



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Obtención de cepas probióticas a partir de diferentes sustratos de origen orgánico de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Noemy María Cevallos Álvarez

**Tutor:** Msc. María Daniela Garcés Moncayo

**Ambato – Ecuador**

**Febrero - 2024**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

MSc. Maria Daniela Garcés Moncayo

### **CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero de 2024

---

MSc. Maria Daniela Garcés Moncayo

CI 1803571585

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Noemy María Cevallos Álvarez, manifestó que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las referencias bibliográficas.



---

Noemy María Cevallos Álvarez

1750680140

**AUTOR**

## **DERECHOS DEL AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi trabajo del Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Noemy María Cevallos Álvarez

1750680140

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova  
CI 1803601853

---

PhD. William Ricardo Calero Cáceres  
CI 1714344885-9

---

MSc. Danae Fernández Rivero  
CI 175718120-9

Ambato, 05 de febrero de 2024

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco a Dios por darme la fortaleza y sabiduría para  
culminar esta etapa de mi vida*

*A mis padres Gloria y Jeovanny por su  
apoyo, sus consejos, por ser uno de mis motivos para seguir  
adelante, sin ustedes nada de esto sería posible gracias por ser  
mi luz en mi camino.*

*A mi hermana Jeovanna por su apoyo incondicional, porque  
siempre ha estado para mí en los malos y buenos momentos*

*A mi novio Kevin por estar a mi lado animándome*

*A mi tutora María Daniela Garcés por su paciencia,  
dedicación y apoyo en este proceso, gracias por todo su  
esfuerzo en este proyecto*

*Al Doctor William Calero por sus consejos y apoyo.*

*A mis amigas Dania y Shirley que han estado siempre conmigo  
compartiendo esta etapa de nuestras vidas, gracias por cada lindo  
momento y recuerdos.*

*A mis compañeros de laboratorio Analía, Mica, Naty y Pame  
por su apoyo.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR .....</b>	<b>i</b>
<b>AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DERECHOS DEL AUTOR .....</b>	<b>iii</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN EJECUTIVO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1    Antecedentes Investigativos .....	1
1.2    Generalidades Globales .....	2
1.2.1    Industria ganadera.....	2
1.2.2    Utilización de los antibióticos en la industria ganadera. ....	3
1.2.3    Resistencia a los antimicrobianos (RAM) .....	4
1.2.4    Probióticos como alternativa ante el uso de antibióticos.....	6
1.2.4.1    Probióticos.....	6
1.2.4.2    Mecanismo de acción de los probióticos.....	7
1.2.5    Fuentes de aislamiento de cepas probióticas .....	8

1.2.6	Ventajas del aislamiento de cepas probiótica nativas .....	9
1.2.7	Parámetros para evaluar el potencial probiótico .....	9
1.2.8	Hipótesis y variables.....	10
1.2.8.1	Hipótesis alternativa .....	10
1.2.8.2	Hipótesis alternativa .....	10
1.2.8.3	Variable independiente .....	11
1.2.8.4	Variable independiente .....	11
1.3	Objetivos.....	11
1.3.1	Objetivo General.....	11
1.3.2	Objetivo Específicos .....	11
<b>CAPITULO II.- METODOLOGÍA .....</b>		<b>12</b>
2.1	Materiales .....	12
2.2	Métodos .....	16
2.2.1	Aislamiento de los microorganismos probióticos de muestras de heces bovinas, fermento de yuca y caña.....	16
2.2.1.1	Fermentación de las muestras vegetales .....	16
2.2.1.2	Recolección de muestra de heces. ....	16
2.2.1.3	Diluciones seriadas, siembra e incubación.....	16
2.2.1.4	Selección de cepas probióticas y purificación.....	17
2.2.1.5	Generación de biomasa y criopreservación. ....	17
2.2.2	Pruebas <i>in vitro</i> para predecir el potencial probiótico de las cepas aisladas	
	18	



2.2.2.1	Hidrofobicidad de la superficie celular.....	18
2.2.2.2	Prueba de hemólisis .....	18
2.2.2.3	Tolerancia a condiciones ácidas (pH ácido).....	18
2.2.2.4	Tolerancia a las sales biliares .....	19
2.2.2.5	Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.....	19
2.2.2.6	Actividad antagónica .....	20
2.2.3	Identificación de las cepas aisladas .....	21
2.2.3.1	Preparación del inocular .....	21
2.2.3.2	Baterías API.....	21
<b>CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>22</b>
3.1	Análisis y discusión de los resultados .....	22
3.1.1	Aislamiento de probióticos.....	22
3.1.2	Evaluación del potencial probiótico de las cepas aisladas .....	24
3.1.2.1	Hidrofobicidad de la superficie celular.....	24
3.1.2.2	Actividad Hemolítica.....	25
3.1.2.3	Tolerancia a condiciones ácidas (pH ácido).....	27
3.1.2.4	Tolerancia a sales biliares.....	29
3.1.2.5	Susceptibilidad a los antibióticos .....	31
3.1.2.6	Actividad antagónica .....	34
3.1.3	Identificación de las cepas aisladas .....	35
3.2	Verificación de hipótesis .....	38

<b>CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
4.1    Conclusiones.....	39
4.2    Recomendaciones .....	40
<b>MATERIALES DE REFERENCIA .....</b>	<b>41</b>
Referencias Bibliográficas.....	41
Anexos .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	12
Materiales de laboratorio.....	12
Tabla 2.....	14
Equipos de laboratorio.....	14
Tabla 3.....	14
Reactivos .....	14
Tabla 4.....	20
Antibióticos .....	20
Tabla 5.....	22
Banco de cepas con características morfológicas y fenotípicas .....	22
Tabla 6.....	27
Tolerancia a condiciones de 3 pH. ....	27
Tabla 7.....	29
Tolerancia a condiciones de 2 pH. ....	29
Tabla 8.....	30
Tolerancia a condiciones de sales biliares.....	30
Tabla 9.....	33
Susceptibilidad a los antibióticos .....	33
Tabla 10.....	34
Actividad Antagónica contra la cepa patógena .....	34
Tabla 11.....	36

Identificación de las cepas aisladas .....	36
Tabla 12. ....	57
Prueba de rojo Congo y Hemolisis .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	5
Vías de transmisión de los genes resistentes a los antibióticos .....	5
Figura 2.....	8
Mecanismo de acción de los probióticos .....	8
Figura 3.....	24
Prueba de rojo Congo .....	24
Figura 4.....	25
Porcentaje de las cepas aisladas con capacidad de hidrofobicidad .....	25
Figura 5.....	26
Porcentaje de la actividad hemolítica de las muestras de yuca, caña de azúcar y heces bovinas.....	26
Figura 6.....	35
Actividad antagónica de las cepas asiladas .....	35
Figura 7.....	55
Recolección de muestras vegetales en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas .....	55
Figura 8.....	55
Morfología de las cepas aisladas .....	55
Figura 9.....	56
Tinción de Gram.....	56
Figura 10.....	56
Prueba de Hemolisis .....	56
Figura 11.....	58
Tolerancia a pH bajos .....	58
Figura 12.....	58
Tolerancia a sales biliares.....	58
Figura 13.....	59

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos ..... 59

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Recolección de muestras vegetales.....	55
Anexo 2.	Morfología de las cepas aisladas .....	55
Anexo 3.	Tinción de Gram.....	56
Anexo 4.	Prueba de Hemolisis .....	56
Anexo 5.	Prueba de rojo Congo y Hemolisis .....	57
Anexo 6.	Tolerancia a pH bajos .....	58
Anexo 7.	Tolerancia a sales biliares.....	58
Anexo 8.	Prueba de susceptibilidad a los antibióticos .....	59

## RESUMEN EJECUTIVO

El estudio consiste en la obtención de cepas probióticas de tres muestras yuca, caña de azúcar y heces bovinas, como una alternativa ante el uso de antibióticos en el sector ganadero y contrarrestar la propagación de los genes de resistencia (RAM), debido a que, los probióticos son microorganismos vivos que tiene efecto positivo sobre la salud del huésped.

Las 63 cepas obtenidas de las tres muestras tienen las características fenotípicas de los microorganismos probióticos modelos como es catalasa negativa, Gram positivas, con morfología redonda cremosas o blancas. De igual forma, se evaluó el potencial probiótico de las cepas mediante pruebas *in vitro* como la adhesión celular, tolerancia a condiciones gastrointestinales como a pH bajos y concentraciones a sales biliares. También la selección de cepas probióticas, deben satisfacer criterios de seguridad no deben ser tóxicos o patógenos, susceptibles a los antibióticos, sin actividad hemolítica y tener actividad antagónica contra patógenos.

Finalmente, solo dos cepas de las muestras de yuca y caña de azúcar tienen las mejores características y mejor eficiencia para ser considerados cepas probióticas, debido a que no presentaron actividad hemolítica y poseen adhesión celular, tiene la capacidad de sobrevivir a pH de 2 a 3 y sales biliares de 0,3 a 0,5 por ciento, tuvieron susceptibilidad a seis antibióticos con el mayor rango de inhibición a comparación de otras cepas, sin embargo, ninguna cepa presentó actividad antagónica contra la bacteria *E. coli*.

**Palabras clave:** probióticos, *in vitro*, antibióticos, microbiología



## ABSTRACT

The study consists of obtaining probiotic strains from three samples of cassava, sugar cane and bovine feces, as an alternative to the use of antibiotics in the livestock sector and to counteract the spread of resistance genes (RAM), since probiotics are live microorganisms that have a positive effect on the health of the host.

The 63 strains obtained from the three samples have the phenotypic characteristics of model probiotic microorganisms such as catalase negative, Gram positive, with creamy or white round morphology. Likewise, the probiotic potential of the strains was evaluated by *in vitro* tests such as cell adhesion, tolerance to gastrointestinal conditions such as low pH and bile salt concentrations. Also, the selection of probiotic strains should satisfy safety criteria, they should not be toxic or pathogenic, susceptible to antibiotics, without hemolytic activity and have antagonistic activity against pathogens.

Finally, only two strains from the cassava and sugar cane samples have the best characteristics and best efficiency to be considered probiotic strains, because they did not present hemolytic activity and have cell adhesion, can survive at pH 2 to 3 and bile salts of 0.3 to 0.5 percent, had susceptibility to six antibiotics with the highest range of inhibition compared to other strains, however, no strain presented antagonistic activity against *E. coli* bacteria.

**Key words:** probiotics, *in vitro*, antibiotics, microbiology

## CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes Investigativos

El sector ganadero es considerado en muchos países como una actividad de alto ingreso económico debido a la gran demanda de productos de origen animal (**Bowles et al., 2019**). Los países como Estados Unidos, Brasil, Australia y Argentina son los productores con mayor producción cárnica (**Surve et al., 2022**), registrando en el año 2018, una fabricación de 71.1 millones de toneladas de carne bovina, de igual forma, la producción de leche en todo el mundo se estima 264 millones de vacas lecheras (**Shao et al., 2021**). En Ecuador, en el año 2020 se han reportado que el 40% de la actividad económica se basa en la producción ganadera (**Banco Central del Ecuador, 2020**).

Por esta razón se ha empleado por años los antibióticos como una opción de promotor de crecimiento y prevención de enfermedades (**Meerza et al., 2022**). Sin embargo, el mal manejo y el uso indebido de los antibióticos en el sector ganadero contribuye a la resistencia microbiana disminuyendo la efectividad en los tratamientos de infecciones bacterianas (**Y. Zhao et al., 2021a**). Considerándose un peligro para la salud humana, según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud el empleo de antimicrobianos en el sector ganadero aumentará en más de un 50% para el 2030 (**World Health Organization, 2020**). Por tal argumento, se busca nuevas alternativas para promover la nutrición animal y la prevención de enfermedades (**Panesar & Anal, 2022**).

