacteria.

KEYWORDS

- **LACTIC ACID BACTERIA (LAB)**
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- **PROBIOTIC**
- **ANTAGONIST POTENTIAL**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En Ecuador la ganadería representa el 41,26% de la superficie destinada a la actividad agropecuaria, generando empleo, desarrollo social y económico. De esta actividad dependen 1,5 millones de ecuatorianos que son representados por el 70% de pequeños productores (Oña, 2016). El INEC indica que en Ecuador existen 4.1 millones cabezas de ganado. La sierra posee la mayor cantidad de cabezas de ganado con 48,4% seguido de la costa que posee el 42,4%. En cuanto a producción de leche, la sierra aporta con 64,31% convirtiéndose así en la región con mayor producción de leche a nivel nacional (7,11 litros/vaca) (Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2018).

Dentro de la ganadería el cuidado de las terneras es una de las actividades con mayor importancia, por tal motivo es indispensable realizar manejos sanitarios y nutricionales eficientes. El manejo correcto permitirá obtener en poco tiempo vacas listas para entrar en la etapa de reproducción. Las fincas ganaderas dan poca importancia al manejo de las terneras, lo que genera animales enfermos que no presentan un desarrollo corporal adecuado, impidiendo manifestar sus cualidades lecheras en el futuro (Vizcaíno & Lema, 2012).

Las principales causas de mortalidad en los terneros recién nacidos son las diarreas infecciosas, provocando un retraso en el desarrollo corporal de los animales y altas tasas de mortalidad (60%), siendo costoso el tratamiento para este tipo de enfermedades. *E. coli* es el patógeno más recurrente en estas infecciones, esta bacteria se adhiere a las mucosidades intestinales provocando deshidratación, heces acuosas y finalmente la muerte (Hovenjürgen, 2008).

Al nacimiento, las terneras son bastante susceptibles a patógenos, porque no presentan una inmunidad completamente desarrollada, debido a una placenta epiteliochorial, que impide que las inmunoglobulinas pasen de la madre al feto. Motivo por el cual al nacimiento son bastante susceptibles a las diarreas causadas por enterobacterias, por lo que la inmunidad en este período se provee con el consumo de calostro y se complementa con el uso de probióticos.

En la actualidad existe una tendencia por el uso de tratamientos preventivos ya que los tratamientos en base a antibióticos son limitados y en algunos casos han generado microorganismos patógenos resistentes, alteración de la microbiota gastrointestinal provocando que los animales sean susceptibles a una diversidad de microorganismos patógenos. Una de estas alternativas es el uso de productos probióticos ya que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en las mucosidades intestinales (García, García, López, & Boucourt, 2005).

1.2 Justificación

La inmunidad que es provista por el calostro al ternero es insuficiente, por lo cual es indispensable buscar alternativas que permitan incrementar dicha inmunidad. Una de las alternativas es agregar inmunoglobulinas específicas o adicionar probióticos vía oral, acompañadas de un manejo nutricional y sanitario adecuados (Hovenjürgen, 2008).

El principal efecto de las bacterias probióticas es inhibir la adherencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella* etc. a las mucosidades intestinales. El intestino tiene funciones inmunológicas, por lo que las bacterias benéficas actúan en este órgano, estimulando procesos inmunológicos así como también se da un efecto antagonista contra patógenos digestivos (Görgülü, Siuta, Yurtseven, Öngel, & Kutlu, 2006). Una bacteria con potencial probiótico debe ser tolerante al pH ácido, tolerar las sales biliares pero principalmente debe poseer la capacidad de

inhibir a patógenos (Lee, Park, & Cho, 2012). Por lo tanto el conocer el potencial antagonico de las bacterias permite mejorar el estado sanitario de los animales, ya que estas evitan la adhesión de bacterias patógenas en las mucosas intestinales además de ayudar al crecimiento de bacterias benéficas del intestino (Cueva, 2014).

El antagonismo de microorganismos se determina por la muerte, o la inhibición de alguna especie provocada por otra, es decir dos especies pueden crecer en el mismo ambiente sin embargo uno de estos es nocivo para el otro. Por lo que se aprovecha este tipo de interacciones entre microorganismos para controlar patógenos. Un microorganismo antagonista debe ser capaz de adaptarse a medios adversos, controlar una amplia gama de microorganismos patógenos, presentar estabilidad en el medio y no deben ser patógenos para el hospedero (Villamil, 2014; Tortora, Funke, & Case, 2013).

Existen distintos tipos de mecanismos antagonistas, los más conocidos son: competencia, antibiosis e hiperparasitismo (Ramos & Pérez, 2005). La antibiosis es la capacidad de los microorganismos de producir sustancias nocivas para otros organismos. Las principales sustancias producidas para inhibir son ácidos orgánicos, CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, metilhidiatonina, ácidos grasos y bacteriocinas (Villamil, 2014).

En el presente trabajo se pretende evaluar el potencial antagonico in vitro, de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas, con el fin de seleccionar bacterias antagonistas de patógenos digestivos y que también pueden ser componentes de productos probióticos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el potencial antagónico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener bacterias ácido lácticas y patógenas secuestradas del rumen de vacas fistuladas mediante el uso de bolsas de digestibilidad.
- Diferenciar con taxonomía molecular las especies de bacterias benéficas y patógenas aisladas.
- Determinar la capacidad antagónica “*in vitro*” con el uso de pruebas de inhibición entre microorganismos benéficos y patógenos.

1.4 Hipótesis

H0: Las bacterias ácido lácticas aisladas del contenido ruminal no presentan capacidad antagonista frente a patógenos digestivos.

H1: Las bacterias ácido lácticas aisladas del contenido ruminal presentan capacidad antagonista frente a patógenos digestivos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del ganado bovino

Los bovinos pertenecen a la Clase: Mamífero; Subclase: Euterios; Orden: Ungulados; Suborden: Artiodáctilos; Grupo: Rumiantes; Familia: Bóvidos; Subfamilia: Bovinos; Género: Bos; Especie: *Bos Taurus*. (Gramal, 2014). Son mamíferos herbívoros con un tamaño de 120-150 cm de altura y pueden llegar a pesar hasta 800 kg. Fueron domesticados con el fin de obtener productos como: carne, leche y piel, lo que provocó la formación de razas especializadas (Gutama, 2017). Esta especie presenta tres subespecies: *Bos taurus indicus*, *Bos taurus primigenius* y *Bos taurus taurus*, las cuales han sido adaptadas al tipo de producto principal que producen

Bos Taurus indicus originarios de África, se caracteriza por tener una eficiente adaptación a climas cálidos, poseen jiba, pelaje corto, pigmentación en la nariz y piel son robustas con huesos gruesos. Las principales características de *Bos Taurus primigenius* son: alta adaptabilidad a climas fríos, tienen bastante pelo, la piel y nariz son despigmentados, son delgados, las hembras poseen ubres amplias, tiene huesos resistentes y finos, además transforman todos los nutrientes que consumen en leche es por esto que la ubre es de mayor tamaño y son originarios de Europa (Gutama, 2017).

Las principales razas productoras de leche son Holstein pueden llegar a pesar 650 kg, Pardo Suizo 636 kg, Jersey 440 kg, Ayrshire 550 kg y Guernesey 495 kg. Razas productoras de carne: Brahman, Shortorn, Simental, Gyr, Red-Polled, Aberdeen-Angus, Hereford, Charolesa, Santa Gertrudis y Limousina. Las razas doble propósito: Normanda y Momtbeliard (Gramal, 2014).

Al pertenecer al grupo de los rumiantes, los bovinos se caracterizan por poseer 4 cavidades: rumen, retículo, omaso, abomaso, esta característica les da una ventaja, pueden digerir alimentos

que no son aprovechados por los monogástricos (Cueva, 2014). Los rumiantes presentan ausencia de incisivos superiores y caninos, por lo que la ingestión de los alimentos los realiza con ayuda de los incisivos inferiores y la lengua (Gramal, 2014).

A nivel mundial la ganadería representa una de las actividades de más importancia económica ya que se pueden obtener productos como: carne, leche, pieles, biocombustible, fertilizantes, etc., cubriendo necesidades alimentarias y ambientales de la población (Gramal, 2014). La ganadería aporta con el 40% de producción agropecuaria y brinda seguridad alimentaria aproximadamente a 1300 millones de personas. Los principales países productores de leche y carne son: India con 297 millones de cabezas de ganado seguido de Brasil con 213 millones, China con 141 millones y Estados Unidos con 88 millones de cabezas de ganado. A nivel mundial se producen aproximadamente 703,7 millones de litros de leche (FAO, 2017).

De igual manera en Ecuador la ganadería es una de las actividades agropecuarias más importantes para el desarrollo del país, siendo una de las principales fuentes de alimentación, aportando positivamente a la economía con la generación de plazas de empleo y de agroindustrias asociadas a esta actividad. A nivel nacional existen 4.1 millones de cabezas de ganado, en donde la sierra posee el 48,4 % del total de cabezas y aporta con el 64,31 % de leche (7,11 litros/vaca). Esta producción cubre la demanda existente de productos lácteos y cárnicos, ahorrando cerca de 500 millones de dólares en importaciones de estos productos. (Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2018). En Ecuador la principal raza de ganado fue la mestiza con 1,5 millones de cabezas de ganado seguido de las razas criolla, Brahman, Holstein Friesian, Brown Swiss, Jersey y Otra raza (Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2018).

La ganadería presenta dos sistemas de producción: A) sistema de producción intensivo se caracteriza principalmente por manejar animales de alta genética, manejo de terneras eficientes,

razas especializadas, maneja alta carga animal, los pastos son fertilizados y se usa riego artificial. La inversión es alta para este tipo de sistema debido a que requiere de técnicas e infraestructura de última generación, además de necesitar de personal calificado para el asesoramiento técnico de la finca ganadera (Gutama, 2017).

B) Sistemas extensivos se manejan baja carga animal y requieren de menor inversión, no se necesita de personal calificado para el manejo de los animales, pero el manejo de los terneros es deficiente provocando una mortalidad hasta del 60%. Este tipo de sistema de producción es usado principalmente por los pequeños productores (Gutama, 2017). Mientras que un sistema de producción mixto usa los dos sistemas anteriormente mencionados.

En Ecuador se manejan sistemas intensivos y extensivos. La ganadería lechera utiliza principalmente sistemas de producción intensivo o sistema de producción mixto en las zonas del callejón interandino, mientras que en las zonas tropicales y subtropicales la producción de carne se realiza bajo un sistema extensivo (Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2018).

2.2 Generalidades de la digestión

La principal fuente de alimentación de los rumiantes son las plantas, alimento rico en carbohidratos. La digestión se realiza en dos etapas: la primera consiste en ingerir el alimento y en la segunda se realiza el proceso de rumia que consiste en regurgitar el bolo alimenticio y volverlo a masticar, posteriormente lo deglute nuevamente. La digestión se realiza mediante poblaciones bacterianas que se encuentran en el rumen ya que tienen la capacidad de degradar celulosa, hemicelulosa en otros carbohidratos (Guerrero, 2011).

La digestión ruminal se ve afectada por el tipo de dieta que recibe el animal, es decir animales alimentados con forraje tienen una flora bacteriana estable y por lo general las bacterias son fibrolíticas y celulolíticas, mientras que animales alimentados en base a concentrados tienen

poblaciones de bacterias amilolíticas, sin embargo las dietas basadas en grandes cantidades de concentrados modifican el pH por lo que se produce acidosis, lo que provoca un descenso de las poblaciones bacterianas fibrolíticas y celulolíticas. Para lograr un equilibrio en el rumen es importante mejorar las dietas balanceadas en donde se suministren forrajes y concentrados (Cotelo, 2010).

Los órganos ligados a la digestión de los alimentos son: A) boca, esófago, B) tres preestómagos (rumen, retículo y omaso), C) un estómago verdadero (abomaso), D) intestino delgado e intestino grueso. (Guerrero, 2011). A) En la boca se encuentran tres glándulas salivales importantes que son: parótidas, submaxilares y sublinguales. El pH de la saliva tiene capacidad buffer y ayuda a regular el pH ruminal que debe estar entre 6,5 y 7,5, ideal para microorganismos ruminales, la saliva además proporciona nutrientes y minerales necesarios para los microorganismos ruminales (Cueva, 2014).

B.1) El rumen es una cavidad compuesta por pilares que permiten mezclar bien el alimento con el líquido ruminal. Este compartimiento permite almacenar el alimento para luego ser procesado por actividad microbiana. Las papilas ruminales permiten una mejor absorción de nutrientes, además de proporcionar un ambiente esencial para que exista actividad microbiana (Fraga, 2010).

La digestión de los rumiantes está dada por los microorganismos que se encuentran en este compartimiento. El 80% de alimento consumido es digerido por las enzimas propias de las bacterias ruminales y como producto final se obtiene AGV (Ácidos grasos volátiles), CO₂, metano, amoníaco y proteína celular. Como producto de la digestión de carbohidratos y proteínas, se obtiene el AGV que representa el 80% de energía del animal y son absorbidos por las paredes del rumen y

retículo. Las proporciones de AGV de los animales que tienen como principal fuente de alimentación los pastos es de: 8% butirato, 70% acetato y 20% propionato (Oña, 2016).

Los microorganismos que actúan en la digestión del alimento son bacterias, hongos y protozoos, sin embargo se encuentra en mayor proporción las bacterias ya que presentan concentraciones bacterianas entre 10^{10} y 10^{11} UFC/ ml de contenido ruminal (Gutama, 2017). Las bacterias actúan directamente sobre los carbohidratos y proteínas del material vegetal, los protozoos intervienen en la regulación del pH ruminal y los hongos degradan parcialmente el material vegetal para que las bacterias puedan colonizar el material vegetal ingerido, de esta forma inicia el proceso de la digestión en el rumen (Cotelo, 2010).

En la fase líquida se encuentran el 20 % de microorganismos que se encargan de digerir carbohidratos solubles y proteínas. En la fase sólida se encuentra el 70% de microorganismos que se fijan a partículas sólidas y se encargan de digerir almidón, fibra, proteína menos soluble, etc. Por último el 5% de microorganismos se sujeta en el epitelio del rumen o en los protozoos (Reyes, 2012).

Los microorganismos que se encuentran en el rumen son variables ya que dependen del tipo de alimento que se suministre a los animales (Cámara, Sosa, & Laines, 2011). Los principales grupos bacterianos que se encuentran en el rumen son: *Bacterioides*, *Ruminococos*, *Succinomonas*, ciertos *Clostridios*, *Celobacterias* y *Butirivibrios*. De acuerdo al material que degradan se han formado los siguientes grupos bacterianos: celulolíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas, bacterias que utilizan ácidos y bacterias que utilizan azúcares solubles. En el rumen se encuentran en pequeñas cantidades enterobacterias como: *E. coli*, *Salmonellas* y *Clostridium perfringens* tipo D, estas bacterias oportunistas están en pequeñas cantidades debido a que actúan sobre ellas los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) (Llamas, 2011). Sin embargo, las

poblaciones de enterobacterias que se encuentran en el rumen muchas veces no actúan como organismos patógenos ya que pueden intervenir en procesos de digestión de la celulosa, xilano, lactosa y glucosa comprobándose así que las enterobacterias podrían presentar interacciones positivas en el rumen. Estos organismos causan problemas cuando incrementan sus poblaciones y desplazan bacterias beneficiosas para el huésped, ante esta situación se recomienda el uso de probióticos (Freitas, Almeida, Duarte, Abrão, & Geraseev, 2014).

B.2) Reticulo este compartimiento actúa como un filtro ya que se encarga del transporte del alimento al rumen o al omaso, cuando el alimento no se ha digerido completamente es regresado al rumen y el alimento fino es transportado al omaso para seguir el curso digestivo. B.3) Omaso este compartimiento es el encargado de absorber agua, nutrientes, minerales y AGV que se encuentra en las partículas alimenticias. C) El abomaso se encarga de la digestión de las partículas que no han sido digeridas anteriormente, aquí intervienen procesos enzimáticos. Las principales enzimas que actúan en la digestión son: ácido clorhídrico, pepsinas y reninas. La pepsina tiene acción en las proteínas y la renina en la caseína de la leche (Reyes, 2012).

D) Intestino delgado está compuesto por pliegues que son conocidos como vellosidades intestinales, estos permiten mezclar bien el material no digerido que llega al intestino (quilo). Está dividido en dos secciones: la parte superior que se encarga de secretar jugos digestivos (jugo pancreático, bilis y jugo intestinal) que actúan sobre el quilo y la parte inferior se encarga de absorber los nutrientes productos de la digestión (Oña, 2016). En esta fase existen partículas que no se han digerido por lo que estas pasan al intestino grueso en el cual van actuar microorganismos fermentadores que se encargaran de digerir estas partículas (Fraga, 2010).

2.2.1 Proceso digestivo de terneros

La alimentación de las terneras es un factor indispensable en la crianza, sin embargo para que la dieta sea balanceada requiere de raciones alimenticias variadas. Al nacimiento el ternero se comporta como un monogástrico a pesar de poseer las 4 cavidades (rumen, retículo, omaso y abomaso) propias de un rumiante. Al comportarse como un monogástrico el compartimiento más grande es el abomaso o estómago verdadero ya que la principal fuente de alimentación es la leche, para estimular el crecimiento de los otros 3 compartimientos se provee al animal de pequeñas porciones de forrajes (Cueva, 2014). El abomaso es conocido como estómago verdadero ya que aquí existe acción de enzimas digestiva como son: ácido clorhídrico, pepsina y renina (Lanuza, 2014).

Desde el nacimiento el ternero pasa por las tres fases: A) prerumiante, B) transición y C) rumiante. A) En la etapa de prerrumiante el órgano de mayor tamaño es el abomaso ya que la principal fuente de alimentación es la leche, la leche que ingieren va directamente al abomaso mediante la gotera esofágica. B) fase de transición el animal comienza una dieta en base a concentrados, por lo cual el proceso de fermentación ruminal inicia. En esta fase los órganos ligados a la digestión son el rumen y el abomaso ya que también se provee de una dieta líquida. C) fase rumiante inicia con el destete de los animales, en este periodo la dieta es sólida y se le acompaña con el suministro de agua. El proceso digestivo en esta fase es la de un rumiante en la cual el rumen pasa a ser el principal órgano del tracto digestivo (Saquipay, 2011).

La colonización bacteriana del rumen en terneros se cree que es por la ingesta de forraje sin embargo las bacterias que colonizan el rumen se da por reflujo desde el abomaso, es por esta razón que en este compartimiento se han encontrado bacterias entéricas como *E. coli* y *Cl. Welchii*, lactobacilos, bacterias amilolíticas y celulolíticas (Saquipay, 2011).

2.3 Problemas digestivos en terneros

Dentro de la ganadería el manejo de los terneros es una de las actividades con mayor importancia por lo que inmediatamente después del nacimiento se debe atender al ternero, es decir es necesario cortar y desinfectar el cordón umbilical para que no ocurra ninguna infección causada por *E. coli*. Posteriormente es indispensable verificar que ingiera calostro, ya que de este modo se está proveyendo de anticuerpos e inmunoglobulinas (Hovenjürgen, 2008).

Los terneros al nacimiento, son bastante susceptibles a patógenos, porque no presentan una inmunidad completamente desarrollada. Los rumiantes poseen una placenta epiteliochorial, este tipo de placenta impide que las inmunoglobulinas de la sangre de la madre pasen al feto. Sin embargo la inmunidad que provee el calostro no suele ser suficiente siendo indispensable buscar alternativas que permitan incrementar la inmunidad del ternero. Una de las alternativas es agregar inmunoglobulinas específicas o adicionar probióticos vía oral, acompañando estas alternativas con un manejo nutricional y sanitario (Hovenjürgen, 2008 ; Beltran, 2011).

En las fincas ganaderas es importante el manejo sanitario con el objetivo de prevenir diarreas. Entre las actividades que se deben manejar son: calendarios de vacunación, limpieza de cunas, desparasitación, nutrición, aplicación de minerales y vitaminas (Gutama, 2017).

Los principales problemas digestivos de los terneros son: A) Tricobezoares el cual se da principalmente cuando los terneros empiezan a lamer su pelo por varias causas ya sea por vicio o deficiencias nutricionales etc. y se forman tricofitobezoares que son bolas de pelo mezcladas con material vegetal estas son compactas y se van directamente al abomaso y pueden causar la formación de úlceras y perforaciones en este compartimiento (Cueva, 2014).

B) La insuficiencia ruminal en terneros empieza cuando se suministra inadecuadamente forrajes, estos al no poseer un rumen completamente desarrollado no pueden digerir eficientemente

el alimento esto provoca que empiece acumularse el forraje en este compartimiento causando que el animal no se desarrolle adecuadamente además las heces presentan restos de forraje no digerido (Lanuza, 2014).

C) Acidosis ruminal este trastorno se da principalmente cuando se provee al ternero leche en baldes, el animal ingiere inadecuadamente la leche lo que causa que el surco esofágico no se cierre a tiempo, provocando que la leche ingrese al rumen. Los procesos digestivos que se dan una vez que la leche se encuentre en este compartimiento son inadecuados lo que causa que las papilas ruminales se vean afectadas (Görgülü, Siuta, Yurtseven, Öngel, & Kutlu, 2006).

D) Diarrea digestiva este tipo de diarrea es frecuente en terneros recién nacidos, se da principalmente por un consumo excesivo de leche. Las heces son de color blanco con presencia de coágulos de leche, este tipo de diarrea no es complicada de tratar ya que se debe reducir el consumo de leche hasta observar que las heces van cambiando de consistencia (Lanuza, 2014).

E) Las diarreas ocasionadas por parásitos gastrointestinales se dan principalmente en terneros que son pastoreados. En los potreros se encuentran gran cantidad de larvas de parásitos, al ingerirlas empiezan a tener problemas de diarreas, pérdida de apetito, pelo áspero y el crecimiento es más lento, las heces tienen un olor desagradable, es líquida y a veces se observa sangre (Lanuza, 2014). Las diarreas ocasionadas por parásitos se pueden tratar con: antiparasitarios gastrointestinales o coccidiostatos (Tepán, 2012).

F) Diarrea mecánica este tipo de diarrea se da principalmente por un inadecuado manejo nutritivo como son: sobrecarga de alimento o por cambio de la dieta alimenticia, esto provoca alteración de la microflora intestinal, este tipo de diarrea puede desencadenar una diarrea infecciosa (Lanuza, 2014).

G) Diarrea infecciosa son causadas principalmente por bacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, y *Clostridium perfringens* tipo C etc. Estas bacterias pueden afectar el 60% de terneros de un hato ganadero generando así una alta tasa de mortalidad. Los síntomas comunes de una afección causada por bacterias, es que las heces son acuosas, bajo consumo de alimento, temperatura alta (39°C) y posteriormente deshidratación hasta llegar a la muerte (Tepán, 2012). Este tipo de diarrea también puede ser causado por protozoos (*Coccidia*, *Eimeria surni*, *E. bovis* y *Cryptosporidia*), hongos (*Candida albicans*) y virus (*Rotavirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus*) (Lanuza, 2014). Las diarreas causan deshidratación por lo que se debe controlar con suero vía intravenosa y se debe complementar con suero oral, en caso de fiebre se recomienda usar antibióticos recomendados por el veterinario (Tepán, 2012).

En la actualidad existe una tendencia por el uso de tratamientos preventivos ya que los tratamientos con el uso de antibióticos son limitados ya que han generado microorganismos patógenos resistentes, alteración de la microbiota gastrointestinal provocando que los animales sean susceptibles a una diversidad de microorganismos patógenos. Una de las alternativas propuestas para controlar diarreas infecciosas causadas principalmente por enterobacterias es el uso de productos probióticos ya que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en las mucosidades intestinales. Los probióticos más usados actualmente son los que contienen bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus sp* y *Bifidobacterium sp*, levaduras como *Saccharomyces* (García, García, López, & Boucourt, 2005).

2.4 Probióticos

Se define como probiótico a un grupo de microorganismos que ingeridos en concentraciones adecuadas le brinda beneficios al hospedero (FAO , 2002), puede mejorar el estado sanitario de los animales, ya que evita la adhesión de bacterias patógenas en las mucosas intestinales además de ayudar al crecimiento de bacterias benéficas del intestino (Cueva, 2014).

A nivel mundial se ha limitado el uso de antibióticos, por lo que como alternativa ante esta situación se sugiere el uso de productos prebióticos y probióticos (Lee, Park, & Cho, 2012). En estudios realizados se ha comprobado que los probióticos tienden a estabilizar la microbiota gastrointestinal estos productos al ser administrados en animales no tienen un efecto inmediato pero si prolongado, es por esto que estos productos se los usa principalmente como tratamientos preventivos (García, García, López, & Boucourt, 2005).