Los probióticos son una alternativa segura para el mejoramiento de la salud de los animales, debido a que, se consideran microorganismos vivos que tiene efecto sobre la salud del huésped a corto y largo plazo (**Zendeboodi et al., 2020**). Manteniendo el equilibrio de la microbiota intestinal, la producción de sustancias antimicrobianas, prevención de la colonización de bacterias patógenas y aumento de peso en el ganado (**Salminen et al., 2021**).

Muchas especies de probióticos se pueden encontrar en alimentos fermentados, plantas, suelos, heces de humanos y heces animales (**Mojikon et al., 2022**), asimismo, las zonas geográficas, las propiedades de los alimentos y la obtención de cepas del mismo huésped influyen en las propiedades probióticas consiguiendo una mayor probabilidad de supervivencia y colonización en el tracto gastrointestinal, por lo cual, los productos fermentados y las heces animales son consideradas una fuente prometedora de nuevas

cepas nativas de probióticos (**Bazireh et al., 2020**).

Sin embargo, para considerarse probióticos aptos para el uso humano o animal deben cumplir ciertos criterios específicos como la capacidad de sobrevivencia en pH bajos, en presencia de sales biliares, la capacidad de adherirse a las células epiteliales, competencia contra bacterias patógenas, actividad no hemolítica y sin la generación de genes resistentes a antibióticos (**Patrone et al., 2021**). De tal forma, las investigaciones enfocadas en el aislamiento de nuevas cepas probióticas pueden representar una opción de suplemento nutricional para animales del ganado.

En base a lo mencionado, la presente investigación plantea la obtención de cepas probióticas a partir de diferentes sustratos orgánicos de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador, con la finalidad de aislar cepas nativas con alto potencial probiótico para fortalecer el sistema inmunológico y crecimiento del ganado bovino.

## **1.2 Generalidades Globales**

### **1.2.1 Industria ganadera**

Se estima un aumento considerable en la población mundial, alcanzando los 9 mil millones de habitantes para el año 2050, provocando la aceleración de producción de recursos alimenticios al 70 %. Por tal razón, la industria ganadera se posiciona como un actor clave a nivel global, dada su considerable demanda en la producción de carnes, considerándose una de las principales actividades económicas de numerosos países (**Morrone et al., 2022**).

Los principales países con mayor progreso ganadero a nivel global son Estados Unidos, Brasil, China, Unión Europea, India, Argentina y México. En donde, América Latina representa la cuarta parte de producción de carne y de proteína animal en todo el mundo, asimismo, el 24 % pertenece a la producción de carne de pollo, el 11 % a la carne de vacuno y el 7 % a la producción de carne de cerdo (**Williams & Anderson, 2020**).

El Ecuador se encuentra en los diez mejores países con mayor producción ganadera de América Latina, en las regiones de la Costa y Sierra se concentra la mayor actividad ganadera del país, siendo las provincias de Manabí, Guayas, Santo Domingo, Cotopaxi, Tungurahua y Pichincha, las que se dedican a la cría de ganado bovino, búfalos, producción de leche y mejoramiento genético vacuno, representando aproximadamente

el 40% de la actividad económica y alrededor del 8% del PIB en el Ecuador (**Vinueza et al., 2022**).

### **1.2.2 Utilización de los antibióticos en la industria ganadera.**

Con el objetivo de atender las demandas del mercado ganadero y afrontar el crecimiento poblacional, durante muchos años se consideró el uso de antibióticos como una alternativa para promover el desarrollo animal, la prevención de enfermedades, el aumentando de la productividad y rentabilidad del ganado (**Robles-Jimenez et al., 2022; Saeed et al., 2022**).

La utilización de los antibióticos como promotores de crecimiento y como tratamientos para enfermedades bacterianas han sido empleado por más de 50 años, a causa de, su fácil acceso y precio económico, por la creencia equívoca de los ganaderos, que la administración de grandes cantidades de antibióticos en los animales y en los piensos permitiría una mayor producción del ganado (**Van et al., 2015**). El empleo de los antimicrobianos en los animales a nivel mundial se estima un valor de 45 mg/kg en el ganado vacuno, 172 mg/kg para los criaderos de cerdos, por último, 148 mg/kg para la producción de pollos (**Ma et al., 2021**).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) afirma que el 80 % del uso de los antibióticos en Estados Unidos está dirigida para el sector ganadero (**Cardelle-Cobas et al., 2023**). Los antibióticos más utilizados en el sector ganadero son las sulfonamidas, tetraciclinas y penicilina que permite la prevención de enfermedades y el engorde de los animales, de igual forma, en diversos estudios se han encontrado residuos de antimicrobianos en las heces del ganado de engorde como clortetraciclina, ciprofloxacino, oxitetraciclina y enrofloxacino, siendo una preocupación de contaminación de antimicrobianos, debido a que, el estiércol animal es utilizado como fertilizante en estanques de producción de crecimiento de peces y cultivos (**Zhao et al., 2010**).

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), el consumo de antibióticos en todos los sistemas ganaderos continuaría aumentando dramáticamente en un 67 % para 2030 (**Ma et al., 2021**). Debido a la presencia de diversas enfermedades que adquieren los animales de granjas, provocando grandes pérdidas económicas. Por ejemplo, la enfermedad brucelosis provoca aborto tardío e infertilidad

en el ganado vacuno, búfalos, cabras y ovejas, el cual, en América Latina ha representado una pérdida de alrededor de 600 millones de dólares (**Dadar et al., 2021**).

Por tal razón, el uso excesivo y falta de control de los antibióticos en el sector ganadero favoreció la resistencia a los antimicrobianos (RAM), provocando patógenos resistentes a diversos fármacos, debido a las mutaciones que tiene las bacterias generando genes resistentes a los antibióticos, los cuales pueden ser heredados a diversas especies bacterianas (**Sano et al., 2020; Y. Zhang et al., 2022**).

### **1.2.3 Resistencia a los antimicrobianos (RAM)**

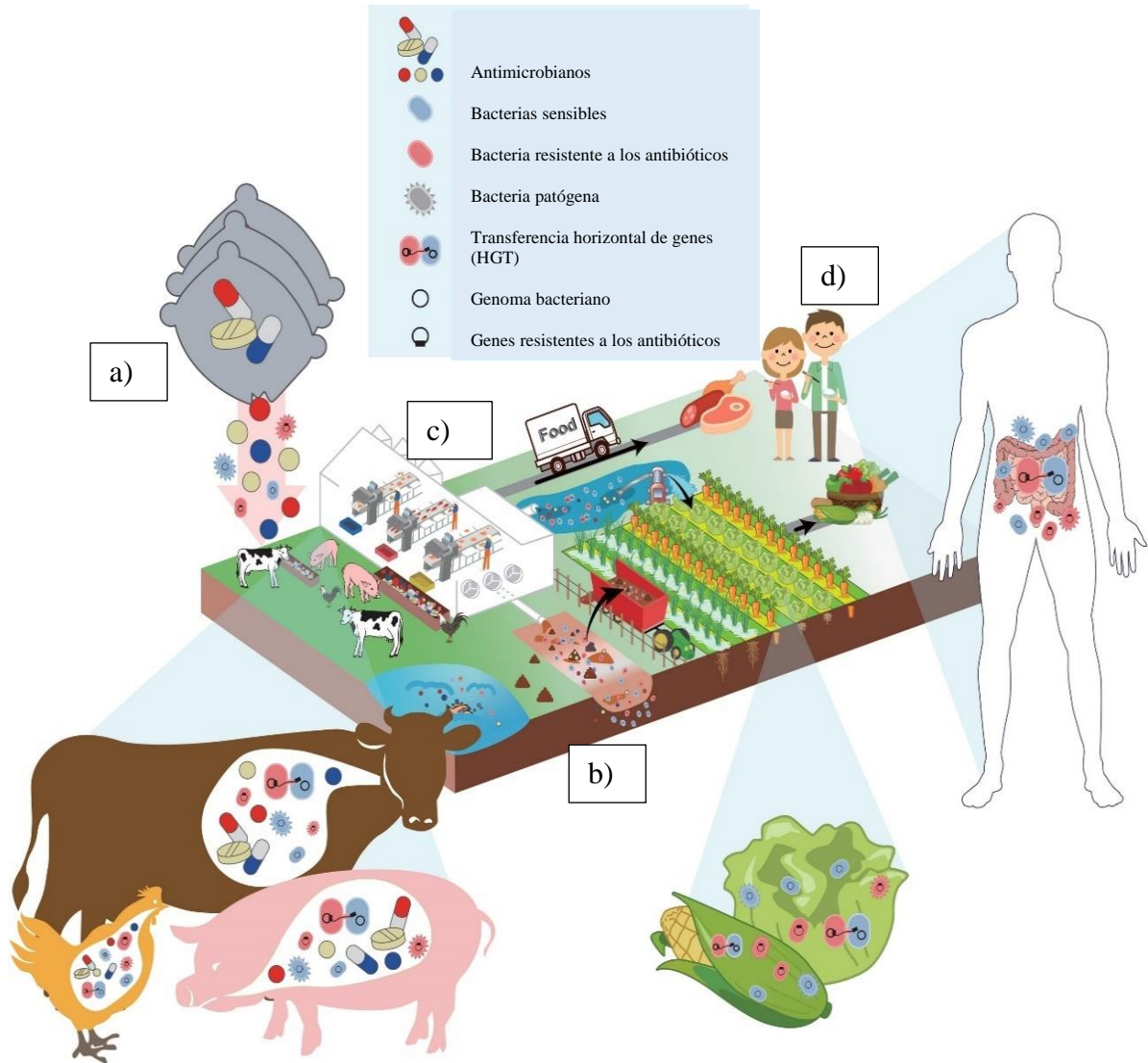
Las principales causas de resistencia de los antimicrobianos es el uso y la manipulación de los antibióticos en los tratamientos de enfermedades en humano y animales, de igual forma, el 70 % de la utilización de los antibióticos a nivel mundial está enfocado en la producción de alimentos y animales (**Hedman et al., 2020**), aumentando el riesgo de propagación de enfermedades, con una tasa de mortalidad que alcanzará los 10 millones/año para el 2050, por ejemplo, en Estado Unidos cada año supera los 2.8 millones de casos por infecciones resistentes a antibióticos, causando 35000 muertes anuales (**Kamboh & Carreira, 2023; Tang et al., 2023**).

En la figura 1 se visualiza el entorno de las granjas que es considerado un medio de transmisión de genes resistentes a los antibióticos, en donde, se pueden transferir a través del animal por el contacto con el humano o indirectamente a través de vías animal-ambiente-humanas, en consecuencia, a la utilización del estiércol de los animales como fertilizantes en cultivos y el consumo del forraje fertilizado con el estiércol contaminado, el 74% de la transmisión de la resistencia a los antimicrobianos es debido a la ingesta de animales contaminados, por lo contrario, el 18% es mediante el contacto directo de animal-humano (**Zhang et al., 2020**).

De igual forma, ocasionan contaminación al agua por las descargas residuales agrícolas (**Zhao et al., 2021**). La permanencia de los genes resistentes en el medio ambiente se debe a que, el ganado metaboliza parcialmente los antibióticos excretando mediante las heces una fracción del medicamento al medio ambiente, debido a que, los antibióticos se consideran sustancias farmacológicas activas (**World Health Organization, 2020**).

**Figura 1.**

*Vías de transmisión de los genes resistentes a los antibióticos*



a) Administración de antimicrobianos a los animales de granja, b) Utilización del estiércol como fertilizantes a los cultivos, c) Transporte de los cultivos contaminados, d) Ingesta de los cultivo y carnes contaminados provocando resistencia de antibióticos en los humanos. **Fuente: (Zhao et al., 2021).**

En el estudio de **Hedman et al., (2020)** ha demostrado que se puede tener perfiles de RAM similares entre los animales de granja, domésticos y humanos debido a la interacción que pueden tener las bacterias resistentes considerándose un riesgo a la salud por la zoonosis entre comunidades, contribuyendo a la persistencia, selección y difusión

de la RAM.