Los lactobacilos y las bifidobacterias por ser autóctonas de la microbiota natural de la mayoría de animales han sido usadas como cepas probióticas. A pesar de que hay una gran variedad de especies bacterianas ácido lácticas para la elaboración de probióticos el género *Bacillus* ha llamado la atención ya que posee características de interés para la elaboración de productos probióticos (Rodríguez, 2009 ; Peña & Sánchez, 2016).

Las bacterias del género lactobacilos presentan forma de bastón, Gram positivos y no poseen esporas, viven en distintos ambientes como son plantas, lácteos, piel y las mucosas. Estas bacterias pueden sobrevivir en pH ácido que oscilan entre 5,5 y 6,2 y viven en entornos mesófilos y termófilos. Hay alrededor de 100 especies que pertenecen a este grupo (Cueva, 2014; Peña & Sánchez, 2016).

Las bifidobacterias se caracterizan principalmente por ser Gram positivos la forma varía desde cocoides, cadenas estrelladas, etc. no presentan esporas toleran un pH entre 6 y 7 son

mesófilas. Hay alrededor de 29 especies estas viven en distintos ambientes como tracto intestinal, mucosas, alimentos, cavidades y aguas estancadas (Sánchez N. , 2015).

Un probiótico debe tener las siguientes características: no ser hidrolizados en el tracto gastrointestinal, no debe desplazar a los microorganismos propios del tracto gastrointestinal, los microorganismos ingeridos deben ser capaces de producir sustancias que ayuden a evitar el crecimiento de bacterias patógenas, debe modificar la microbiota intestinal en beneficio del hospedero (Cueva, 2014; Uyeno, Shigemori, & Shimosato, 2015).

Las bacterias probióticas inhiben la adherencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella* etc. a las mucosidades intestinales (Sánchez, y otros, 2015). El intestino tiene funciones inmunológicas, por lo que las bacterias benéficas actúan en este órgano, estimulando procesos inmunológicos así como también se da un efecto antagonista contra patógenos digestivos (Görgülü, Siuta, Yurtseven, Öngel, & Kutlu, 2006). Una bacteria con potencial probiótico debe ser tolerante al pH ácido, tolerar las sales biliares y debe tener gran potencial antagonista (Lee, Park, & Cho, 2012). Estos controlan microorganismos patógenos mediante la producción de sustancias inhibitorias de amplio espectro (surfactin, iturin, fengycin, proteasas, ácido láctico y bacteriocinas) y por competencia de nutrientes (García, García, López, & Boucourt, 2005; Markowiak & Śliżewska, 2018).

2.4.1 Antagonismo

El antagonismo de microorganismos se determina por la muerte, o la inhibición de alguna especie provocada por otra, es decir dos especies pueden crecer en el mismo ambiente sin embargo uno de estos es nocivo para el otro. Por lo que se aprovecha este tipo de interacciones entre microorganismos para controlar patógenos. Un microorganismo antagonista debe ser capaz de adaptarse a medios adversos, controlar una amplia gama de microorganismos patógenos, presentar

estabilidad en el medio y no deben ser patógenos para el hospedero (Villamil, 2014; Tortora, Funke, & Case, 2013).

Existen distintas técnicas para realizar pruebas de antagonismo “*in vitro*” entre ellas están inhibición simultánea, detección con sensi-disco, doble capa y difusión en agar. El antagonismo inicia cuando los microorganismos empiezan a competir entre ellos, la competencia que se da los obliga a producir sustancias nocivas para los microorganismos patógenos (Cercenado & Cantón, 2010; Gonzáles, Torrico, & Medina, 2012). Existen distintos tipos de mecanismos antagonistas, los más conocidos son por competencia, antibiosis e hiperparasitismo (Ramos & Pérez, 2005).

Los mecanismos de la capacidad antagónica se dan principalmente por competencia de nutrientes y espacio, antibiosis, alteración del medio ambiente en el que se desarrollan y neutralización de las enzimas presentes en los organismos entéricos (patógenos). La antibiosis es la capacidad de los microorganismos de producir sustancias nocivas para otros organismos. Las principales sustancias producidas para inhibir son ácidos orgánicos, CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, metilhidiatonina, ácidos grasos y bacteriocinas (Villamil, 2014).

Los ácidos orgánicos bajan el pH del medio en el que se encuentren, esto provoca que se genere un ambiente tóxico para las enterobacterias (Gram negativas). Además estos ácidos orgánicos penetran en el interior de las células de las Gram negativas provocando la muerte inmediata de estos organismos (Sánchez N. , 2015).

Las bacteriocinas causan muerte de las bacterias patógenas al provocar destrucción de la pared celular o ya sea evitando la síntesis de esta. La producción de estas sustancias antimicrobianas les permite a las cepas probióticas ser competitivas en ambientes desfavorables, establecerse y colonizar entornos además inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Además tienen la capacidad de secretar peróxido de hidrogeno y diacetilo, estos actúan destruyendo

los compuestos celulares e impidiendo que las bacterias patógenas puedan utilizar aminoácidos (arginina) (Sánchez N. , 2015).

Los probióticos deben tener la capacidad de excluir competitivamente a los patógenos, es decir las bacterias con potencial antagónico deben reducir el crecimiento de otras especies bacterianas y lo realizan mediante la creación de un ambiente adverso, secreción de sustancias antimicrobianas y competencia por nutrientes (Sánchez N. , 2015). En estudios realizados las cepas probióticas tienen gran potencial antagonista porque producen compuestos antimicrobianos de amplio espectro como ácidos orgánicos (ácido acético y ácido láctico) y bacteriocinas (Sánchez N. , 2015). 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 & Díaz, 2017).

La mayor parte de bacterias con potencial probiótico pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*; y así como también levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces*). Siendo el género *Lactobacillus* quienes son ampliamente usados en muchos animales. Sin embargo, en años recientes los probióticos que contienen bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* han cobrado importancia, ya que pueden desarrollarse como una bacteria anaerobia facultativa, así como la presencia de una spora característica que les permite ser resistentes a condiciones ambientales desfavorables. Presentan un rápido crecimiento, capacidad antagonista frente a patógenos y formación de biofilms en medios líquidos (Uyeno, Shigemori, & Shimosato, 2015; Markowiak & Ślizewska, 2018 ; Elshagabee, Rokana, Gulhane, Sharma, & Panwar, 2017; Villarreal, Villa, & Estrada, 2017).

En investigación realizadas mencionan que las bacterias del generó *Bacillus* presenta gran potencial antagonista porque producen distintos compuestos como surfactin, iturin, fengycin y proteasas. Esta capacidad se ve influenciado por la producción de exoenzimas, siendo estas las razones por las cuales controlan eficientemente distintos patógenos. (Niazi, 2014; Llario, Romano, Rodilla, & Poersch, 2018; Lee, Park, & Cho, 2012; Elshagabee, Rokana, Gulhane, Sharma, & Panwar, 2017; Villarreal, Villa, & Estrada, 2017). El potencial de inhibición de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* se le atribuye a la producción de ácido láctico, compuesto orgánicos volátiles (COV), antibióticos de amplio espectro no volátiles y enzimas (López, 2017). Secreta lipopéptidos no ribosomales (surfactin, bacillomycin, fengycin e iturin), policétidos (bacillaene y bacylisin) y bacteriocinas (gramicidin, subtilin) (Feria, Castañeda, Toledo, Castillo, & Cedeño, 2019).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en la Hacienda El Prado, en los laboratorios de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA-I de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando.

3.2 Ubicación del lugar de investigación

3.2.1 Ubicación Geográfica

Longitud: 78° 24' 44'' (O)

Latitudes: 0° 23' 20'' (S)

Altitud: 2737m.s.n.m

Fuente: (Google Maps, 2018).

3.2.2 Ubicación Ecológica

Precipitación media anual: 1285 mm/año

Humedad relativa: 69,03%

Temperatura media anual: 13,89°C

Piso altitudinal: Montano bajo

Región latitudinal: Templada

Zona de vida: Bosque Húmedo

Clasificación Bioclimática: Húmedo-Temperado

Fuente: (Estación meteorológica "Hacienda El Prado", 2017).

3.3 Secuestro de bacterias

Para obtener las bacterias se usaron vacas fistuladas (arete) 1110 y 1105. Estas se encontraban en pastoreo con una condición corporal óptima y un estado sanitario adecuado.

Para secuestrar las bacterias del rumen se elaboraron de forma manual bolsas de digestibilidad de un tamaño de 5x5 cm en tela de poliéster con un poro de 45µm, en las cuales se incorporó geles nutritivos específicos semisólidos de 2x3 cm: 3 fundas con geles Agar leche, 3 fundas con geles Agar rogosa y 3 fundas con geles Agar Papa dextrosa PDA a distintas concentraciones de agar cada uno (Anexo 7.1); Finalmente las bolsas fueron etiquetadas de acuerdo al medio como se muestra en la Tabla 1.

Antes de la manipulación de los animales se realizó un lavado del área donde se encuentra la fistula y se desinfecto con eterol. Las bolsas de digestibilidad fueron colocadas en fundas tipo malla e introducidas en el rumen de la vaca 1110 durante un periodo de 48 horas que posteriormente fueron extraídas asépticamente. Además, se tomó 50ml de muestras de líquido ruminal de la vaca 1105 en frascos completamente estériles.

Tabla 1
Medios nutritivos para secuestro de bacterias del rumen

CÓDIGO	MEDIO DE CULTIVO
M2	AGAR LECHE (17g de agar)
M3	AGAR LECHE (15g de agar)
M4	AGAR LECHE (13g de agar)
M5	AGAR ROGOSA (17g de agar)
M6	AGAR ROGOSA (15g de agar)
M7	AGAR ROGOSA (13g de agar)
M8	PDA (17g de agar)
M9	PDA (15g de agar)
M10	PDA (13g de agar)

3.4 Aislamiento de bacterias

Las bolsas de digestibilidad extraídas del rumen fueron trasladadas al laboratorio de Agrobiotecnología junto con las muestras de líquido ruminal. Inmediatamente se procedió a codificar las muestras adecuadamente con el fin de obtener la información necesaria durante toda la investigación (Tabla 2).

Tabla 2

Códigos de las muestras

VACA	LUGAR	MEDIO	#MUESTRAS	MEDIOS	#TUBOS
N1110	LIQUIDO	ROGOSA	1	1 ROGOSA	1
B1105	RUMEN	LECHE	2	2 PEPTONA	2
		PDA	3		

Las bolsas de digestibilidad fueron colocadas en 50 ml de agua destilada estéril y se agitaron por 1 hora, de la cual se tomó una muestra por cada bolsa de 200 μ l y se procedió a sembrar en 15 ml de medio rogosa sin agar y caldo peptonado (Anexo 7.1.), seguido de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C a 50rpm. Posteriormente se midió el crecimiento bacteriano por comparación de la turbidez con la Escala McFarland y por espectrofotometría a 560nm en el equipo Genests™ 10 Series Spectrophotometers (Thermo, USA).

De las muestras se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , y posteriormente se sembraron por agotamiento con ayuda del asa de platino y extensión con asa de digrasky con 100 μ l de muestra en medios PDA, Rogosa y agar MacConkey e incubadas a 37°C durante 24 horas. Después se realizaron análisis primarios de colonias bacterianas con la finalidad de evaluar: morfología, color, margen, elevación y forma de cada cepa. Una vez identificadas colonias bacterianas separadas, uniformes y sin contaminación se realizó tinción Gram para diferenciar entre Gram positivas y Gram negativas. Posteriormente se realizó recambios de medio (repique) hasta obtener colonias

totalmente puras, las tinciones Gram fueron realizadas en cada repique para corroborar la pureza de las colonias.

3.4.1 Pruebas bioquímicas complementarias

Una vez obtenida las colonias puras y activas se realizaron pruebas bioquímicas de: citrato de Simmons, urea, triple sugar iron agar (TSI agar), prueba de indol, lisina descarboxilasa, sulfuro indol movilidad (SIM), catalasa y motilidad indol ornitina (MIO). Estas pruebas se realizaron en tubos de ensayo y se sembró de acuerdo a las especificaciones del fabricante, posteriormente se incubó las muestras a 37°C durante 24 horas. Estas pruebas bioquímicas se realizaron con el fin de conocer el metabolismo de cada cepa bacteriana aislada. Ver Tabla 3, los resultados fueron evaluados en el programa de identificación ABIS.