Por otra parte, es motivo de gran preocupación a nivel mundial el uso de antibióticos no regulados de los países de bajo y medio ingresos, porque son considerados los principales exportadores de carnes a nivel mundial, razón por la cual, facilita el transporte global de los antimicrobianos resistentes, un claro ejemplo, es el país Brasil el cual es uno de los mayores exportadores de pollo y carne **(Patel et al., 2020)**.

A pesar de que, las agencias gubernamentales están tratando de regularizar el uso de antibióticos, los ganaderos no están dispuestos a dejar de usarlos, ya que consideran que sería imposible mantener las demandas actuales del mercado sin el uso de antimicrobianos **(Gao et al., 2023)**. Por tal motivo, en los últimos años la búsqueda de nuevas alternativas de promotores de crecimiento y prevención de enfermedades es de gran interés, enfocándose en la aplicación de probióticos como una posibilidad para el mejoramiento de la rentabilidad del ganado, sin la utilización de antibióticos **(Ding et al., 2021)**.

#### **1.2.4 Probióticos como alternativa ante el uso de antibióticos**

##### **1.2.4.1 Probióticos**

Los probióticos son considerados microorganismos vivos que tiene efecto positivo sobre el huésped, mejorando la producción de enzimas digestivas permitiendo la descomposición de los carbohidratos, absorción y síntesis de nutrientes importantes como las vitaminas **(Cardelle-Cobas et al., 2022; Lambo et al., 2021)**. Asimismo, optimiza la respuesta inmune para aumentar la estancia de microorganismos favorables en el intestino promoviendo la función de la barrera e inhibiendo la adhesión de patógenos, toxinas en las paredes intestinales, mejorando inmunidad de la mucosa y estabilizando el pH intestinal, creando un ambiente desfavorable para las bacterias patógenas, evitando enfermedades por el aumento de la inmunocompetencia y el peso del ganado **(Humayun Kober et al., 2022; Lin et al., 2020)**.

Los microorganismos probióticos más utilizados pueden ser bacterias, hongos y levaduras, las cuales se caracterizan por ser Gram positivas con morfología de varilla, cocos, anaerobios facultativos y microaerofilicas. Las bacterias probióticas más estudiados son los géneros *Streptococo*, *Lactococo*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* **(Panesar & Anal, 2022)**. Por otra parte, un ejemplo de estudio de levadura es

*Saccharomyces cerevisiae* y de hongo se considera *Aspergillus oryzae* (Arsène et al., 2021).

Una aplicación de la cepa bacteriana *L. acidophilus* es el mejoramiento del sistema inmune provocando la proliferación de linfocitos T y B en gallinas **ponedoras** (Zampieri et al., 2023). También, los probióticos tiene efecto antagónico sobre los patógenos que se encuentra en los alimentos como *Staphylococcus aureu*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Leska et al., 2022).

#### **1.2.4.2 Mecanismo de acción de los probióticos**

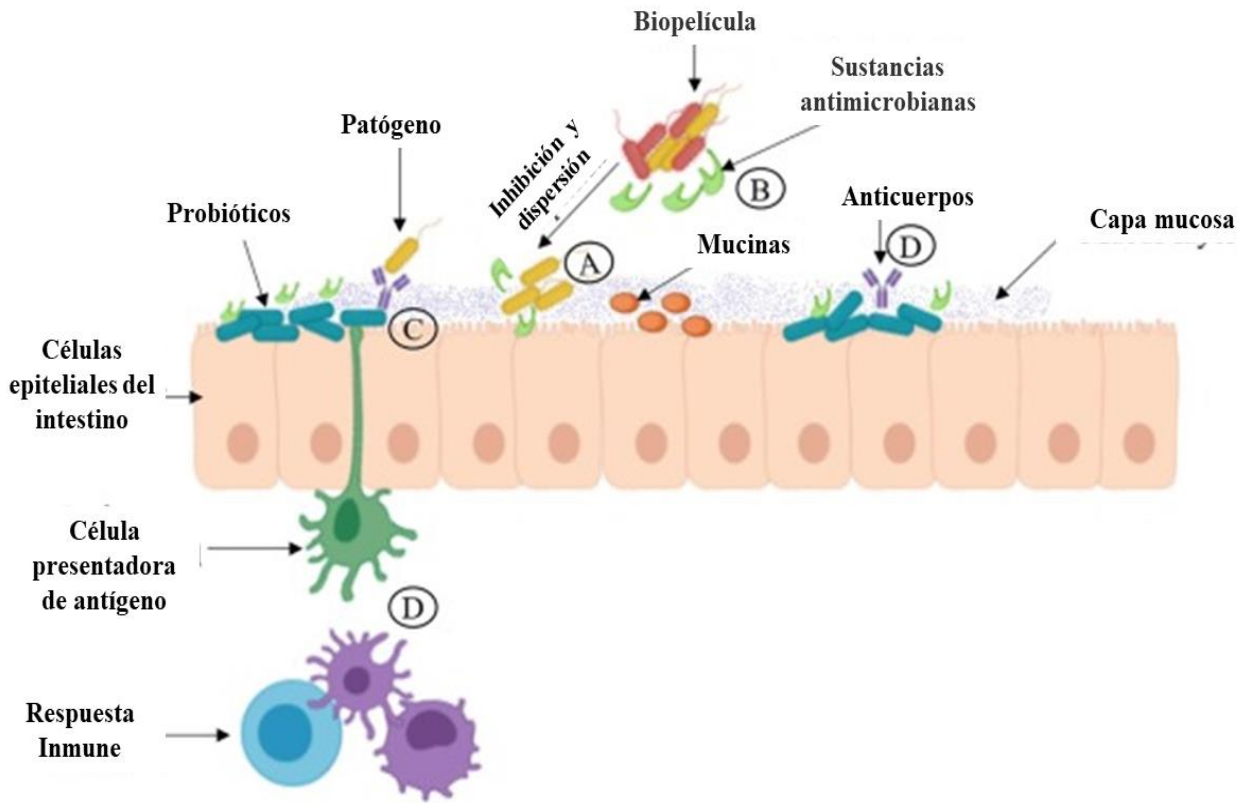
La figura 2 describe el mecanismo de acción que tiene las bacterias probióticas en el intestino, los probióticos se caracterizan por adherirse en las células epiteliales del intestino con el objetivo de competir con las bacterias patógenas por el mismo receptor produciendo un bloqueo para la colonización, también denominada exclusión competitiva, el cual se basa en la producción de biopelículas, la producción de receptores análogos, proteínas y la inducción de biosurfactantes (Cardelle-Cobas et al., 2023; Silva et al., 2020).

Los probióticos influye en el sistema inmune del huésped mediante la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos y formación de mucinas (Zucko et al., 2020). Asimismo, tienen la capacidad de producir ácido láctico por descomposición de carbohidratos, permitiendo la alimentación cruzada para otras bacterias (Meleh et al., 2020). Otra característica de los probióticos es el mejoramiento de la barrera epitelial intestinal promoviendo el empalme entre las células epiteliales, la regulación de la mucosa, el aumento de las enzimas digestivas como lisozima, amilasa, proteasa y lipasa (Pereira et al., 2022; Yaqoob et al., 2022).



**Figura 2.**

*Mecanismo de acción de los probióticos*



A) Competencia con bacterias patógenas, B) Producción de sustancias antimicrobianas, C) Mejoramiento de la barrera intestinal y mucosa, D) Estimulación del sistema inmune. **Fuente:** (Silva et al., 2020)

### 1.2.5 Fuentes de aislamiento de cepas probióticas

Los probióticos puede aislarse de fuentes convencionales que pueden ser del tracto gastrointestinal y leche materna, considerándose la principal fuente de probióticos comerciales, por ejemplo, la cepa *L. rhamnosus* GG fue aislada de las heces humanas, de igual forma, *L. reuteri* Protectis y *L. casei* del intestino (Ajibola et al., 2023).

Asimismo, se pueden aislar probióticos del suelo, plantas, diversos alimentos y productos fermentados, denominados fuentes no convencionales de aislamiento (Surve et al., 2022). En últimos años, los alimentos fermentados son considerado como una fuente rica

de probióticos, debido a que, comprenden aproximadamente un tercio de la dieta humana y se consumen popularmente en todo el mundo, por ejemplo, *L. plantarum* y *L. fermento* en diversas investigaciones se ha encontrado en alimentos fermentados (**Dahiya & Nigam, 2022**).

Por tal motivo, las cepas probióticas nativas se pueden aislar con éxito a partir de alimentos fermentados colocando una muestra adecuadamente diluida en un medio rico en nutrientes, debido al proceso de fermentación natural o espontánea por las comunidades microbianas propias que ya están presentes en las materias primas e incluso en el entorno (**Gaucher et al., 2019**).

### **1.2.6 Ventajas del aislamiento de cepas probióticas nativas**

El aislamiento de cepas probióticas nativas tiene gran ventaja que los probióticos comerciales, por la adaptación a un hospedador específico con mayores posibilidades de colonizar y sobrevivir al entorno (**Jobby et al., 2020**). La capacidad de colonizar el intestino es una de las características únicas que tiene las cepas nativas, cuanto mejor sea su eficiencia de colonización mayor será el efecto en la salud del huésped permitiendo la interacción con el sistema inmunológico e impidiendo la formación de biopelículas por ciertas bacterias patógenas (**Fredua-Agyeman et al., 2020; Mishra et al., 2022; Zampieri et al., 2023**). La administración de probióticos de múltiples cepas en el organismo puede proporcionar cualidades productivas significativas al mejorar sus acciones de manera simbiótica, aditiva y consistente en el huésped (**Binda et al., 2020**).

### **1.2.7 Parámetros para evaluar el potencial probiótico**

Para el uso de probióticos en animales como en humanos deben seguir las directrices de la FAO, la OMS y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (**Chen et al., 2020**). En donde, la selección de cepas probióticas, deben satisfacer criterios de seguridad no deben ser tóxicos o patógenos, susceptibles a los antibióticos, sin actividad hemolítica y tener actividad antagónica contra patógenos (**Ban et al., 2023**).

Los criterios de seguridad del aislamiento de cepas probióticas señalan que deben ser susceptibles a los antibióticos (**Wang et al., 2020**). Sin embargo, también pueden considerarse aptos para el consumo siendo resistentes a los antibióticos, sin la transmisión de los genes resistentes a otros microorganismos por medio de elementos móviles como plásmidos o transposones (**Lin et al., 2020**). La actividad hemolítica es otro criterio de

seguridad que permite determinar que las cepas probióticas aisladas no generen toxinas como las hemolisinas que provoquen la lisis de los eritrocitos y conocer el factor de virulencia que posee las bacterias (**Panesar & Anal, 2022**). Por último, la actividad antagonica permite el crecimiento y competencia contra bacterias patógenas del intestino y la producción de antimicrobianos (**Chen et al., 2020**).

Mientras que, los aspectos funcionales de evaluación para el potencial probiótico están basado en las condiciones del entorno del intestino que incluyen la supervivencia en el tracto gastrointestinal como la tolerancia a las sales biliares, pH bajos, temperatura corporal e hidrofobicidad de la superficie celular (**Sarkar et al., 2020**). La adaptabilidad de la temperatura es una de las características principales para la selección de cepas probióticas para mantenerse viables en el hospedador (**Cano- Lozano et al., 2022**).

De igual manera, los probióticos requieren una alta supervivencia a condiciones desfavorables, debido a que, están directamente interactuando con las condiciones del tracto gastrointestinal del huésped, en donde, exige tolerancia de las sales biliares a concentraciones entre 0.3% a 0.5% y resistencia a un ambiente ácido que oscila de 2 a 3 pH (**Gaucher et al., 2019; Pimentel et al., 2021**). Por otra parte, la adhesión a la superficie intestinal, es decir, a las células epiteliales intestinales promueve la interacción entre los probióticos permitiendo la colonización de las bacterias, el cual puede ser por interacciones inespecíficas de atracción o repulsión, asimismo, por interacciones específicas mediante proteínas de la pared celular de las bacterias y receptores definidos del hospedador (**Fontana et al., 2019**).

## **1.2.8 Hipótesis y variables**

### **1.2.8.1 Hipótesis alternativa**

Las hipótesis plateadas serán nulas y alternativas, en donde, la hipótesis alternativa corresponde a la presencia de bacterias ácido-lácticas en el fermento de yuca, caña de azúcar y en las muestras de heces bovinas.

### **1.2.8.2 Hipótesis alternativa**

la hipótesis nula menciona que no hay presencia de bacterias ácido-lácticas en el fermento de yuca, caña de azúcar y en las muestras de heces bovinas.

### **1.2.8.3 Variable independiente**

Las variables independientes son las pruebas *in vitro* que realizará para conocer el potencial probiótico de los aislamientos como la tolerancia a condiciones ácidas (pH), sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular, hemólisis, actividad antagónica y prueba de susceptibilidad de antibióticos.

### **1.2.8.4 Variable dependiente**

En contraste, las variables dependientes son los géneros que se obtendrá de las bacterias ácido-lácticas.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Obtener cepas probióticas a partir de diferentes sustratos de origen orgánico de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Aislar cepas probióticas a partir del fermento de yuca, caña de azúcar y heces de bovinos.
2. Realizar cribado por medio de pruebas *in vitro* para predecir el potencial probiótico de las cepas aisladas.
3. Identificar mediante pruebas bioquímicas las cepas aisladas.

## CAPITULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales

Para llevar a cabo el desarrollo del trabajo de titulación, se utilizó materiales de laboratorio, equipos y reactivos detallados en las tablas del 1 al 3.

**Tabla 1.**

*Materiales de laboratorio*

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>
Tubos de ensayo	200
Pipetas de vidrio	3
Vaso Erlenmeyer (500 mL)	3
Peras de succión	3
Micropipeta 20 – 100 uL	1
Micropipeta 100 – 1000 uL	1
Puntas azules 100 – 1000 uL	50
Puntas amarillas 20 – 100 uL	50
Caja de puntas azules	2
Caja de puntas amarillas	2
Cajas Petri de plástico	750
Microtubos (2 mL)	270
Porta objetos	20
Cubre objetos	20

---

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>
Hisopos estériles	50
Jarras de anaerobiosis	1
Palillos estériles	100
Asa de siembra	2
Asa de siembra en forma de L	10
Cooler	1
Frascos de medio 500 mL	3
Frascos de medio 100 mL	3
Discos de celulosa	20
Lápiz cera	1
Rapidógrafo	1
Caja de criopreservación	2
Tubos de McFarland	1
Hisopo con medio de transporte	10

---

**Tabla 2.***Equipos de laboratorio*

<b>Equipo</b>	<b>Cantidad</b>
Incubadora	1
Autoclave (Hiramaya)	1
Carama de flujo (Labconco)	1
Ultracongelador (Binder)	1
Vortex (Fisher Scientific)	1
Refrigerador (GE)	1
Mechero Bunsen	1
Estufa	1
pH-metro (Accumet)	1
Microscopio	1

**Tabla 3.***Reactivos*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido clorhídrico (5 M)	15 mL
Rojo Congo	0.10 g
Cristal violeta	100 mL
Lugol	100 mL
Alcohol-acetona	100 mL

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Safranina	100 mL
Peróxido de hidrogeno (3%)	100 mL
Glicerol	200 mL
Solución Salina	3 L
Agar MRS (BD)	500 g
Caldo MRS (BD)	500 g
Agar Muller Hinton	200 g
Agar PCA	15 g
Bilidren	50 g
Agar agar	12 g
Alcohol de 96°	1 L
Baterías bioquímicas API 50 (Biomerieux)	10
Discos de bacitracina	25
Discos de ciprofloxacino	25
Discos de cloranfenicol	25
Discos de eritromicina	25
Discos de gentamicina	25
Discos de vancomicina	25
Discos de cotrimoxazol	25
Solución salina	500 mL



<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Melaza	500 g

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Aislamiento de los microorganismos probióticos de muestras de heces bovinas, fermento de yuca y caña.**

#### **2.2.1.1 Fermentación de las muestras vegetales**

La recolección de las muestras vegetales se llevó a cabo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en la vía Quevedo, kilómetro 23 recinto Luz de América. Se recolectó la yuca y se procedió a limpiar la muestra retirando la cascará, posteriormente se pesó 800 gramos del material vegetal fresco como sustrato y se mezcló en 500 mL de agua destilada con 60 gramos de melaza. Finalmente, se fermentó durante un período de 7 días. De igual forma, la muestra de caña de azúcar se recolectó consecutivamente se limpió el material vegetal, se obtuvo el jugo y se fermentó por 7 días (C. Liu et al., 2022).

#### **2.2.1.2 Recolección de muestra de heces.**

La toma de muestra de heces bovinos se realizó en la Asociación de Ganaderos de Santo Domingo (ASOGAN-SD) que se encuentra ubicados en el km 7 vía Quininde, se empleó el método descrito por Lin et al., (2020), el cual consiste, en recolección de las heces bovinas con guantes y un hisopo estéril en un medio de transporte sin la interacción con el animal, por cual, no requiere ningún permiso de la institución de Agrocalidad. Seguidamente se trasladó la muestra al laboratorio de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (UODIDE – FCIAB) por medio de un cooler en refrigeración a 5 °C en un lapso de 12 horas.

#### **2.2.1.3 Diluciones seriadas, siembra e incubación.**

Los microorganismos probióticos fueron aislados de las muestras utilizando el método detallado por Jitpakdee et al., (2021) para ello se realizó diluciones seriadas de cada muestra, homogenizando la muestra madre mediante un vortex (Fisher Scientific) durante un minuto, tomando un 1 mL de la muestra y se diluyó en 9 mL de agua estéril en tubos de ensayos, repitiendo este procedimiento hasta formar la dilución  $\times 10^{-8}$ , se procedió a la

inoculación de las diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) para las muestras vegetales en agar MRS de la marca Becton Dickinson adquirido por la empresa DIPCO Cia Ltda y se incubó a 37 °C por 48 horas. Por lo contrario, para las muestras de heces se inoculó e incubó hasta la dilución  $\times 10^{-5}$ . Posteriormente, se tomó de ambas muestras vegetales y heces bovinas 100  $\mu$ l de cada dilución y mediante un asa de siembra tipo L, se esparció la muestra sobre la superficie del medio. Cada muestra se recreó por duplicado y se incubó en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas a 37 °C.

#### **2.2.1.4 Selección de cepas probióticas y purificación**

La selección de las colonias probióticas se evaluó mediante parámetros cualitativos como bacterias grampositivas, catalasa negativa, morfologías redondas, lechosas en forma de bacilo y cocos. Se colocó las cepas en un portaobjeto con ayuda de un palillo estéril, rápidamente, se realizó la prueba de catalasa, el cual, consistió en colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en el portaobjetos, las reacciones positivas se evidenciaron por efervescencia inmediata, posteriormente, las cepas con catalasa negativa se realizó tinción de Gram, los resultados se visualizaron mediante un microscopio (**Santos Leandro et al., 2021**). Se seleccionó 10 colonias de cada muestra, siguiendo los parámetros establecidos, para llevar a cabo la purificación de los aislamientos en agar MRS mediante el método de siembra en estría y se incubó 37 °C a 24 horas en condiciones anaeróbicas (**Somashekaraiah et al., 2021**).

#### **2.2.1.5 Generación de biomasa y criopreservación.**

El almacenamiento de las cepas probióticas se llevó a cabo mediante la generación de biomasa a partir de los cultivos purificados. En este proceso, se dispensó 5 mL de caldo MRS (Becton Dickinson) en tubos de ensayo estériles, a los cuales se agregó cinco colonias puras. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas en condiciones anaeróbicas. Para la conservación a largo plazo, los aislamientos se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador de la marca BINDER, utilizando caldo MRS que contenía 30 % de glicerol y 70 % de biomasa en microtubos de 2 mL, logrando así la formación de un banco de cepas. Cada cepa aislada se conservó por triplicado (**Mohammed & Con., 2021**).

## **2.2.2 Pruebas *in vitro* para predecir el potencial probiótico de las cepas aisladas**

### **2.2.2.1 Hidrofobicidad de la superficie celular**

Se examinó la hidrofobicidad de la superficie celular de los aislados mediante el método descrito por **Adugna & Anduaem, (2023)**. Las colonias criopreservadas se extendió en placas de agar MRS que contenían 0,03 % (p/v) de Rojo Congo y se incubó en condiciones anaeróbicas durante 24 - 48 horas a 37 °C. La interpretación de los resultados se reconoció las colonias blancas o translúcidas como cepas no hidrófobas, mientras que las cepas rojas como hidrófobas, considerándose el resultado esperado.

### **2.2.2.2 Prueba de hemólisis**

Se evaluó la actividad hemolítica de las cepas aisladas hidrófobas, debido a que, los probióticos no deben provocar lisis de los glóbulos rojos, siguiendo el protocolo descrito por **Bazireh et al., (2020)**. Las cepas aisladas se inocularon en agar base con 2% de sangre humana, posteriormente se incubó a 37 °C durante 48 horas. Los resultados se clasificaron mediante la presencia de  $\beta$ -hemólisis (zona clara alrededor de las colonias),  $\alpha$ -hemólisis (zona verde alrededor de las colonias) o  $\gamma$ -hemólisis (sin halo alrededor de las colonias), en donde, el resultado esperado fue la formación de hemólisis gama.

### **2.2.2.3 Tolerancia a condiciones ácidas (pH ácido)**

Se estimó la capacidad de supervivencia de los aislamientos a pH bajos (2-3) debido a las condiciones que posee el tracto gastrointestinal, siguiendo el protocolo descrito por **Ahire et al., (2021)**, se reactivó las cepas hidrófobas y con hemólisis gama en agar MRS en condiciones anaeróbicas a 37 °C por 24 horas, posteriormente, se colocó las colonias en 5 mL de caldo MRS modificado a pH 2 y 3 comparando la turbidez con un tubo de 0.5 McFarland verificando que contenga  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Consecutivamente, se incubó por 37 °C durante 24 horas, se realizó por duplicado el experimento.

Finalmente, se elaboró diluciones seriadas hasta la dilución  $\times 10^{-4}$  de cada replica en solución salina de los caldos acidificados y se inoculó en el medio agar MRS una alícuota de 20  $\mu$ L de las diluciones dejando secar la gota e incubando a 37 °C durante 24 - 48 horas en condiciones anaeróbicas. Se calculó el porcentaje de supervivencia utilizando la ecuación 1, el cual describe que se dividió el número de colonias enumeradas en el agar MRS tras la modificación ácida ( $N_1$ ) por la concentración inicial de bacterias en el momento cero ( $N_0$ ), multiplicando el resultado por 100.

$$\text{Porcentaje de supervivencia pH (\%)} = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

#### 2.2.2.4 Tolerancia a las sales biliares

Se valoró la capacidad de supervivencia de los aislamientos en la presencia de sales biliares a un porcentaje de 0.3 y 0.5 %, debido al rango fisiológico normal que se encuentra en el tracto gastrointestinal, siguiendo el protocolo descrito por **Lu et al., (2023)**. Las cepas con elevada tolerancia ácida fueron cultivadas en agar MRS a 37 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas. A continuación, se colocó las colonias en 5 mL de caldo MRS modificado con 0.3% y 0.5% (p/v) de sales biliares (Bilidren), comparando la turbidez con un tubo de 0.5 McFarland verificando que contenga  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, se estableció un control sin sales biliares, consecutivamente, se incubó por 37 °C durante 24 horas, se realizó por duplicado el experimento.