Tabla 3

Pruebas bioquímicas metabolismo bacteriano

Tipo de prueba	Enzimas
1 citrato de Simmons	Citrato como única fuente de carbono Glucosa Sacarosa Lactosa
2 TSI	Gas Ácido sulfhídrico
3 Urea	Ureasa
4 Prueba de indol	Triptofanasa.
5 Lysine – Iron – Agar	Lisina Descarboxilasa Tiosulfato reductasa
6 Sulfuro indol movilidad (SIM)	Cisteína desulfurilasa Triptofanasa.
7 motilidad indol ornitina (MIO)	Ornitina Descarboxilasa

3.4.2 Identificación molecular de bacterias

3.4.2.1 Extracción de ADN

Los aislados purificados fueron sembrados en tubos con medio peptonado e incubados durante 24 horas a 37°C a 50 rpm. Se trasladó el medio a microtubos de 2ml y centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet de células bacterianas fue diluido en 467 µl buffer TE (10% glicerol, 25 mM Tris HCL, 10 mM EDTA), 30µl de SDS al 10% y se incubó a 65°C por 10 min. Luego se colocó 20 µl de proteinasa K y se incubó durante 1 hora a 37 °C, se añadió 50 µl de solución cloroformo: fenol: alcohol isomílico 25:24:1, y centrifugado nuevamente. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo y se añadió 100 µl de acetato de sodio y 600 µl de isopropanol, y se los incubó durante una hora a -20°C. Los tubos fueron centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos a -4°C, se extrajo el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de alcohol 70%. Se eliminó el alcohol del pellet por evaporación y este fue eluido en 150 µl buffer TE 1X (Invitrogen, USA).

La calidad y cantidad del ADN fue evaluado en geles de agarosa al 1% preparados en TBE 1X (Tris-HCl 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 20mM; pH 8.2-8.4). La muestras de ADN fueron cargadas siguiendo la relación: 5 µl de ADN + 0,7 µl de BlueJuice 10X (Invitrogen, USA), así como un marcador de peso molecular TrackIt™ 1Kb Plus (Invitrogen, USA). La corrida electroforética se la realizó en una cámara horizontal ENDURO GEL XL (LABNET, USA) durante 30 minutos a 100V. El resultado de la electroforesis fue visualizado en el transiluminador UV (alpha innotech, USA).

3.4.2.2 Secuenciación del gen 16S ADNr

El gen 16S ADNr sintetiza el RNA ribosomal (ARNr) de la subunidad 16S del ribosoma en procariontes, el cual al ser un gen universal en estos organismos es usado para la clasificación taxonómica, filogenética, fingertyping, entre otras. Por lo cual se realizó una amplificación por PCR convencional a partir del ADN extraído de un fragmento de ~1400bp con los Primers Universales 27 Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492 Reverse (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), para lo cual se usó una PCR Master Mix (ThermoScientific, USA) se prepararon reacciones de 50µL: 45µL PCR Mix + 2.5µL 27F 10mM (ThermoScientific, USA) + 2.5µL 1492R 10mM (ThermoScientific, USA) + 2µL de ADN extraído. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador T100 (TECHNE, USA), bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 min; 35 ciclos 95°C por 45 s, 55°C por 45 s, y 72°C por 1.5 min y una fase final a 72 °C por 10 min.

El producto PCR fue evaluado en geles de agarosa 1.2% y cuantificado mediante fluorometría mediante el kit Quant DNA HR siguiendo las especificaciones del fabricante y medido en el Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA). Finalmente se envió 40µL de producto PCR en tubos de 1,5mL a ser secuenciados en MACROGEN INC. (Korea) en colaboración con la empresa TestGEN S.A. Se realizó una purificación de los productos PCR seguido de la secuenciación por el método Sanger del fragmento 27F – 1492R en el equipo Abi3730xl (Thermo fisher scientific, USA). Una vez obtenidas las secuencias forward y reverse fueron limpiadas y ensambladas con el algoritmo CAP3 para obtener un secuencia consenso de cada bacteria, en los softwares BioEdit versión 5.0.6 Tom Hall y Chromas.

Posteriormente se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos públicas mediante el algoritmo BLAST 2.10.0+ (Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000) a fin

de encontrar una secuencia idéntica que permita deducir la identidad de la especie bacteriana. Se compararon las secuencias con dos bases de datos: RefSeq específicamente 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y con la colección total de nucleótidos (nr/nt) GenBank.

Las secuencias que presentaron una similitud menor al 99% o existieron ambigüedades entre dos especies, fueron analizadas mediante la construcción de un árbol filogenético por ML (Maximum Likelihood; Máxima verosimilitud) siguiendo un modelo acorde a las alineaciones obtenidas. Además todos estos árboles fueron obtenidos por un método BootStrap con 500 repeticiones. Estos análisis se llevaron a cabo en el software MEGA X.

3.5 Evaluación del antagonismo

3.5.1 Bacterias indicadoras

Las enterobacterias se obtuvieron del rumen de vacas fistuladas en conjunto con las cepas antagonistas, cuyo procedimiento se describió en el apartado “aislamiento de bacterias”. Además se obtuvo una cepa de *E. coli* como indicador, para lo cual se realizó un aislamiento a partir de las heces de un ternero, las cuales fueron disueltas en agua destilada estéril y homogenizadas, para luego ser sembrada en estrías en medio selectivo EMB (Eosin Methylene Blue Agar) el cual es selectivo para enterobacterias y permite diferenciar *E. coli*. Una vez aislada esta bacteria fue repicada hasta obtener un cultivo puro, y sometida a las pruebas bioquímicas y moleculares para asegurar su identidad.

3.5.2 Pruebas de antagonismo en concentración fija

Las cepas antagonistas y los organismos indicadores fueron sembrados en 10 ml de caldo peptonado durante 24 horas a 37°C. Posteriormente estos fueron centrifugados y el pellet formado se diluyó en agua destilada estéril hasta obtener las concentraciones 6×10^8 UFC/ml para las cepas antagonistas y 3×10^8 UFC/ml para las enterobacterias.

Las pruebas de antagonismo permiten conocer la capacidad antagonista que tiene una bacteria frente a organismos indicadores (enterobacterias). Las cepas antagonistas y los organismos indicadores fueron enfrentados en cajas Petri mediante la técnica de detección con discos, para lo cual se tomó 150 μl del organismo indicador (Total $4,5 \times 10^7$ UFC) y se sembró masivamente con ayuda del asa de digrasky en medio agar nutritivo Anexo 7.1. Se realizaron discos de papel filtro estériles para humedecerlos con 20 μl de cepa antagonista (Total $1,2 \times 10^7$ UFC) y colocarlos de manera radial en la caja Petri que previamente fue inoculada con una cepa de enterobacteria Figura 1. Finalmente se incubó a 37°C durante 24 horas luego se midió el halo de inhibición en (mm) con ayuda del programa Image J versión 1.49. Las bacterias con mayor potencial antagonista y las enterobacterias fueron criocongeladas a -96°C .

Los datos del tamaño del halo de inhibición se analizaron mediante estadística descriptiva (medias, desviación estándar, gráficas estadísticas). Para comparar el tamaño del halo de inhibición se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis porque no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad ($p < 0,0001$), para un diseño completamente al azar en arreglo factorial. Además se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey al 5% para las cepas antagonistas y las enterobacterias.

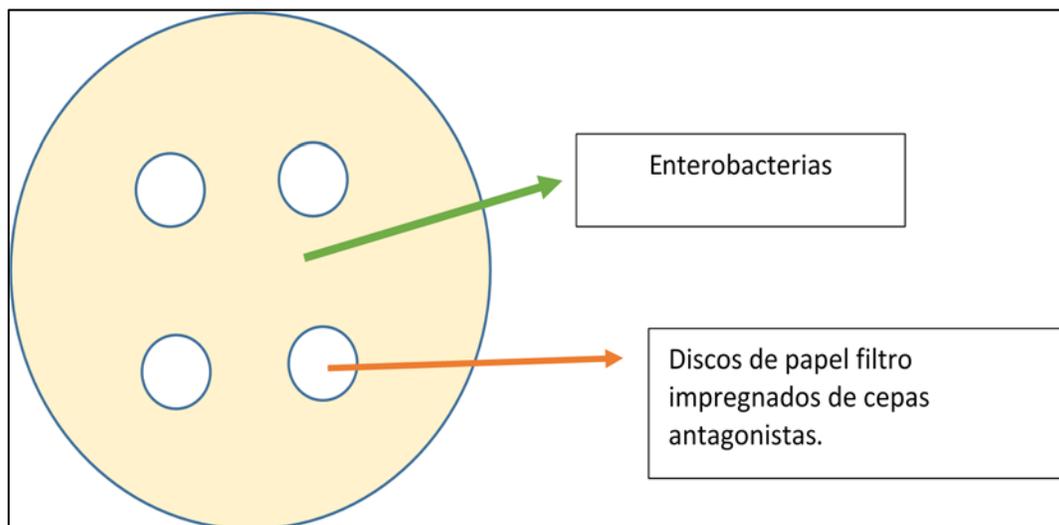


Figura 1 Esquema de la distribución de los sensi-discos de las Bacterias Ácido Lácticas frente a Enterobacterias

3.5.3 Efecto de la concentración de las Bacterias ácido lácticas

Las cepas con mayor potencial antagónico evaluadas anteriormente fueron parte de este ensayo donde se evaluó el efecto de la concentración bacteriana de las cepas antagonistas en el tamaño del halo de inhibición. Las cepas antagonistas seleccionadas y las 5 cepas de enterobacterias fueron sembradas en 10ml de medio peptonado e incubadas a 37°C durante 24 horas, posteriormente las BAL fueron diluidas a las concentraciones 3×10^8 UFC/ml , 6×10^8 UFC/ml 12×10^8 UFC/ml y las enterobacterias fueron diluidas a una concentración de 3×10^8 UFC/ml.

La técnica que se usó para realizar este ensayo fue detección con sensi- discos, se tomó 100 μ l de los organismos indicadores (Total 3×10^7 UFC) y fueron sembrados masivamente en medio nutritivo posteriormente se colocó en forma radial los discos de papel filtro que contenían 10 μ l de las distintas concentraciones bacterianas (Total 3×10^6 UFC), (Total 6×10^6 UFC) y (Total $1,2 \times 10^7$ UFC) finalmente se incubó durante 24 horas a 37°C. El tamaño del halo de inhibición se midió

en mm con ayuda del programa Image J versión 1.49. El análisis estadístico fue similar al usado anteriormente.

3.6 Cinética de crecimiento

Es importante conocer la cinética de crecimiento para la elaboración de productos probióticos, por lo que se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias que mostraron mayor potencial antagonico. En un matraz Erlenmeyer se colocó 50 ml de medio peptonado MOLP (Peptona 30gL^{-1} , Dextrosa 20gL^{-1} , Extracto de levadura 7gL^{-1} , KH_2PO_4 $1,9\text{gL}^{-1}$, CuSO_4 $0,0001\text{mgL}^{-1}$, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,0005\text{mgL}^{-1}$, Na_2MoO_4 $0,0004\text{mgL}^{-1}$, KI $0,0002\text{mgL}^{-1}$, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $3,6\text{mgL}^{-1}$, MgSO_4 $0,45\text{gL}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,14\text{mgL}^{-1}$, H_3BO_3 $0,01\text{mgL}^{-1}$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 10mgL^{-1} , sales Molp $1\ \mu\text{L}^{-1}$ pH5,5) posteriormente se colocó 400 μl de las cepas antagonicas (5L22-01, 0RL121-01, 0RR112-01, 0RR223-01, 0RL121-02 y 0RR222-02) a una concentración de 9.6×10^6 UFC/ml finalmente se incubó a 37°C a 150 rpm. Se tomó lecturas del crecimiento bacteriano a las 0,2,4,6,8,10,14,16,18,20,24 horas para lo cual se colocó 2ml de muestra en tubos de vidrio y se midió la concentración por medio de la turbidez con la Escala McFarland y por espectrofotometría a 560nm en el equipo Genests™ 10 Series Spectrophotometers (Thermo, USA). En escala exponencial se realizaron gráficas de las curvas de crecimiento mediante el programa GraphPad Prism 7.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento bacteriano

En la tabla 4 se muestra el registro de 21 cepas bacterianas puras obtenidas de manera directa a partir del rumen, 17 cepas provinieron de la vaca 1110 secuestradas mediante bolsas de digestibilidad con medios de captura: Agar leche, Agar rogosa y PDA, las 4 cepas restantes se obtuvieron del líquido ruminal proveniente de la vaca 1105. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los obtenidos por Fraga (2010) y Reyes (2012), quienes indican que en el rumen la presencia de microorganismos varía según los componentes del mismo, cerca de un 20% se encuentran en el fluido ruminal y el 70% se encuentra en las partículas alimenticias en suspensión. Las bolsas de digestibilidad resultaron adecuadas para simular las partículas en suspensión y mejorar el número de bacterias capturadas.

Llamas (2011) y Fraga (2010), mencionan que en el rumen las bacterias se desarrollan en condiciones anaeróbicas y muy pocos son anaerobios facultativos. La simulación de ambientes adecuados en laboratorio permitió obtener una amplia diversidad de microorganismos aerobios y anaerobios. En concordancia a lo indicado, en la presente investigación se obtuvo amplia diversidad en los tipos de colonias secuestradas, ya que el aislamiento bacteriano se realizó en condiciones adecuadas, a una temperatura de 37°C y por un tiempo de 24 horas. En estas condiciones todas las bacterias aisladas fueron mesófilas aerobias o anaerobias facultativas.

Tabla 4*Morfología de las colonias y Resultados de la Tinción Gram de los 21 aislados*

Cepas	Color	Forma	Elevación	Margen	Forma	Gram	Espora
0RP121-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RP121-03	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL312-02	Blanco	Circular	Elevada	Entero	Coco	+	-
5L22-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL121-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL121-02	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL212-01	Blanco	Circular	Elevada	Entero	Coco	+	-
0RL312-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
5L21-02	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RR112-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RR112-02	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RR221-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RR223-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL101-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RR222-02	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RL323-01	Crema	Irregular	Elevada	Ondulada	Bacilo	+	+
0RP121-02	Blanco semitransparente	Circular	Elevada	Entero	Bacilo	-	-
0RP321-01	Blanco	Circular	Elevada	Entero	Bacilo	-	-
0RP321-02	Blanco semitransparente	Circular	Elevada	Entero	Bacilo	-	-
5L21-01	Blanco semitransparente	Circular	Elevada	Entero	Bacilo	-	-
5L22-02	Blanco	Circular	Elevada	Entero	Bacilo	-	-

En las figuras 2A, 2B, y 2C, se muestran las características de las colonias bacterianas obtenidas: 14 cepas resultaron bacilos Gram positivos, de color crema, con forma irregular, elevada y con un margen ondulado estos resultados concuerdan con lo indicado por López (2017) y Tabasum et al. (2014). Mientras que 2 cepas fueron bacilos Gram negativos presentando colonias de color blanco, forma circular, elevada y margen entero y 3 cepas fueron de color blanco semitransparente, forma circular, elevada, consistencia mucosa y margen entero.

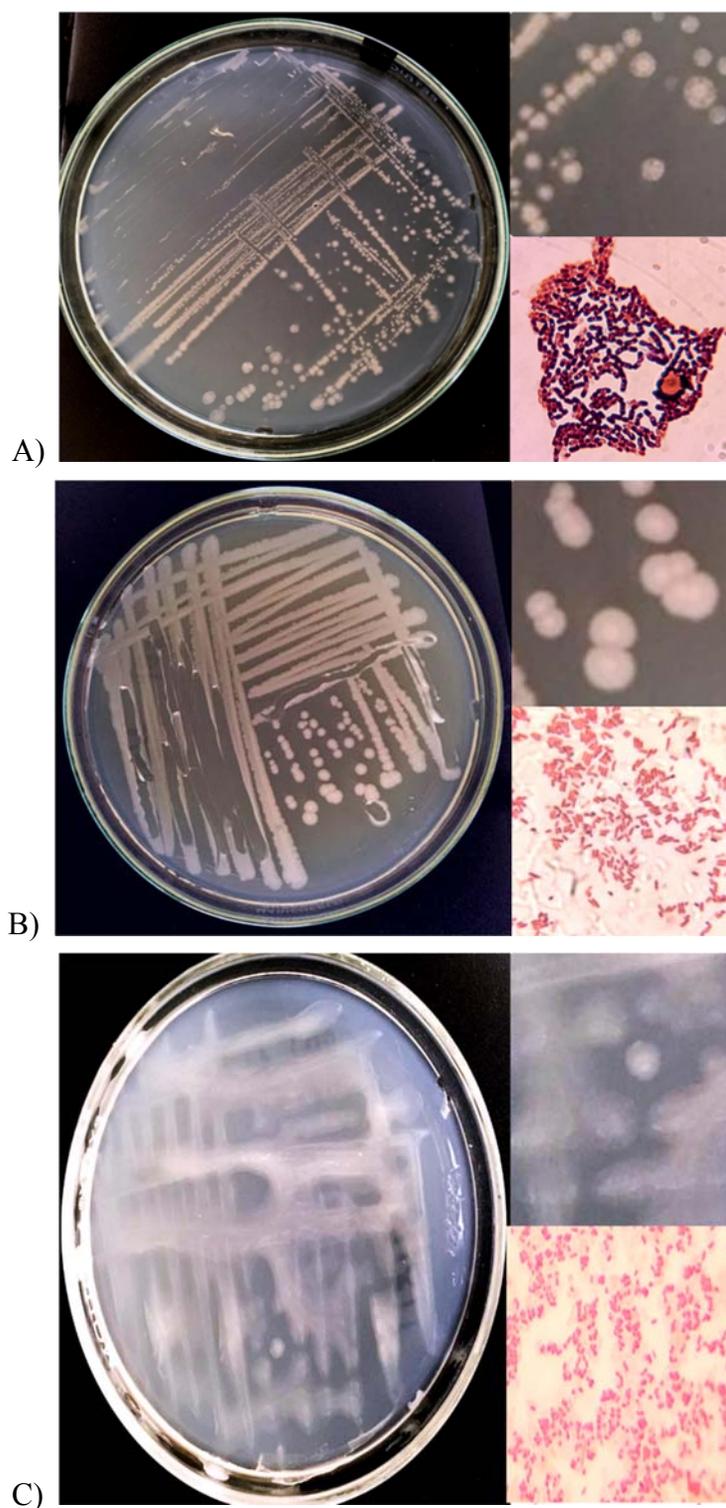


Figura 2 Morfología de las colonias aisladas:
A) Bacilos Gram (+); B) Bacilos Gram (-) Tipo 1;
C) Bacilos Gram (-) Tipo 2

De los 21 aislados se identificaron 14 cepas de Bacilos Gram positivos, 2 cepas de Cocos Gram positivos y 5 cepas de bacilos Gram negativos. Estos resultados concuerdan con lo indicado por Llamas (2011), quien menciona que en el rumen existe una amplia diversidad bacteriana entre Gram positivos y Gram negativos como: *Bacterioides*, *Ruminococos*, *Succinomonas*, *Clostridios*, *Celobacterias*, *Bacillus*, *Butirivibrios* y enterobacterias.

4.2 Pruebas Bioquímicas

En la tabla 5 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas. Se usó una batería bioquímica específica para enterobacterias (citrato de Simmons, urea, triple sugar iron agar (TSI agar), prueba de indol, lisina descarboxilasa, sulfuro indol movilidad (SIM), catalasa, Agar MacConkey y motilidad indol ornitina (MIO)) y se identificó los bacilos Gram negativos mediante el programa de identificación ABIS.

Tabla 5
Pruebas bioquímicas de las 21 cepas aisladas del rumen

CÓDIGO	Forma	Gram	Citrato	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Gas	H2S	L.D*	Ureasa	Movilidad	O. D*	Triptofanasa	Catalasa
ORP121-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORP121-03	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5L22-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORL121-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORL121-02	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORL312-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5L21-02	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORR112-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORR112-02	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORR221-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORR223-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORL101-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORR222-02	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORL323-01	Bacilo	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ORP121-02	Bacilo	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
ORP321-01	Bacilo	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
5L21-01	Bacilo	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
5L22-02	Bacilo	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+

*L.D: Lisina Descarboxilasa; *O.D: Ornitina Descarboxilasa

La cepa 5L22-02 presentó un porcentaje de similitud del 90,8% para *Escherichia coli*, las cepas 5L21-01 y 0RP121-02 mostraron el 93,4 % de similitud para *Klebsiella* y 0RP321-01 presentó el 85,3 % de similitud para *Klebsiella terrigena*

Rustrián et al., (2013) y Villota (2016), mencionan que las características metabólicas bacterianas se pueden evaluar mediante varias pruebas bioquímicas específicas para identificar enterobacterias, también se identifican mediante el uso de manuales y programas bioquímicos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

En la presente investigación para confirmar la especie bacteriana se complementó con una identificación molecular ya que los porcentajes de similitud obtenidos mediante pruebas bioquímicas fueron inferiores al 99,5%.

4.3 Identificación molecular

En la tabla 6 se presentan los resultados de las pruebas moleculares. Al realizar la secuenciación del gen 16S y la comparación con las bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank), mostraron que las 14 cepas aisladas corresponden a la especie *Bacillus amyloliquefaciens* con un porcentaje de similitud >99,8%

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con Niazi (2014), quien identificó cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* asociada a animales y plantas. También indica que cepas de una misma especie pueden presentar distintos efectos frente a patógenos.

Se obtuvo 14 cepas de *B. amyloliquefaciens* aisladas a partir del rumen de vacas fistuladas lo cual no concuerda con (Creevey, Kelly, Henderson, & Leahy, 2014; Castillo, Burrola, & Chávez, 2014; Valencia, 2019), quienes no han identificado la presencia de *B. amyloliquefaciens* en el rumen aunque si reportan la presencia de bacterias del género *Bacillus*.

Tabla 6

Identificación molecular de las cepas aisladas del rumen y una cepa aislada de heces de ternero

Cepas	IDENTIFICACIÓN	% de similitud	Cod. Accesoión
0RP121-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,86%	NR_117946.1
0RP121-03	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,86%	NR_117946.1
5L22-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%	NR_117946.1
0RL121-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RL121-02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RL312-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,86%	NR_117946.1
5L21-02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%	NR_117946.1
0RR112-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%	NR_117946.1
0RR112-02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RR221-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%	NR_041455.1
0RR223-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RL101-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RR222-02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%	NR_117946.1
0RL323-01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	NR_117946.1
0RP121-02	<i>Kosakonia sp.</i>	99,48%	MK567956.1
0RP321-01	<i>Hafnia alvei</i>	99,79%	NR_112985.1
5L21-01	<i>Kosalonia sp.</i>	99,43%	MK567956.1
5L22-02	<i>Escherichia coli</i>	100%	CP044314.1
HTP01	<i>Escherichia coli</i>	100%	CP044315.1

En la tabla 7 se presenta la comparación de las 14 cepas con las dos bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank). Cada base de datos muestra porcentajes de similitud >99,5 % para la especie *B. amyloliquefaciens*.

Tabla 7

Comparación de las 14 cepas con las bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank)

Cepas	16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea)	Nucleotide collection (nr/nt)
ORP121-01	99.86% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
ORP121-03	99.86% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
5L22-01	99.93% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
ORL121-01	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1
ORL121-02	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1
ORL312-01	99.86% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
5L21-02	99.93% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa LI24 MH719378.1
ORR112-01	99.93% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
ORR112-02	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1
ORR221-01	99.93% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa NBRC 15535 NR_041455.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa LI24 MH719378.1
ORR223-01	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1
ORL101-01	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CHL4 MN240439.1
ORR222-02	99.93% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1
ORL323-01	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034 NR_117946.1	100.0% <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa H CP041693.1

En la tabla 8 se muestran los resultados de la identificación molecular de los 5 Bacilos Gram negativos y la comparación con las dos bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank). Para determinar la especie de cada cepa se tomó en cuenta valores >99,5%.