Se calculó la tolerancia de las cepas aisladas a las sales biliares mediante diluciones seriadas, se inoculó en medio agar MRS hasta la dilución  $\times 10^{-6}$  con una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de las diluciones y se incubó por un período de 24 a 48 horas a una temperatura de 37 °C en condiciones anaeróbicas. Para calcular el porcentaje de supervivencia a las sales biliares se utilizó la ecuación 2, el cual describe que se dividió el número de colonias enumeradas en el agar MRS tras la modificación con sales biliares ( $N_1$ ) por la concentración inicial de bacterias en el momento cero ( $N_0$ ), multiplicando el resultado por 100 (**Lu et al., 2023**).

$$\text{Porcentaje de supervivencia sales biliares (\%)} = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

#### 2.2.2.5 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.

La resistencia de antibióticos se aplicó el método descrito por **López-Malo et al., (2020)**. Se examinó siete antibióticos para determinar la susceptibilidad de las cepas aisladas los cuales se muestra en la tabla 4. Se cultivó las cepas aisladas en agar MRS en condiciones anaeróbicas durante 24 horas, consecutivamente, se realizó una comparación de 0.5 McFarland en solución salina estéril, se frotó el inóculo de las cepas aisladas con un hisopo estéril en el agar MRS y se dejó secar entre 3 a 5 minutos. Se colocó los discos de antibiótico con una pinza estéril sobre el agar. Finalmente, se

incubó las placas en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 24 a 48 horas. La zona de inhibición se midió con calibradores (mm) y se clasificó como susceptible, intermedia o resistente.

**Tabla 4.**

Antibióticos

<b>Antibióticos</b>	<b>Concentración</b>	<b>Abreviatura</b>
Bacitracina	10 µg/disco	B
Ciprofloxacino	5 µg/disco	CIP
Cloranfenicol	30 µg/disco	C
Eritromicina	15 µg/disco	E
Gentamicina	10 µg/disco	CN
Cotrimoxazol	23,75 µg/disco	SXT
Vancomicina	30 µg/disco	VA

#### **2.2.2.6 Actividad antagónica**

La actividad antagónica de las cepas probióticas se evaluó con cepas de *Escherichia coli* ATCC® 11775 basado por el método descrito por **Sakandar et al., (2019)**, el cual consiste en la incubación de las cepas aisladas en agar MRS a 37 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas, posteriormente, se ajustó las cepas aisladas a 0.5 McFarland.

La cepa de *E. coli* se incubó en agar PCA a 37 °C durante 24 horas, seguidamente se ajustó a 0.5 McFarland. El inoculo con la cepa patógena se esparció con un hisopo estéril en el

medio de agar Muller Hinton, por lo contrario, se colocó 20 uL del inóculo de las cepas aisladas en discos de papel celulosa de 6 mm de diámetro previamente esterilizados por luz UV por 15 minutos. Se situó los discos con la cepa aislada con ayuda de pinzas estériles en el medio de agar Muller Hinton y se incubó durante 24 a 48 horas a una temperatura de 37 °C. Por último, se interpretó como inhibición positiva una zona clara de al menos un milímetro.

### **2.2.3 Identificación de las cepas aisladas**

#### **2.2.3.1 Preparación del inóculo**

Se preparó caldo MRS que contenga el indicador púrpura de bromocresol, posteriormente, se dispensó 12 mL del caldo en tubos estériles para la realización de la 2 McFarland con las colonias puras de las mejores cepas aisladas. **(Abudoleh et al., 2021).**

#### **2.2.3.2 Baterías API**

La identificación del género de probióticos de las cepas aisladas se utilizó baterías bioquímicas API 50 CH de la marca Biomerieux adquirido por la empresa SIMED S.A. Se empleó los kits API 50 CH y siguió las instrucciones del fabricante para analizar la producción de ácido a partir de carbohidratos y compuestos relacionados de las bacterias aisladas. Los resultados se registraron después de la incubación a 37 °C durante 24 a 48 horas, se analizó los resultados utilizando el software de identificación apiweb con base de datos **(Abudoleh et al., 2021).**

## CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1 Aislamiento de probióticos

Para el aislamiento de las cepas se preseleccionaron mediante características fenotípicas y morfológicas asociadas a los probióticos, que son bacterias grampositivas y catalasa negativa con morfología cocos o varillas, de colinas cremosas y blancas (**Kassa et al., 2024a; Y. Wang et al., 2021**). Se obtuvo un total de 63 cepas aisladas, en donde, 28 cepas corresponden a la muestra del fermento de yuca, 30 al fermento de caña de azúcar y 5 a las heces bovina. Las 63 cepas son grampositivas y catalasa negativa, sin embargo, 7 cepas (11,1 %) tenían forma de cocos y 56 cepas (88,8 %) poseen forma de bacilo, el cual se puede visualizar en la tabla 5.

Diversas investigaciones afirman que se ha logrado el aislamiento de probióticos en diversos ambientes como en frutas, vegetales, desechos industriales, suelo, heces animales o humanos, alimentos y bebidas fermentadas representando una alternativa para el desarrollo de nuevos productos a base de probióticos para el beneficio de animales y humanos (**Al-Yami et al., 2022; James & Wang, 2019; Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021**).

La evaluación del potencial probiótico de las cepas aisladas tiene como objetivo obtener cepas con mayor eficiencia y beneficios, de tal manera, se realiza pruebas *in vitro* como la capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino, actividad hemolítica, susceptibilidad a los antibióticos, actividad antagónica contra bacterias patógenas, tolerancia a las sales biliares y pH ácidos (**Madjirebaye et al., 2022**).

**Tabla 5.**

*Banco de cepas con características morfológicas y fenotípicas*

Banco de cepas	Morfología	Catalasa	Tincion de Gram	Banco de cepas	Morfología	Catalasa	Tincion de Gram
Y1R2(5)-1	Bacilos	-	+	C1R2(4)-5	Bacilos	-	+
Y1R1(5)-2	Bacilos	-	+	C1R2(4)-6	Bacilos	-	+
Y1R1(5)-3	Bacilos	-	+	C1R2(4)-7	Bacilos	-	+
Y1R1(5)-4	Bacilos	-	+	C2R2(6)-8	Bacilos	-	+

<b>Banco de cepas</b>	<b>Morfología</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Tincion de Gram</b>	<b>Banco de cepas</b>	<b>Morfología</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Tincion de Gram</b>
<b>Y1R1(5)-5</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(6)-9</b>	Bacilos	-	+
<b>Y1R1(5)-6</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(6)-10</b>	Bacilos	-	+
<b>Y1R1(5)-7</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(6)-11</b>	Bacilos	-	+
<b>Y1R1(5)-8</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R1(6)-13</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R1(6)-10</b>	Cocos	-	+	<b>C2R2(6)-14</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R1(7)-11</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(6)-16</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R1(7)-12</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R1(6)-17</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R1(7)-13</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R1(6)-18</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R1(7)-14</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(7)-19</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(7)-15</b>	Bacilos	-	+	<b>C2R2(7)-20</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(7)-16</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R2(7)-21</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(7)-18</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R1(4)-24</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(7)-19</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R1(4)-22</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(8)-20</b>	Cocos	-	+	<b>C3R2(4)-23</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(8)-21</b>	Cocos	-	+	<b>C3R2(5)-25</b>	Bacilos	-	+
<b>Y2R2(6)-29</b>	Cocos	-	+	<b>C3R2(4)-26</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-30</b>	Cocos	-	+	<b>C3R1(4)-27</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R1(6)-31</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R2(6)-28</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-32</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R1(4)-29</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-33</b>	Cocos	-	+	<b>C3R2(5)-30</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-34</b>	Cocos	-	+	<b>C3R1(5)-32</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-35</b>	Bacilos	-	+	<b>C3R1(6)-33</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R1(6)-36</b>	Bacilos	-	+	<b>VH1(1)-1</b>	Bacilos	-	+
<b>Y3R2(6)-37</b>	Bacilos	-	+	<b>VH1(1)-2</b>	Bacilos	-	+
<b>C1R2(4)-1</b>	Bacilos	-	+	<b>VH1(1)-3</b>	Bacilos	-	+
<b>C1R2(4)-2</b>	Bacilos	-	+	<b>VH1(1)-4</b>	Bacilos	-	+
<b>C1R2(4)-3</b>	Bacilos	-	+	<b>VH1(1)-5</b>	Bacilos	-	+
<b>C1R2(4)-4</b>	Bacilos	-	+				

*Nota.* La nomenclatura de las cepas aisladas se determina mediante la inicial del nombre de cada muestra seguida de la numeración de muestreo (Y1). Además, se incluye la información sobre la réplica y la dilución (R1(6)), el número de la cepa (1), el signo (+)



indica que la prueba realizada es positiva, por lo contrario, (-) indica negativo.

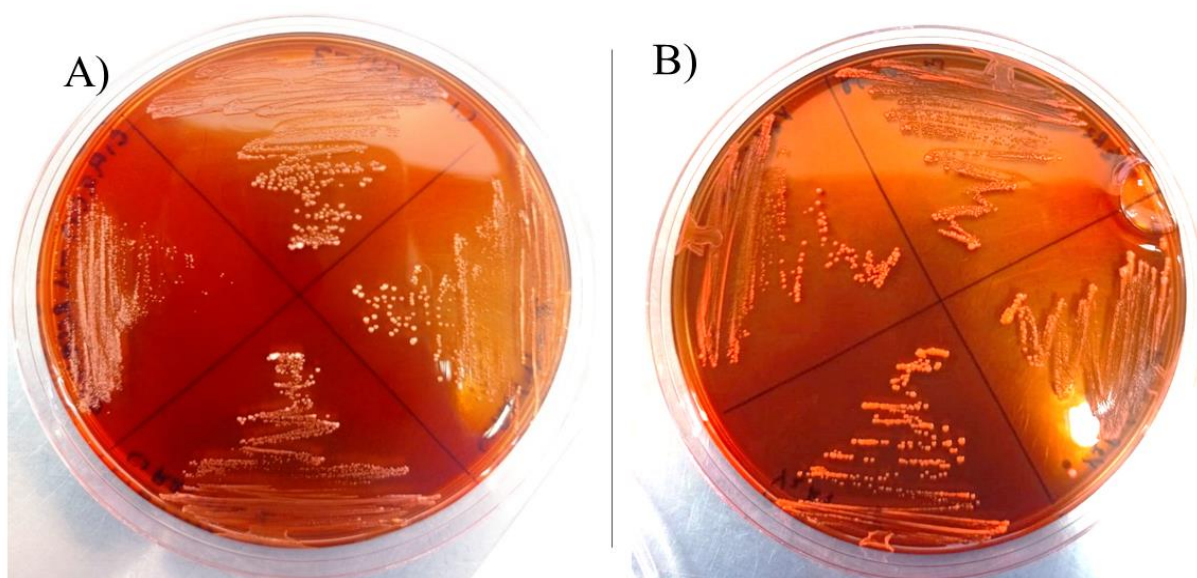
### 3.1.2 Evaluación del potencial probiótico de las cepas aisladas

#### 3.1.2.1 Hidrofobicidad de la superficie celular

Se evaluó la capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino de las cepas aisladas por medio de una prueba cualitativa de hidrofobicidad empleando como indicador el colorante rojo Congo. En esta prueba, se consideraron como positivas a la hidrofobicidad aquellas colonias que experimentaron un cambio de coloración a rojo, como se ilustra en la Figura 3.

**Figura 3.**

*Prueba de rojo Congo*



A) Resultado negativo siendo colonias de color blancas o transparentes, B) Resultado positivo debido a la presencia del color rojo en las colonias.

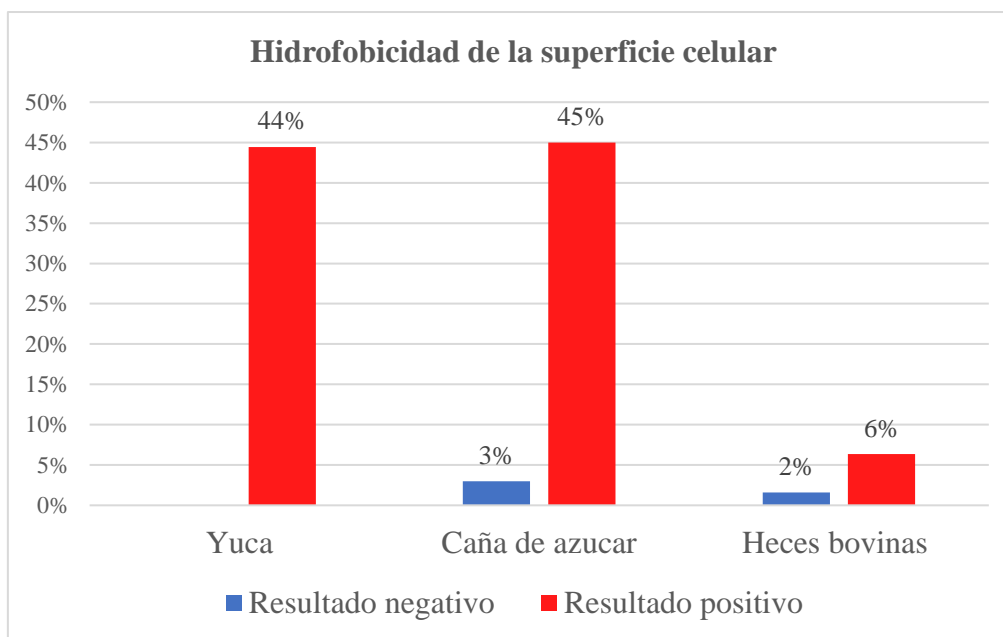
La Figura 4 muestra que el 44 % de las muestras de yuca, el 45 % de la caña de azúcar y el 6 % de las heces bovinas presentaron una coloración roja, indicando que el 95 % de las cepas aisladas de las muestras exhiben capacidad de adhesión celular de manera inespecífica. En contraste, el 5% restante, equivale a una cepa de la muestra de heces bovinas y dos cepas pertenecientes a las muestras de caña de azúcar, las cuales mostraron una coloración transparente, indicando la ausencia de capacidad de adhesión. En comparación con la investigación de **Adugna & Andualem, (2023)** todas las cepas aisladas del fermentado de Metata Ayib exhibieron resultados positivos al tinte rojo

Congo. El colorante rojo Congo permite la identificación de bacterias que tiene como característica la presencia de fimbrias y la producción de celulosa. Estas características posibilitan la adhesión a las células, por tal motivo, el colorante es absorbido por dichas proteínas provocando el cambio de color (**Bonatsou et al., 2018; Menezes et al., 2020**).

De igual forma, las bacterias que tienen la presencia de las fimbrias, sacáridos, ácido lipoteicoico y proteínas en la membrana externa de las bacterias contribuyen a la efectividad de adhesión a las células epiteliales intestinales y la producción de biopelículas (**Flores-Miranda et al., 2012**). La adhesión celular es una característica principal para la selección de probióticos, debido a que, permite la colonización de las bacterias en el intestino y la competencia contra bacterias patógenas por el mismo receptor para adherirse a las células epiteliales intestinales (**Rashad & Abdul, 2023**).

**Figura 4.**

*Porcentaje de las cepas aisladas con capacidad de hidrofobicidad*



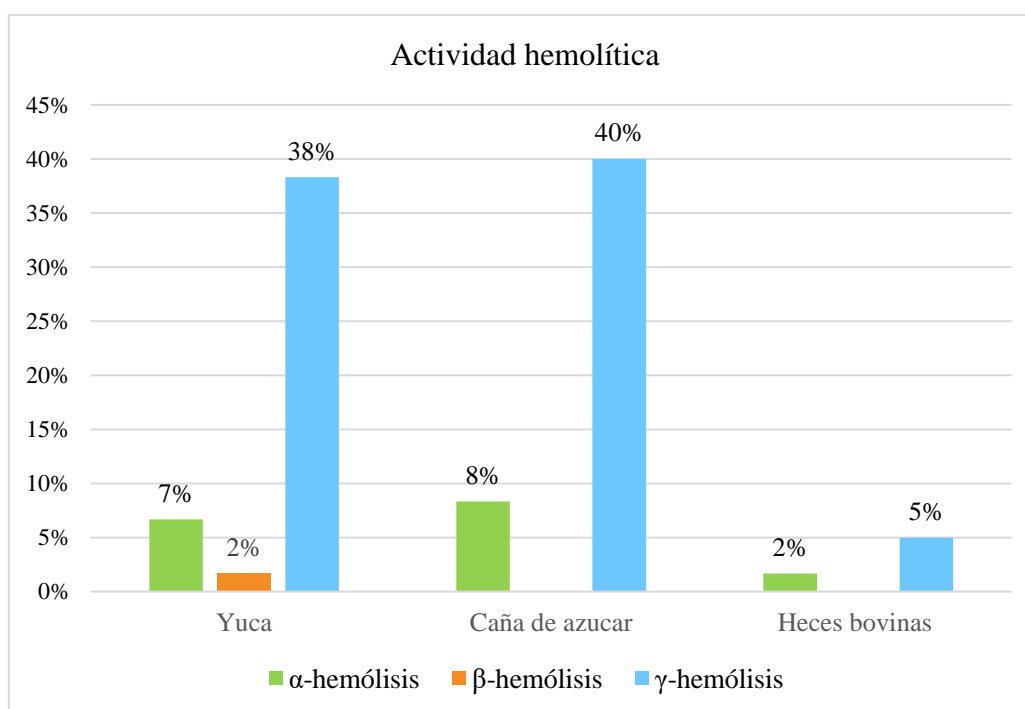
### 3.1.2.2 Actividad Hemolítica

Se seleccionó las 60 cepas con capacidad de adhesión celular para la prueba de hemólisis. En la Figura 5, se evidencia que el 38 % de las muestras de yuca, el 40 % de las muestras de caña de azúcar y el 5 % de las muestras de heces bovinas no presentaron actividad

hemolítica, careciendo de halo alrededor de las colonias. Sin embargo, ciertas cepas de las tres muestras mostraron  $\alpha$ -hemólisis, manifestada por la presencia de un halo de color verde alrededor de las colonias, y solo una cepa de la muestra de la yuca tiene actividad  $\beta$ -hemolítica. Por lo tanto, las 50 cepas sin actividad hemolítica se consideran bacterias seguras o GRAS (Generally Recognized as Safe) para la administración animal o humana, como lo propone la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (Andrade et al., 2019). En la investigación llevada a cabo por Reuben et al., (2019), se identificaron tres cepas con actividad de  $\beta$ -hemólisis entre los 18 aislamientos obtenidos del intestino de pollos.

**Figura 5.**

*Porcentaje de la actividad hemolítica de las muestras de yuca, caña de azúcar y heces bovinas*



La actividad hemolítica es un parámetro de seguridad para la selección de probióticos debido a que se relaciona con la virulencia de las bacterias patógenas (Kassa et al., 2024). La presencia de actividad hemolítica en las bacterias ácido-lácticas tiene efectos negativos debido a la destrucción de los glóbulos rojos por la presencia de hemolisinas, igualmente, poseen la capacidad de modificar y debilitar el revestimiento de la mucosa intestinal, actuando como características indeseables para la selección de probióticos

(Mangia et al., 2019; Yasmin et al., 2020).

### 3.1.2.3 Tolerancia a condiciones ácidas (pH ácido)

Una de las principales características que deben cumplir las cepas probióticas es la capacidad de tolerancia a condiciones ácidas, debido a que, deben sobrevivir a los entornos del tracto gastrointestinal, especialmente la subsistencia en el estómago con valores de pH de 2 a 3 (Sionek et al., 2023).

Se evaluó el porcentaje de supervivencia a pH 3 de los 50 aislamientos sin actividad hemolítica de las tres muestras, en donde, se observó que doce cepas de la muestra de yuca, once cepas de la caña de azúcar y tres cepas de las heces bovinas lograron sobrevivir al pH 3 después de 24 horas de incubación, con rangos de supervivencia que oscilaron entre el 49 % y el 90 %. No obstante, once cepas de la muestra de yuca y trece cepas de la caña de azúcar, no se registró crecimiento bacteriano, como se detalla en la Tabla 6.

**Tabla 6.**

*Tolerancia a condiciones de 3 pH.*

Banco de cepas	3 pH		Banco de cepas	3 pH	
	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia		Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia
Y1R2(8)-1	0	0	C1R2(4)-3	0	0
Y1R1(8)-2	0	0	C1R2(4)-4	0	0
Y1R1(5)-3	0	0	C1R2(4)-5	0	0
Y1R1(5)-4	0	0	C1R2(4)-6	$1,25 \times 10^4 \pm 0,70$	50%
Y1R1(5)-5	$6,25 \times 10^6 \pm 0,70$	83%	C1R2(4)-7	$3 \times 10^4 \pm 0,70$	55%
Y1R1(5)-6	0	0	C2R2(6)-8	0	0
Y1R1(5)-7	0	0	C2R2(6)-9	0	0
Y1R1(5)-8	0	0	C2R2(6)-10	$1 \times 10^4 \pm 1,41$	49%
Y2R1(6)-10	$5,25 \times 10^6 \pm 2,12$	82%	C2R2(6)-11	$1,75 \times 10^4 \pm 0,70$	52%
Y2R1(7)-11	$6,75 \times 10^6 \pm 2,12$	84%	C2R1(6)-13	0	0
Y2R1(7)-12	0	0	C2R2(6)-14	0	0
Y2R1(7)-13	$6,75 \times 10^6 \pm 2,12$	84%	C2R2(6)-16	0	0
Y2R2(7)-15	$1,03 \times 10^7 \pm 2,12$	86%	C1R1(6)-17	$3,75 \times 10^4 \pm 0,70$	56%
Y2R2(7)-16	$9,50 \times 10^6 \pm 1,41$	85%	C2R1(6)-18	$4,75 \times 10^6 \pm 0,70$	82%

Banco de cepas	3 pH		Banco de cepas	3 pH	
	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia		Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia
<b>Y2R2(7)-18</b>	$9,25 \times 10^7 \pm 0,70$	85%	<b>C2R2(7)-20</b>	$4,75 \times 10^6 \pm 0,70$	82%
<b>Y2R2(7)-19</b>	$4,50 \times 10^6 \pm 1,41$	81%	<b>C3R2(6)-21</b>	$5,75 \times 10^6 \pm 0,70$	83%
<b>Y2R2(8)-20</b>	0	0	<b>C3R2(4)-23</b>	0	0
<b>Y2R2(8)-21</b>	0	0	<b>C3R2(4)-26</b>	$6 \times 10^4 \pm 1,41$	58%
<b>Y2R2(6)-29</b>	$8,75 \times 10^6 \pm 0,70$	85%	<b>C3R1(4)-27</b>	0	0
<b>Y2R2(8)-37</b>	0	0	<b>C3R2(6)-28</b>	0	0
<b>Y3R2(6)-33</b>	$7,50 \times 10^6 \pm 1,41$	84%	<b>C3R1(5)-32</b>	0	0
<b>Y3R1(7)-36</b>	$2,75 \times 10^6 \pm 0,70$	79%	<b>VH1(1)-1</b>	$5 \times 10^5 \pm 0$	70%
<b>C1R2(4)-1</b>	$2,40 \times 10^7 \pm 1,41$	90%	<b>VH1(1)-2</b>	$5 \times 10^5 \pm 0$	70%
<b>C1R2(4)-2</b>	$1 \times 10^6 \pm 1,41$	73%	<b>VH1(1)-4</b>	$5 \times 10^5 \pm 0$	70%

*Nota.* Los valores son medias de experimentos duplicados;  $\pm$  indica la desviación estándar de la media

Adicionalmente, las cepas fueron sometidas a condiciones más exigentes, evaluando la tolerancia a un pH de 2. Como resultado, únicamente dos cepas correspondientes a la muestra de yuca lograron sobrevivir bajo estas condiciones, con rangos de supervivencia del 33% para la cepa Y2R2(7)-19 y del 38% para la cepa Y2R2(6)-29, como se detalla en la Tabla 7. Similar al estudio realizado por **Samedi & Charles, (2019)** donde se aislaron 47 cepas probióticas de yuca y caña de azúcar, obteniendo 6 cepas resistentes a un pH de 3 con rangos de supervivencia que oscilan entre 70 y 80%, las cuales fueron incubadas durante 3 horas y tolerancia al pH de 2 con porcentajes de 30 a 40%.