Tabla 8

Comparación con las bases de datos RefSeq: 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea) y Nucleotide collection (GenBank) de los 5 Bacilos Gram negativos

Cepa	16S ribosomal RNA sequences (bacteria and Archaea)	Nucleotide collection (nr/nt)
ORP121-02	98.45% <i>Enterobacter cloacae</i> cepa DSM 30054 NR_117679.1	99.48% <i>Kosakonia sp.</i> cepa WCHEs120001 MK567956.1
ORP321-01	99.79% <i>Hafnia alvei</i> cepa JCM 1666 NR_112985.1	99.86% <i>Hafnia alvei</i> cepa 12D5
5L21-01	98.50% <i>Enterobacter cloacae</i> cepa DSM 30054 NR_117679.1	99.43% <i>Kosakonia sp.</i> cepa WCHEs120001 MK567956.1
5L22-02	99.48% <i>Escherichia fergusonii</i> cepa ATCC 35469 NR_074902.1	100.0% <i>Escherichia coli</i> cepa RM9245 CP044314.1
HTP01	99.43% <i>Shigella flexneri</i> cepa ATCC 29903 NR_026331.1	100.0% <i>Escherichia coli</i> cepa SJ7 chromosome CP044315.1

La cepa ORP321-01 corresponde a la especie *Hafnia alvei* con un porcentaje de similitud de 99,79%. Las cepas 5L22-02 y HTP01 corresponden a la especie *Escherichia coli* ya que presentaron un porcentaje de similitud del 100%. Las cepas ORP121-02 y 5L21-01 presentaron el 98,45% de similitud para la especie *Enterobacter cloacae* cepa DSM 30054 (NR_117679.1) y al realizar la comparación con la base de datos GenBank mostró el 99,48% de similitud para *Kosakonia sp.* Cepa WCHEs120001, por lo cual se eligió este género por su alto porcentaje de similitud.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con (Freitas, Almeida, Duarte, Abrão, & Geraseev, 2014; Cámara, Sosa, & Laines, 2011), quienes indican que en el rumen es normal encontrar poblaciones de *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Salmonella spp*, *Klebsiella* y *Enterobacter spp* ya que son microorganismos oportunistas.

4.4 Pruebas de antagonismo In vitro

4.4.1 Bacterias indicadoras

En la tabla 9 se muestran los organismos indicadores usados para realizar las pruebas de antagonismo de *Bacillus amyloliquefaciens*. La cepa HTP01 fue identificada bioquímica mediante el programa de identificación ABIS mostrando el 100% de similitud para la especie *Escherichia coli*. Según Freitas et al., (2014) y Hovenjürgen (2008) *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter spp*, y *Klebsiella* son los principales microorganismos patógenos causantes de diarreas infecciosas en terneros.

Tabla 9
Organismos indicadores para realizar pruebas de antagonismo

Cepas	Especie	Origen
0RP121-02	<i>Kosakonia sp.</i>	Rumen
0RP321-01	<i>Hafnia alvei</i>	Rumen
5L21-01	<i>Kosalonia sp.</i>	Rumen
5L22-02	<i>Escherichia coli</i>	Rumen
HTP01	<i>Escherichia coli</i>	Heces ternero

4.4.2 Pruebas de antagonismo en concentración fija

En la figura 3 se muestran los tamaños de los halos de inhibición según la siguiente clasificación: halos de inhibición de 0-1mm (- o resistente) 1-2 mm (+) 2-4 mm (++) y >4 mm (+++) (Dasari, Devanaboyaina, Wudayagiri, & Valluru, 2014; Neethu, Craig, & Malik, 2015; Zamora, 2005). El tamaño del halo de inhibición de cada BAL frente a cada organismo indicador se muestran en el Anexo 7.3.

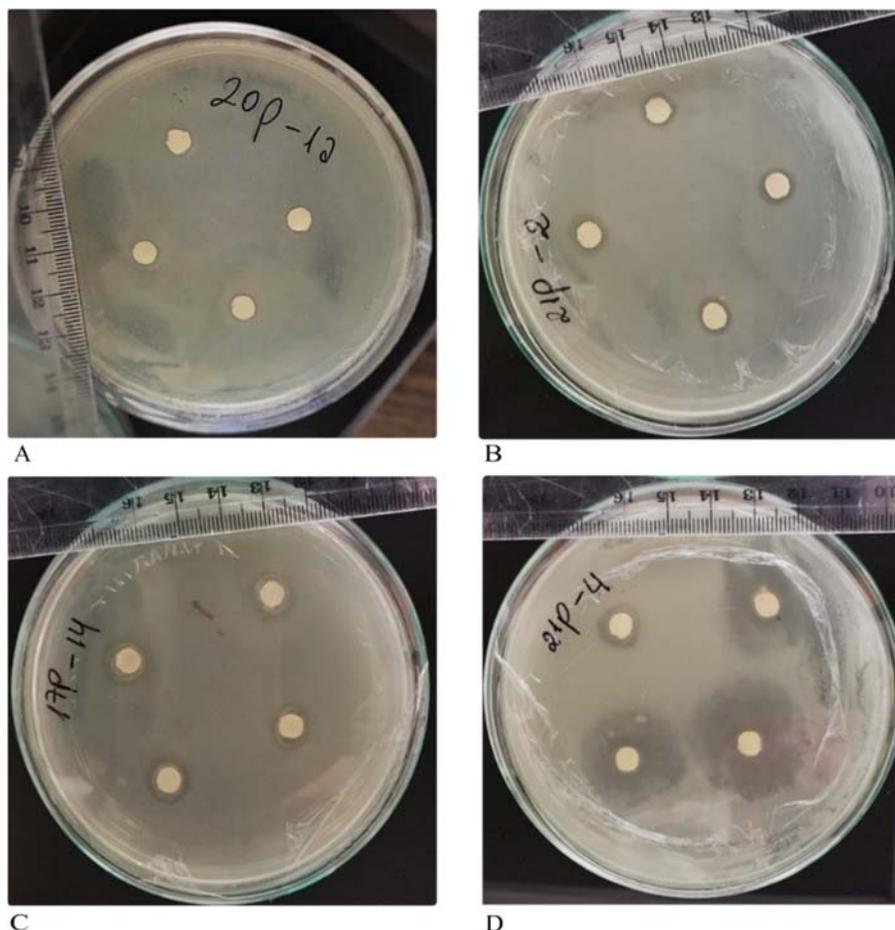


Figura 3 Tamaño de los halos de inhibición (mm): A) 0,35; B) 1,4; C) 2,4; D) >4

Se encontró un efecto significativo de la interacción entre la Cepa antagonista y la cepa de *Enterobacteria*, sobre el tamaño del halo de inhibición ($p < 0,001$), así como un efecto por separado de cepa benéfica ($p < 0,001$) y de la cepa de enterobacterias ($p < 0,001$) sobre el tamaño del halo.

En la tabla 10 se muestra que las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* aisladas del rumen que presentan capacidad antagonista frente a las enterobacterias con halos de inhibición promedio entre 2mm y 5mm. Las cepas 5L22-01, 0RR223-01, 0RR112-01, 0RR222-02, 0RL121-01 y 0RL121-02 mostraron el mayor potencial de inhibición con halos promedio >2mm. Siendo la cepa 5L22-01 la que inhibió en mayor medida a todos los organismos indicadores probados, con halos

promedio de $3,04 \pm 1,39$ mm, el mayor potencial antagónico lo presentó frente a *E. coli* 5L22-02 con halos de $5,328 \pm 0,238$ mm y *Hafnia alvei* ORP321-01 con halos de $4,148 \pm 0,977$ mm.

Las cepas ORR223-01, ORR112-01, ORR222-02, ORL121-01 y ORL121-02 presentaron mayor potencial de inhibición frente a *Escherichia coli* 5L22-02 con halos >3 mm ($5,463 \pm 0,390$; $3,525 \pm 0,424$; $3,068 \pm 0,087$; $3,190 \pm 0,360$; $3,618 \pm 0,172$ mm respectivamente) y *Hafnia alvei* ORP321-01 con halos >2 mm ($3,373 \pm 0,668$; $5,340 \pm 1,335$; $4,050 \pm 0,704$; $3,503 \pm 0,662$; $2,396 \pm 0,493$ mm respectivamente). Sin embargo las cepas ORR223-01 y ORR222-02 no tuvieron un efecto notable frente a *Kosakonia sp* 5L21-01 y la cepa ORR112-01 frente a *Escherichia coli* HTP01; todas con halos de inhibición < 1 mm.

Tabla 10

Resultados de los halos de inhibición (mm) de las 14 BAL frente a las 5 enterobacterias aisladas. Se muestra la media \pm DE de cada cepa BAL y de cada enterobacteria

	Enterobacterias Indicadoras					Media	
	<i>Kosakonia sp.</i> ORP121-02	<i>H. alvei</i> ORP321-01	<i>Kosakonia sp.</i> 5L21-01	<i>E. coli</i> 5L22-02	<i>E. coli</i> HTP01		
Cepas de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ORP121-01	1,295 \pm 0,465	1,585 \pm 0,198	0,393 \pm 0,091	2,140 \pm 0,162	0,503 \pm 0,187	1,20 \pm 0,67 ab
	ORP121-03	0,545 \pm 0,066	3,268 \pm 0,521	1,990 \pm 0,455	2,058 \pm 0,079	0,323 \pm 0,063	1,41 \pm 1,16 abc
	5L22-01	2,493 \pm 0,284	4,148 \pm 0,977	2,605 \pm 0,557	5,328 \pm 0,238	1,543 \pm 0,339	3,04 \pm 1,39 f
	ORL121-01	1,028 \pm 0,030	3,503 \pm 0,662	2,248 \pm 0,216	3,190 \pm 0,360	1,313 \pm 0,336	2,21 \pm 0,98 ef
	ORL121-02	2,243 \pm 0,235	2,396 \pm 0,493	1,060 \pm 0,095	3,618 \pm 0,172	1,093 \pm 0,297	2,11 \pm 0,95 ef
	ORL312-01	1,335 \pm 0,117	3,235 \pm 0,228	1,223 \pm 0,128	1,545 \pm 0,092	0,643 \pm 0,174	1,48 \pm 0,87 bcd
	5L21-02	1,220 \pm 0,164	2,320 \pm 0,285	0,323 \pm 0,090	2,250 \pm 0,186	0,620 \pm 0,142	1,20 \pm 0,85 abc
	ORR112-01	2,368 \pm 0,115	5,340 \pm 1,335	2,120 \pm 0,216	3,525 \pm 0,424	0,698 \pm 0,193	2,34 \pm 1,95 ef
	ORR112-02	2,130 \pm 0,072	2,575 \pm 0,626	2,098 \pm 0,144	2,323 \pm 0,110	1,685 \pm 0,752	2,01 \pm 0,58 de
	ORR221-01	0,640 \pm 0,133	2,62 \pm 0,097	0,260 \pm 0,186	2,420 \pm 0,382	1,118 \pm 0,269	1,41 \pm 0,91 bcd
	ORR223-01	1,805 \pm 0,153	3,373 \pm 0,668	0,508 \pm 0,152	5,463 \pm 0,390	2,313 \pm 0,586	2,47 \pm 1,68 ef
	ORL101-01	2,603 \pm 0,225	2,213 \pm 0,239	0,325 \pm 0,091	3,503 \pm 0,546	1,968 \pm 0,392	2,02 \pm 1,04 de
	ORR222-02	2,120 \pm 0,195	4,050 \pm 0,704	0,718 \pm 0,088	3,068 \pm 0,087	2,730 \pm 0,529	2,30 \pm 1,21 ef
	ORL323-01	0,935 \pm 0,06	3,125 \pm 0,333	0,478 \pm 0,081	3,078 \pm 0,171	1,780 \pm 0,094	1,81 \pm 1,03 cde
Media	1,54 \pm 0,72 b	2,84 \pm 1,31 c	1,09 \pm 0,83 a	2,91 \pm 1,24 c	1,30 \pm 0,73 ab		

Datos centro de la tabla: el color azul oscuro indica el máximo valor y el color rojo indica valores mínimos

Datos de los extremos de la tabla: color verde oscuro indica el máximo valor y el color blanco indica el mínimo valor.

Los resultados obtenidos del potencial de inhibición de *Bacillus amyloliquefaciens* concuerdan con las investigaciones realizadas por (Niazi, 2014; Llarío, Romano, Rodilla, & Poersch, 2018; Lee, Park, & Cho, 2012; Feria, Castañeda, Toledo, Castillo, & Cedeño, 2019), además mencionan que el potencial de inhibición de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* se le atribuye a la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas.

Tabla 11

Evaluación cualitativa del potencial de inhibición de las Bacterias ácido lácticas frente a enterobacterias

Cepas	<i>Kosakonia sp</i> ORP121-02	<i>Hafnia alvei</i> ORP321-01	<i>Kosakonia sp</i> 5L21-01	<i>Escherichia coli</i> 5L22-02	<i>Escherichia coli</i> HTP01
ORP121-01	+	+	-	++	-
ORP121-03	-	++	+	++	-
5L22-01	++	+++	++	+++	+
ORL121-01	+	++	++	++	+
ORL121-02	++	++	+	++	+
ORL312-01	+	++	+	+	-
5L21-02	+	++	-	++	-
ORR112-01	++	+++	++	++	-
ORR112-02	++	++	++	++	+
ORR221-01	-	++	-	++	+
ORR223-01	+	++	-	+++	++
ORL101-01	++	++	-	++	+
ORR222-02	++	+++	-	++	++
ORL323-01	-	++	-	++	+

0-1mm (-) 1-2 mm (+) 2-4 mm (++) y >4 mm (+++)

En la tabla 11 se muestra la evaluación cualitativa del potencial de inhibición de las BAL frente a organismos indicadores. Las enterobacterias presentaron ciertos grados de susceptibilidad frente a las diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens*, siendo las más susceptibles *Escherichia coli* 5L22-02 con un halo promedio de $2,91 \pm 1,24$ mm y *Hafnia alvei* ORP321-01 con un valor promedio de $2,84 \pm 1,31$ mm; las cuales fueron inhibidas por las 14 cepas antagonistas. Mientras que las enterobacterias más resistentes fueron *Kosakonia sp* 5L21-01 que fue inhibida por 7 cepas

y *Escherichia coli* HTP01 que fue inhibida por 9 cepas, estas enterobacterias no presentaron diferencias significativas en el tamaño del halo de inhibición.