De igual forma, en la investigación de **Zhang et al., (2020)** los 18 aislamientos variaban el porcentaje de supervivencia en la tolerancia al pH 3, siendo el mayor porcentaje de 92 % y el más bajo de 4 %. La poca resistencia a pH bajos puede ser debido a la presencia del ácido clorhídrico que tiene la capacidad de desnaturalizar y dañar el ADN, ácidos grasos y proteínas de las células bacterianas (**Sahadeva et al., 2011**).

**Tabla 7.**

*Tolerancia a condiciones de 2 pH.*

<b>Banco de cepas</b>	<b>2 pH</b>	
	<b>Recuento celular UFC/mL</b>	<b>% Supervivencia</b>
Y2R2(7)-19	500 ± 0	33%
Y2R2(6)-29	1250 ± 0,70	38%

*Nota.* Los valores son medias de experimentos duplicados; ± indica desviación estándar de la media.

Las bacterias ácido-lácticas tienen la característica de ser acidófilas, por lo cual, tienen distintos mecanismos de regulación para tolerar y sobrevivir en entornos ácidos (**J. Liu et al., 2020**). El principal mecanismo es el proceso de neutralización que se da mediante las vías metabólicas, en donde, las bacterias producen sustancias alcalinas como la arginina, urea y amoníaco para neutralizar los ácidos (**C. Wang et al., 2018**). Se ha registrado que en condiciones acidas el aspartato influye en el aumento del flujo de metabolitos para la biosíntesis de la arginina regulando la resistencia a pH bajos (**Wu et al., 2013**). La desaminación del amoníaco influye en el pH de la célula bacteriana neutralizando las condiciones de estrés por la presencia de pH ácido (**Y. Wang et al., 2021**).

Igualmente, otros mecanismos de regulación se basan en la reparación de daños en el ADN y macromoléculas, la bomba de protones la cual disminuye la permeabilidad celular, la concentración intracelular, la producción de biopelículas y los cambios de composición de la membrana celular (**C. Wang et al., 2018**).

#### **3.1.2.4 Tolerancia a sales biliares**

La capacidad de sobrevivir a las sales biliares es recomendable para la selección de probióticos, debido a que, deben colonizar en el intestino delgado (**Zeng et al., 2021**). En la tabla 8, evidencia que todas las cepas de las tres muestras tienen alto porcentaje de supervivencia a la presencia de sales biliares a la concentración de 0.3 % y 0.5 %, que varía del 80% al 99%, sin embargo, la cepa VH1(1)-1 de la muestra de heces bovinas dio los valores más bajos de tolerancia del 70%. Estos hallazgos coinciden con los resultados

obtenidos por **Mulaw et al., (2019)** en donde las 4 cepas aisladas del fermento de Teff dough, Kocho y Ergo, tienen la capacidad de sobrevivir a la presencia de sales biliares al 0.3% con valores superiores al 90 %.

La capacidad de resistencia a las sales biliares se da mediante modificaciones en los elementos estructurales de los lípidos, debido a la afinidad de las sales biliares, afectando la membrana celular, otro mecanismo de protección es la regulación de la circulación de las enzimas de preservación hidrolasas y las sales biliares (**Kim et al., 2022**).

**Tabla 8.**

*Tolerancia a condiciones de sales biliares*

Banco de cepas	0,3 %			0,5%	
	Ctrl (UFC/mL)	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia
Y1R1(5)-5	$5,50 \times 10^9$	$4,28 \times 10^9 \pm 0,71$	99%	$4,53 \times 10^9 \pm 0,71$	99%
Y2R1(6)-10	$4,50 \times 10^8$	$3,75 \times 10^8 \pm 0,71$	99%	$2,25 \times 10^8 \pm 0,71$	97%
Y2R1(7)-11	$1,85 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9 \pm 0,71$	97%	$7,75 \times 10^8 \pm 0,71$	96%
Y2R1(7)-13	$1,15 \times 10^9$	$6,5 \times 10^8 \pm 1,15$	97%	$8,50 \times 10^8 \pm 1,41$	99%
Y2R2(7)-15	$2,5 \times 10^9$	$4,75 \times 10^8 \pm 0,71$	92%	$8,75 \times 10^8 \pm 0,71$	95%
Y2R2(7)-16	$5 \times 10^9$	$4,23 \times 10^9 \pm 0,71$	99%	$4,75 \times 10^9 \pm 0$	99%
Y2R2(7)-18	$1,25 \times 10^9$	$2,25 \times 10^8 \pm 0,71$	92%	$3,50 \times 10^8 \pm 1,41$	94%
Y2R2(7)-19	$6 \times 10^8$	$3,75 \times 10^8 \pm 0,71$	98%	$5,25 \times 10^8 \pm 0,71$	99%
Y2R2(6)-29	$6,5 \times 10^8$	$5,50 \times 10^8 \pm 1,41$	99%	$5,50 \times 10^8 \pm 1,41$	99%
Y3R2(6)-32	$3,95 \times 10^9$	$5,50 \times 10^8 \pm 1,41$	91%	$5,25 \times 10^8 \pm 0,71$	91%
Y3R2(6)-33	$8 \times 10^8$	$6,75 \times 10^8 \pm 0,71$	99%	$7 \times 10^8 \pm 1,41$	99%
Y3R1(7)-36	$7,5 \times 10^8$	$4,25 \times 10^8 \pm 0,71$	97%	$3,50 \times 10^8 \pm 1,41$	96%
C1R2(4)-1	$1,40 \times 10^9$	$1,05 \times 10^9 \pm 1,41$	99%	$7,25 \times 10^8 \pm 0,71$	97%
C1R2(4)-2	$1 \times 10^9$	$2,25 \times 10^8 \pm 0,71$	93%	$7,50 \times 10^7 \pm 0,71$	88%
C1R2(4)-6	$1,75 \times 10^9$	$4,50 \times 10^8 \pm 1,41$	94%	$5,25 \times 10^8 \pm 2,12$	94%
C1R2(4)-7	$5,50 \times 10^9$	$4,08 \times 10^9 \pm 2,12$	99%	$4,65 \times 10^9 \pm 1,41$	99%
C2R2(6)-10	$7,50 \times 10^8$	$6,75 \times 10^8 \pm 0,71$	99%	$6 \times 10^8 \pm 1,41$	99%
C2R2(6)-11	$2,75 \times 10^9$	$4,28 \times 10^9 \pm 0,71$	99%	$2,43 \times 10^9 \pm 0,71$	99%
C1R1(6)-17	$1 \times 10^9$	$7,75 \times 10^8 \pm 0,71$	99%	$8,75 \times 10^8 \pm 0,71$	99%

Banco de cepas	0,3 %			0,5%	
	Ctrl (UFC/mL)	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia	Recuento celular UFC/mL	% Supervivencia
C2R1(6)-18	$1 \times 10^9$	$2,25 \times 10^8 \pm 0,71$	93%	$1,75 \times 10^4 \pm 0,71$	47%
C2R2(7)-20	$6 \times 10^8$	$4,25 \times 10^8 \pm 0,71$	98%	$5,25 \times 10^8 \pm 0,71$	99%
C3R2(6)-21	$6,5 \times 10^8$	$9,75 \times 10^5 \pm 0,71$	68%	$1,75 \times 10^8 \pm 0,71$	94%
C3R2(4)-26	$2,20 \times 10^9$	$5,25 \times 10^8 \pm 0,71$	93%	$6,25 \times 10^8 \pm 0,71$	94%
VH1(1)-1	$6 \times 10^8$	$1,45 \times 10^6 \pm 1,41$	70%	$1,68 \times 10^6 \pm 0,71$	71%
VH1(1)-2	$1,75 \times 10^9$	$1,45 \times 10^9 \pm 1,41$	99%	$1,50 \times 10^9 \pm 0$	99%
VH1(1)-4	$1 \times 10^9$	$8,25 \times 10^8 \pm 0,71$	99%	$8,25 \times 10^8 \pm 0,71$	99%

*Nota.* Los valores son medias de experimentos duplicados;  $\pm$  indica la desviación estándar, los recuadros celestes son las cepas con mayor tolerancia.

### 3.1.2.5 Susceptibilidad a los antibióticos

La selección de probióticos debe cumplir requisitos de seguridad como la falta de actividad hemolítica y la susceptibilidad a antibióticos, para la prevención de reservorio y transferencia de genes resistentes a antibióticos a las bacterias patógenas que se encuentra en el intestino con la finalidad de prevenir la propagación de contaminación de genes resistentes a los antibióticos (RAM) (Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2019).

Se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos de las 17 cepas de las tres muestras que obtuvieron mayor rango de supervivencia (> 96 %) a las sales biliares. Los antibióticos utilizados se encuentran en la tabla 9 los cuales son: bacitracina (10  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), ciprofloxacino (5  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), cloranfenicol (30  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), eritromicina (15  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), gentamicina (10  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ) cotrimoxazol (23,75  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ) y vancomicina (30  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ). En donde, dos cepas de la muestra de la caña de azúcar C2R2(6)-10 y C2R2(6)-11, son multi resistentes a todos los antibióticos evaluados. Por lo contrario, las 4 cepas restantes tienen susceptibilidad a los antibiótico bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina y gentamicina, sin embargo, fueron resistentes a cotrimoxazol y vancomicina.

En la muestra de yuca las 9 cepas son susceptibles a los antibióticos bacitracina, cloranfenicol, eritromicina. Sin embargo, para el antibiótico ciprofloxacino solo tres cepas Y1R1(5)-5, Y2R2(7)-19 y Y2R2(6)-29, tiene susceptibilidad intermedia, las 6 cepas restantes son resistentes. Para el antibiótico cotrimoxazol solo dos cepas Y2R2(7)-16 y Y2R2(7)-19 son susceptibles, las 7 cepas restantes son resistentes. El antibiótico



gentamicina registró que solo una cepa Y2R1(7)-11 tiene resistencia. Finalmente, todas las cepas de la yuca son resistente a la vancomicina. Para la muestra de heces bovinas dos cepas son susceptibles a los antibiótico bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina y vancomicina, excepto al antibiótico cotrimoxazol presentaron resistencia.

Todas las cepas de las tres muestras presentaron susceptibilidad a los antibióticos bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina y gentamicina, a excepción de ciertos aislamientos de la muestra de la yuca, de igual manera, presentaron resistencia a los antibióticos vancomicina y cotrimoxazol. Estos resultados concuerdan con los estudios de aislamientos de cepas obtenidos de la leche que han presentado susceptibilidad a los antibióticos gentamicina, cloranfenicol y bacitracina (**Andrade et al., 2019; Vanniyasingam et al., 2019**). En el estudio de aislamiento de cepas del intestino de pollo presentaron susceptibilidad y susceptibilidad intermedia a los antibióticos eritromicina, cloranfenicol y resistencia a vancomicina y ciprofloxacino (**Kassa et al., 2024b; Reuben et al., 2019**).