Las dos cepas indicadoras de *Escherichia coli* usadas en el estudio presentaron un comportamiento diferente frente a las cepas BAL, la cepa 5L22-02 presentó mayor susceptibilidad mientras que la cepa HTP01 mostró resistencia, este efecto fue causado por el lugar de origen de las cepas, es decir la cepa 5L22-02 es autóctona del rumen e interactuó con las cepas patógenas en este compartimento y la cepa HTP01 al no haber interactuado anteriormente con las enterobacterias ruminales presentó mayor resistencia frente a las BAL. Estas cepas pertenecen a la misma especie sin embargo se desarrollaron en distintos ambientes por lo que el efecto que tienen frente a las cepas antagonistas es diferente (Tabla 11).

Los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los presentados por (Penaloza, Li, & Rayas, 2019; Feria, Castañeda, Toledo, Castillo, & Cedeño, 2019; Syazwan, Rahman, Yusof, Syahir, & Sabri, 2019 ; Tabasum, y otros, 2014), donde han encontrado que *B. amyloliquefaciens* inhibe eficientemente a *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Enterococcus cecorum*, *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas hydrophila* y *Klebsiella sp.*

Se evaluó el potencial antagonista de las 14 cepas correspondientes a *B. amyloliquefaciens*, obteniéndose diferencias de la actividad microbiana entre cepas de la misma especie, estos resultados concuerdan con Peña & Sánchez (2016), ya que indican que las cepas de una misma especie presentan distinto potencial de inhibición por la diversidad genética, modo de acción y los factores ambientales.

4.4.3 Efecto de la concentración de las BAL

En la figura 4 se observa que las concentraciones de las BAL tienen un efecto sobre el tamaño del halo de inhibición. Los tamaños de los halos de inhibición obtenidos en este ensayo se encuentran en el Anexo 7.4.

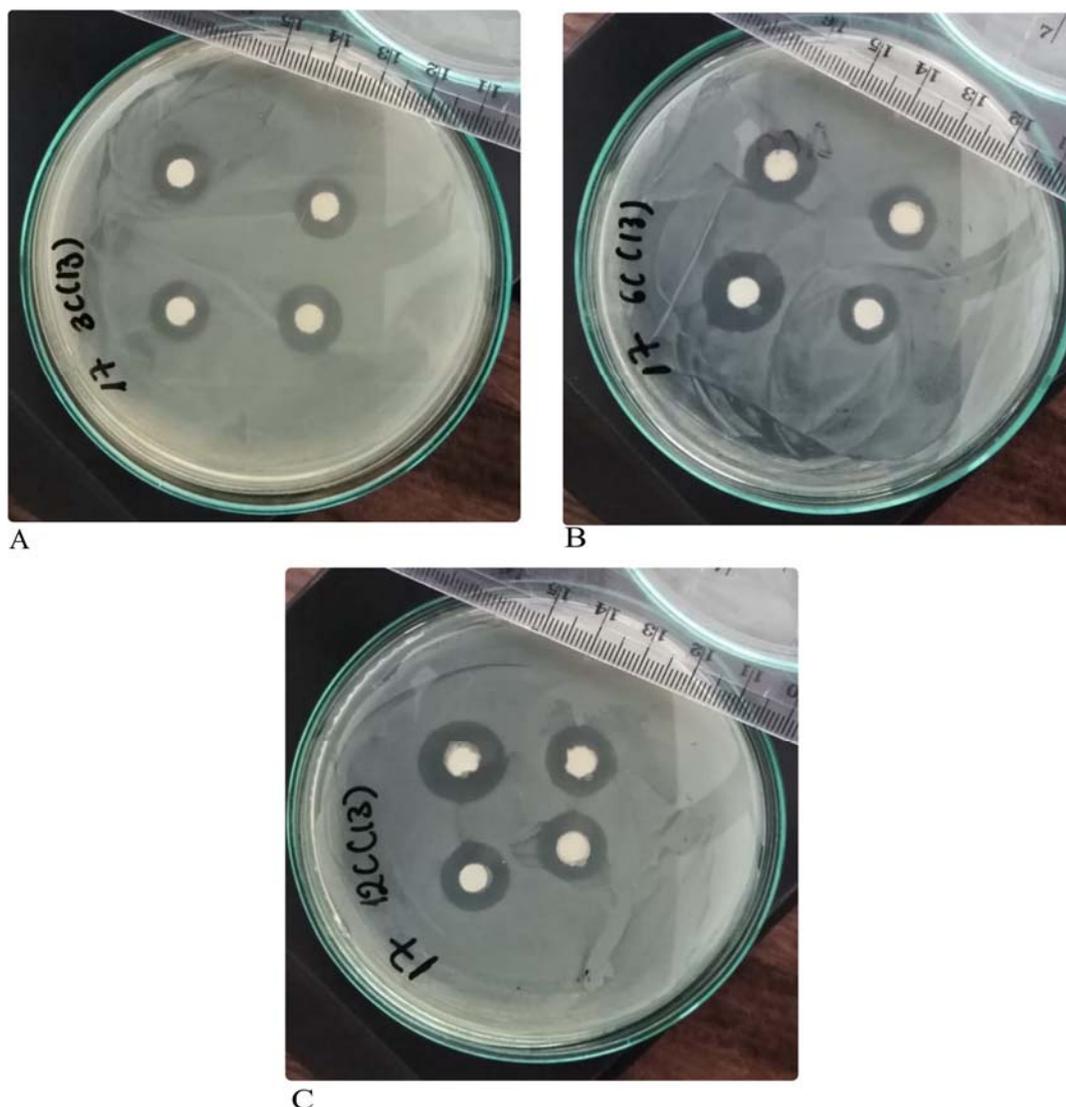


Figura 4 Tamaño del halo de inhibición a tres concentraciones:
A) 3×10^8 UFC/ml; B) 6×10^8 UFC/ml; C) 12×10^8 UFC/ml

En la tabla 5 se muestra que la concentración tuvo un efecto significativo en el tamaño del halo de inhibición ($p < 0,001$), es decir se observó un comportamiento directamente proporcional a la concentración de las BAL sobre el tamaño del halo. Estos resultados concuerdan con (Hasslof, Hedberg, Twetman, & Stecksén, 2018; Jurado, Romero, & Morillo, 2016), quienes indican que a medida que aumenta la concentración del antagonista mayor será el tamaño del halo de inhibición.

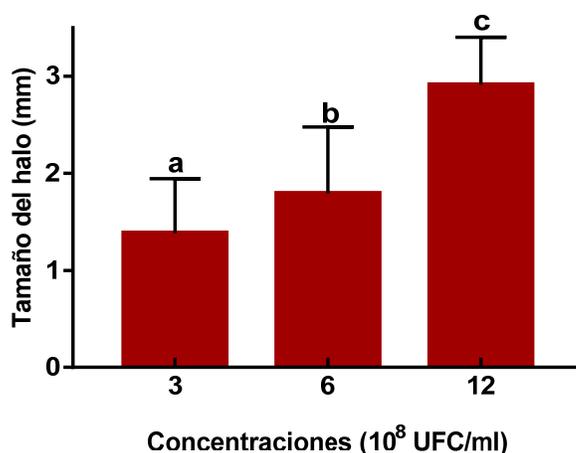
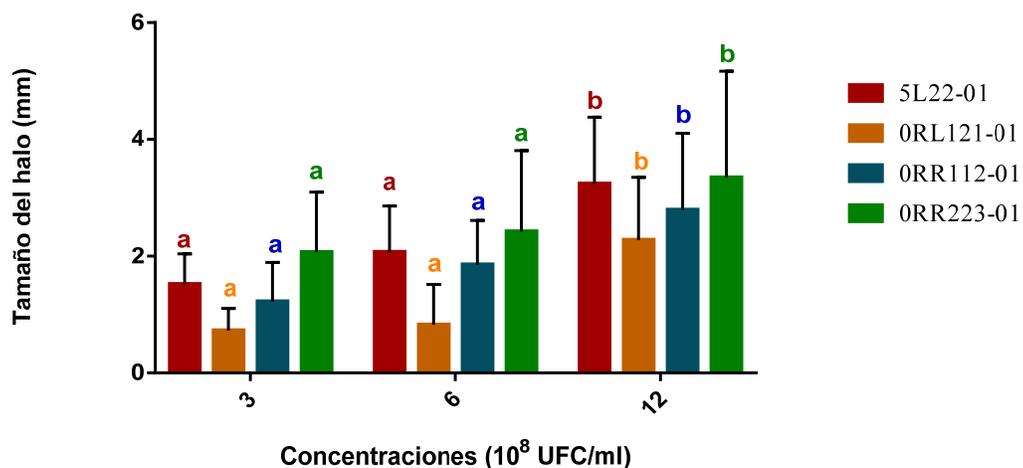


Figura 5 Promedio \pm D.E. del halo de inhibición bajo 3 concentraciones

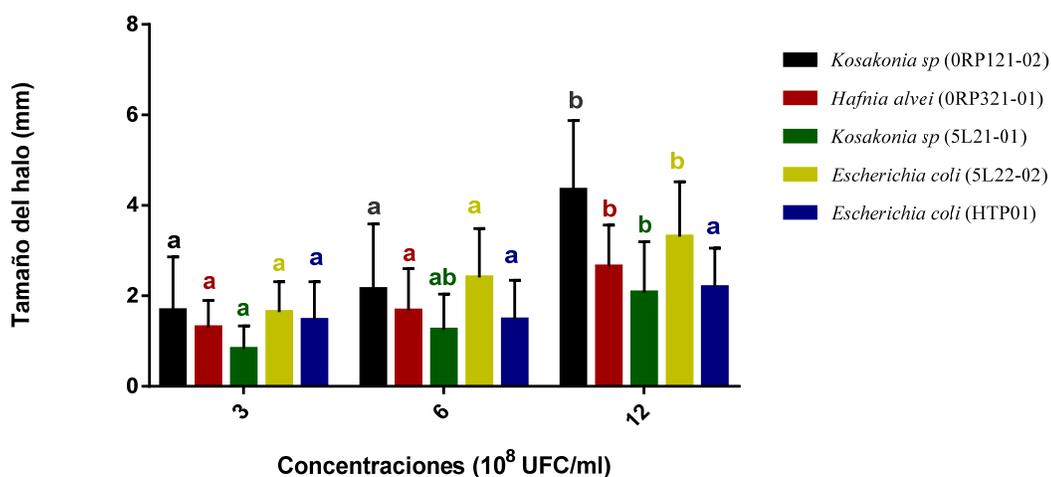
Se encontró un efecto significativo de la interacción concentración x BAL sobre el tamaño del halo ($p < 0,001$). Las cepas 5L22-01, 0RR112-01 y 0RR223-01 presentaron un tamaño de halo proporcional a las concentraciones mientras que en la cepa 0RL121-01 se observa que a una concentración de 12×10^8 UFC/ml se duplica el tamaño del halo de inhibición (Figura 6A).

Los organismos indicadores *Kosakonia sp* 0RP121-02, *Hafnia alvei* 0RP321-01 y *Escherichia coli* 5L22-02 fueron inhibidos bajo las tres concentraciones de las cepas antagonistas observándose que el tamaño del halo de inhibición es proporcional a la concentración de las BAL. Por otro lado la concentraciones de las cepas antagonistas no tuvieron un efecto significativo frente

a *Escherichia coli* HTP01 ($p > 0,05$), mientras que la cepa *Kosakonia sp* 5L21-01 mostró diferencias significativas bajo concentraciones entre 3×10^8 UFC/ml y 12×10^8 UFC/ml ($p < 0,001$) (Figura 6B).



A)



B)

Figura 6 Promedio \pm D.E. del halo de inhibición A) 4 cepas benéficas x 3 concentraciones; B) 5 cepas de enterobacterias x 3 concentraciones

4.5 Cinética de crecimiento

Se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias que mostraron mayor potencial antagonico, las cepas 5L22-01, 0RL121-01, 0RR112-01, 0RR223-01, 0RL121-02 y 0RR222-02 fueron cultivadas en 50ml de medio peptonado MOLP.

La concentración inicial después de la siembra fue de 9.6×10^6 UFC/ml. Posteriormente se tomó lecturas de la concentración por turbidez a las 0,2,4,6,8,10,14,16,18,20,24 horas y los resultados de estas lecturas se muestran en el Anexo 7.3.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que *Bacillus amyloliquefaciens* en medio peptonado molp alcanzó la fase exponencial en 10 horas, presentando una velocidad de crecimiento de 0.12 horas^{-1} (Figura 7) lo que demuestra que estas cepas tienen rápido crecimiento, característica indispensable para producción masiva. Estos resultados son similares a otras investigaciones realizadas donde indican que la fase de crecimiento exponencial es de 10 y 12 horas con una velocidad de crecimiento de entre 0.11 horas^{-1} y $0,2 \text{ horas}^{-1}$ (Moncada, 2014). La cinética de crecimiento de esta bacteria es similar a las bacterias del género *Lactobacillus* ya presentan una fase exponencial de 12 horas. Para realizar producción masiva es importante evaluar la cinética de crecimiento y determinar las fases de: latencia, exponencial y estacionaria (Jurado, Romero, & Morillo, 2016).

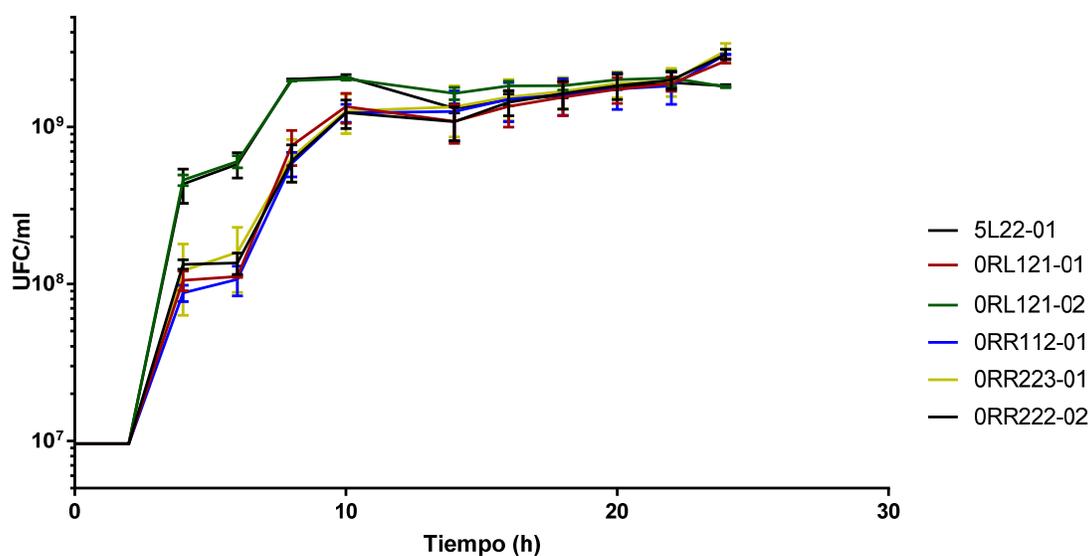


Figura 7 Cinética de crecimiento de las cepas de *B. amyloliquefaciens* con mayor potencial antagonista

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* mostraron un eficiente potencial antagonista frente a *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* y *Kosakonia sp.* ya que presentaron los mayores halos de inhibición promedio entre 2 y 5mm.

El uso de bolsas de digestibilidad con tres medios de captura (Agar leche, Agar rogosa y PDA) para secuestro de bacterias del rumen fue eficiente ya que permitió aislar 17 cepas bacterianas, 14 Gram positivas y 3 Gram negativas.

La secuenciación del gen 16S permitió identificar las cepas aisladas, encontrándose que los 14 bacilos benéficos Gram positivos corresponden a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, mientras que las cepas de bacilos patógenos Gram negativos corresponden a las especies *Hafnia alvei* (ORP321-01); *Escherichia coli* (5L22-02, HTP01) y *Kosakonia sp* (ORP121-02, 5L21-01).

Las cepas 5L22-01 y ORR223-01 presentaron el mayor potencial de inhibición frente a las enterobacterias. Además se encontró que las bacterias más resistentes a *B. amyloliquefaciens* fueron *Kosakonia sp.* 5L21-01 y *Escherichia coli* HTP01.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda evaluar in vivo el potencial antagonista de *Bacillus amyloliquefaciens* 5L22-01, con el fin de corroborar el efecto inhibitorio frente a enterobacterias.

Se sugiere usar *Bacillus amyloliquefaciens* cepa 5L22-01 como probiótico en terneros para evaluar la incidencia de diarreas causadas por enterobacterias patógenas.

Para el secuestro de bacterias ruminales se recomienda utilizar bolsas de digestibilidad con medios de captura (Agar leche, Agar rogosa y PDA).

Evaluar rangos de concentraciones superiores a los probados con las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

5.3 Bibliografía

- Alvarado, C., & Díaz, C. (2017). *EFEECTO ANTAGÓNICO DE Lactobacillus plantarum AISLADO DE PASTIZAL DE FINCA LECHERA*.
- Beltran, L. (2011). *INMUNIDAD DEL BECERRO RECIEN NACIDO*.
- Cámara, K., Sosa, J., & Laines, J. (2011). *Microorganismos que intervienen en la generación de biogás*.
- Castillo, A., Burrola, M., & Chávez, J. D. (2014). *Rumen microorganisms and fermentation*.
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en microbiología*.
- Cotelo, M. F. (2010). *Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos*.
- Creevey, C., Kelly, W., Henderson, G., & Leahy, S. (2014). *Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome*.
- Cueva, D. (2014). *EFEECTO DE DOS ADITIVOS PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO Y CONDICIÓN CORPORAL EN TERNERAS Holstein friesian, TUMBACO, PICHINCHA*.
- Dasari, S., Devanaboyaina, R., Wudayagiri, R., & Valluru, L. (2014). *Antimicrobial activity of Lactobacillus against microbial flora of cervicovaginal infections*.
- Elshaghabee, F., Rokana, N., Gulhane, R., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives*.
- Estación meteorológica "Hacienda El Prado". (2017). *Ubicación ecológica*.
- FAO . (2002). *Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*.
- FAO. (2017). *Producción ganadera*.

- Feria, M., Castañeda, A., Toledo, O., Castillo, D., & Cedeño, M. C. (2019). *Caracterización molecular ómica de una cepa de Bacillus amyloliquefaciens aislada de la microbiota del paiche Arapaima gigas con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces.*
- Fraga, M. (2010). *Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos .*
- Freitas, C., Almeida, P., Duarte, E., Abrão, F., & Geraseev, R. C. (2014). *Aerobe and anaerobe facultative Gram-negative bacteria rod-shaped in the ruminal fluid of dairy cattle fed with different diets containing tropical forages.*
- García, Y., García, Y., López, A., & Boucourt, R. (2005). *Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal.*
- González, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). *MEDIOS DE CULTIVO DE MICROBIOLOGÍA.*
- Google Maps. (2018). *Hacienda el prado.*
- Görgülü, M., Siuta, A., Yurtseven, S., Öngel, E., & Kutlu, H. (2006). *Efecto de probióticos en el comportamiento y salud de terneros en crecimiento.*
- Gramal, A. (2014). *Efecto del suministro de grasa By-Pass mediante suplementación como fuente de energía en vacas en etapa de postparto (balance energético negativo) en la hacienda San Carlos Tabacundo .*
- Guerrero, A. C. (2011). *Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa.*
- Gutama, N. (2017). *ANALISIS DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS BOVINOS DE LOS CANTONES DE AZUAY .*
- Hasslof, P., Hedberg, M., Twetman, S., & Stecksén, C. (2018). *Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli – an in vitro study .*
- Hovenjürgen, M. (2008). *CRÍA DE TERNEROS .*

- Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC. (2018). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*.
- Jurado, H., Romero, A., & Morillo, A. (2016). *KINETIC, TEST OF GROWTH AND INHIBITION EFFECT Lactococcus lactis ON Yersinia pseudotuberculosis*.
- Lanuza, F. (2014). *CRianza DE TERNEROS Y REEMPLAZOS DE LECHERÍA*.
- Lee, J., Park, I., & Cho, Y. C. (2012). *Bacillus strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties*.
- Llamas, J. (2011). *aislamiento e identificación de la microflora bacteriana ruminal en vacas holstein alimentadas con subproductos de cervecería*.
- Llario, F., Romano, L., Rodilla, M., & Poersch, L. (2018). *Application of Bacillus amyloliquefaciens as probiotic for Litopenaeus vannamei (Boone) cultivated in a biofloc system*.
- López, J. (2017). *EVALUACIÓN DE Bacillus amyloliquefaciens SOBRE INCIDENCIA DE Fusarium oxysporum EN ARVEJA CHINA*.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). *The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition*.
- Moncada, R. N. (2014). *Evaluación de extractos de Bacillus amyloliquefaciens EA-CB0123 para la recuperación de suelos bananeros contaminados con Ralstonia solanacearum*.
- Neethu, M., Craig, R., & Malik, A. (2015). *Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of Lactobacilli Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents*.

- Niazi, A. (2014). *Genome-wide Analyses of Bacillus amyloliquefaciens Strains Provide Insights into their Beneficial Role on Plants* .
- Oña, J. (2016). *CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE GAS in vitro DEL RASTROJO DE Amaranthus cruentus EN BOVINOS* .
- Palomino, C., & Y. G. (2014). *TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS: VENTAJAS Y LIMITACIONES*.
- Penaloza, A., Li, M., & Rayas, P. (2019). *Isolation and characterization of Bacillus spp. strains as potential probiotics for poultry*.
- Peña, J., & Sánchez, L. (2016). *Actividad antimicrobiana de cepas de Lactobacillus spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina*.
- Ramos, M., & Pérez, M. (2005). *Microbiología general* .
- Reyes, J. (2012). *Evaluación de la digestibilidad in situ de los nutrientes y variables ruminales del ensilado de caña de azúcar con diferente fuente de proteína* .
- Rodríguez, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora* .
- Rustrián, E., Ramírez, D., Solano, G., & Anda, M. (2013). *Preliminary study of Enterobacterias biochemical identification* .
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., & Ferreira, C. d. (2015). *Cepas de Lactobacillus spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos*.
- Sánchez, N. (2015). *Evaluación del efecto probiótico de las cepas Lactobacillus reuteri CECT7266 y Lactobacillus fermentum CECT7265 en perros sanos*.
- Saquipay, D. (2011). *ALIMENTACION DE TERNERAS DE REEMPLAZO*.

- Syazwan, M., Rahman, R. N., Yusof, M., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). *Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, Heterotrigona itama, honey, bee bread and propolis* .
- Tabasum, S., Islam, M., Mun, H.-S., Sim, H.-J., Kim, Y.-J., & Yang, C.-J. (2014). *Effects of Bacillus amyloliquefaciens as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens*.
- Tepán, R. (2012). “*Diarrea Neonatal de los Terneros*” .
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2013). *Microbiology*.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., & Shimosato, T. (2015). *Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity* .
- Valencia, L. (2019). *Evaluación de las cepas Bacillus subtilis EA-CB0015 y Bacillus amyloliquefaciens EA-CB0959 sobre cuatro hongos patógenos de arroz* .
- Villamil, C. (2014). *ANTAGONISMO MICROBIANO*.
- Villarreal, M. F., Villa, E. D., & Estrada, L. A. (2017). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad* .
- Villota, G. (2016). *ACTIVIDAD BIOFLOCULANTE DE Pseudomonas luteola, Bacillus coagulans y Bacillus amyloliquefaciens EN SUSPENSIONES DE CAOLÍN* .
- Vizcaíno, A., & Lema, J. (2012). *EFFECTO INMUNOMODULADOR Y ZOOTÉCNICO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE UN PROBIÓTICO (Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus gasseri) EN TERNERAS LECHERA*.
- Zamora, L. (2005). *AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS ANTAGONISTAS DE MICROBIOTA CONTAMINANTE DE SANGRE DE MATADERO* .

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*, J Comput Biol 2000; 7(1-2): 203-14.