Los lactobacilos tienen resistencia intrínseca a diversos antibióticos como la vancomicina, ciprofloxacino, gentamicina, kanamicina y metronidazol, debido a la presencia de los aminoglucósidos y glucopeptidos considerándose una característica natural de la especie y género de la bacteria la cual no es transferible (**Das et al., 2020; Klarin et al., 2019; Meleh et al., 2020**). La resistencia a los aminoglucósidos está presente en más del 70 % en las bacterias ácido-lácticas, el mecanismo de los aminoglucósidos es bloquear la síntesis de proteínas al adherirse al sitio A de la subunidad 30S del ribosoma (**Li et al., 2020**). De igual forma, poseen susceptibilidad a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (**Anisimova & Yarullina, 2019; Daniali et al., 2020**).

**Tabla 9.**

*Susceptibilidad a los antibióticos*

Banco de cepas	bacitracina (10 µg/disco)	ciprofloxacino (5 µg/disco)	cloranfenicol (30 µg/disco)	eritromicina (15 µg/disco)	gentamicina (10 µg/disco)	cotrimoxazol (23,75 µg/disco)	vancomicina (30 µg/disco)
Y1R1(5)-5	S (30 mm)	I (15mm)	I (20 mm)	S (25 mm)	S (21 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y2R1(6)-10	S (30 mm)	R (0 mm)	S (33 mm)	S (35 mm)	S (22 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y2R1(7)-11	I (15mm)	R (0 mm)	S (33 mm)	I (15mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y2R1(7)-13	S (25 mm)	R (0 mm)	S (25 mm)	S (33 mm)	S (22 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y2R2(7)-16	S (25 mm)	R (0 mm)	S (25 mm)	S (30 mm)	I (20 mm)	S (30 mm)	R (0 mm)
Y2R2(7)-19	S (30 mm)	I (10 mm)	S (30 mm)	S (33 mm)	I (20 mm)	S (30 mm)	R (0 mm)
Y2R2(6)-29	S (25 mm)	I (15 mm)	I (20 mm)	S (32 mm)	S (23 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y3R2(6)-33	S (30 mm)	R (0 mm)	S (35 mm)	S (37 mm)	S (24 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
Y3R1(7)-36	S (33 mm)	R (0 mm)	S (33 mm)	S (35 mm)	I (20 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C1R2(4)-1	S (30 mm)	S (30 mm)	S (40 mm)	S (40 mm)	I (12 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C1R2(4)-7	S (25 mm)	S (25 mm)	S (25 mm)	I (20 mm)	I (10 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C2R2(6)-10	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C2R2(6)-11	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C1R1(6)-17	S (25 mm)	S (30 mm)	S (30 mm)	S (25 mm)	I (15mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
C2R2(7)-20	I (20 mm)	I (10mm)	I (20 mm)	S (25 mm)	I (15mm)	R (0 mm)	R (0 mm)
VH1(1)-2	S (25 mm)	S (30 mm)	I (20 mm)	I (15mm)	I (10 mm)	R (0 mm)	S (25mm)
VH1(1)-4	I (20 mm)	S (22 mm)	S (30 mm)	S (25 mm)	S (22 mm)	R (0 mm)	I (20 mm)

**Nota.** La nomenclatura S indica susceptible, I indica susceptibilidad intermedia y R significa resistente. Los recuadros pintados de color amarillo tienen mayor susceptibilidad a los antibióticos.

### 3.1.2.6 Actividad antagónica

Las cepas con mejor susceptibilidad a los antibióticos, fueron evaluadas frente a la actividad antagónica contra la cepa *E. coli* ATCC 11775, mostrando en la tabla 10 que las diez cepas aisladas de las muestras de fermento de yuca, caña de azúcar y heces bovinas, tienen una actividad inhibitoria ineficaz, podemos suponer que la cantidad de probiótico suministrado a 0.5 McFarland es baja para la producción de sustancias antimicrobianas, en el estudio de **Zhang et al., (2020)** los aislamientos de cepas probióticas a partir de muestras de queso no mostraron efecto inhibitorio contra *E. coli* ATCC 25922. Del mismo modo los aislamientos de cepas probióticas a partir de aceitunas fermentadas no mostraron actividad antagónica contra los patógenos como *E. coli* (**Sornplang & Piyadeatsoontorn, 2016**). Por lo contrario, en el estudio de **Leska et al., (2022)** demostraron actividad antagónica contra *E. coli* ATCC 25922, suministrando mayor cantidad de cepas probióticas a una escala 6 McFarland produciendo metabolitos como el lactato, butirato, peróxido de hidrógeno y ácido acético que permite la disminución del pH del entorno provocando la inhibición de crecimiento de bacterias patógenas.

**Tabla 10.**

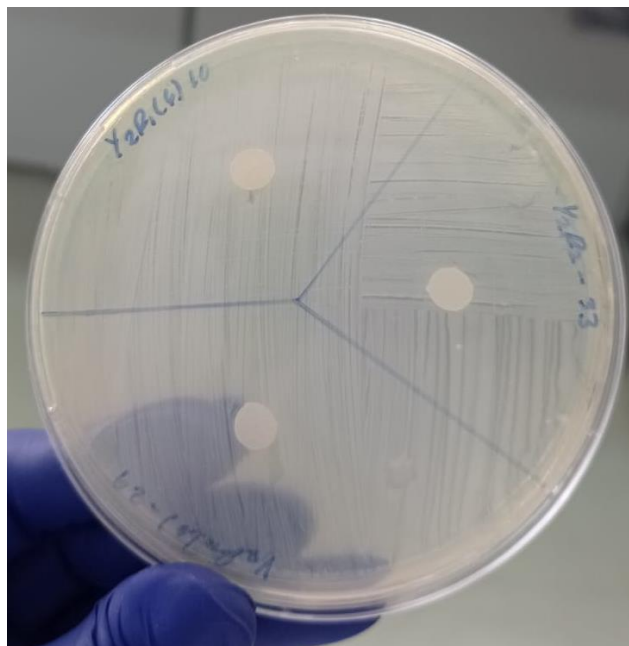
*Actividad Antagónica contra la cepa patógena*

<b>Cepas</b>	<b>Actividad Antagonica</b>
<b>Y1R1(5)-5</b>	-
<b>Y2R2(7)-16</b>	-
<b>Y2R2(7)-19</b>	-
<b>Y2R2(6)-29</b>	-
<b>C1R2(4)-1</b>	-
<b>C1R2(4)-7</b>	-
<b>C1R1(6)-17</b>	-
<b>C2R2(7)-20</b>	-
<b>VH1(1)-2</b>	-
<b>VH1(1)-4</b>	-

*Nota.* el signo (-) indica que la prueba realizada no tiene ninguna actividad antagónica

## Figura 6.

*Actividad antagonista de las cepas aisladas*



### 3.1.3 Identificación de las cepas aisladas

Se eligió las mejores cepas para la identificación de género y especie, los cuales fueron la cepa de la muestra de yuca Y2R2(7)-19, en donde, tiene capacidad de adhesión celular, no presenta actividad hemolítica, tiene tolerancia a pH de 2 y 3 con porcentaje de sobrevivencia del 33 % y 81 %, tolerancia a las sales biliares del 0.3 % y 0.5 % con porcentaje de 98 % y 99 %, susceptibilidad a seis antibióticos bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina y cotrimoxazol. Del mismo modo, la cepa de la muestra de caña de azúcar C1R2(4)-1 tiene capacidad de adhesión celular, no presenta actividad hemolítica, tiene tolerancia a solo el pH de 3 con el mayor porcentaje de sobrevivencia del 90 %, tolerancia a las sales biliares del 0.3 % y 0.5 % con porcentaje de 99 % y 97 %, susceptibilidad a cinco antibióticos con el mayor rango de inhibición a comparación de otras cepas a la bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol y eritromicina, gentamicina.

La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante el perfil de índice analítico API 50 CH, el cual evalúa el perfil fermentativo de 49 carbohidrato de los microorganismos, mediante el cambio de color de púrpura a amarillo producido por el indicador

bromocresol (**Bautista-Gallego et al., 2020**). Se identificó que las dos cepas de las muestras tienen una similitud con la cepa *Lactobacillus plantarum* como se evidencia en la tabla 11. En varios estudios de alimentos fermentados han identificado mediante pruebas API 50CH la bacteria *Lactobacillus plantarum* coincidiendo con los resultados obtenidos (**Pei et al., 2020; Sohn et al., 2020**).

**Tabla 11.**

Identificación de las cepas aisladas

<b>Tubos</b>	<b>Componentes activos</b>	<b>Y2R2(7)-19</b>	<b>C1R2(4)-1</b>
0	Control	-	-
1	Glicerol	-	-
2	Eritritol	-	-
3	D-arabinosa	-	-
4	L-arabinosa	+	+
5	D-ribosa	+	+
6	D-xilosa	-	-
7	L-xilosa	-	-
8	D-adonitol	-	-
9	Metil- $\beta$ -D-xilopiranosido	-	-
10	D-galactosa	+	+
11	D-glucosa	+	+
12	D-fructosa	+	+
13	D-manosa	+	+
14	L-sorbona	-	-
15	L-ramnosa	-	-
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-
18	D-manitol	+	+
19	D-sorbitol	+	+
20	Metil- $\alpha$ D-manopiranosido	+	+
21	Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido	-	-
22	N-acetilglucosamina	+	+

<b>Tubos</b>	<b>Componentes activos</b>	<b>Y2R2(7)-19</b>	<b>C1R2(4)-1</b>
23	Amigdalina	+	+
24	Arbutina	+	+
25	Esculina	+	+
26	Salicina	+	+
27	D-celobiosa	+	+
28	D-maltosa	+	+
29	D-lactosa	+	+
30	D- melibiosa	+	+
31	D-sacarosa	+	+
32	D-trehalosa	+	+
33	Inulina	-	-
34	D-melocitosa	+	+
35	D-rafinosa	+	+
36	Almidon	-	-
37	Glucogeno	-	-
38	Xilitol	-	-
39	Gentiobiosa	+	+
40	D-turanosa	+	+
41	D-lixosa	-	-
42	D-tagatosa	-	-
43	D-fucosa	-	-
44	L-fucosa	-	-
45	D-arabitol	-	-
46	L-arabitol	-	-
47	Gluconato potasico	+	+
48	2-cetogluconato potasico	-	-
49	5-cetogluconato potasico	-	-

Existe más de 60 géneros de probióticos aislados de alimentos y bebidas fermentadas, sin embargo, los géneros más frecuentes son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococo*, *Weissella* y *Lactobacillus plantarum*, debido a que, las sustancias que se encuentran en el entorno como minerales, carbohidratos y proteínas son una fuente adecuada de nutrientes o prebióticos (**Dahiya & Nigam, 2022**).

### **3.2 Verificación de hipótesis**

Con los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa, en donde, las muestras de fermento de yuca, caña de azúcar y heces bovinas, se obtuvo bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico.

## CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Se aisló un total de 63 cepas, de las cuales 28 pertenecen al fermento de yuca, 30 al fermento de caña de azúcar y 5 a las heces bovinas. Las características morfológicas de estas cepas presentan variaciones entre las muestras, manifestándose como cocos o varillas con colinas de tonalidad cremosa y blanca. Además, todas las cepas exhibieron características comunes al ser grampositivas y negativas para la catalasa.
- Se realizó pruebas *in vitro* de las 63 cepas aisladas, en donde, 60 cepas dieron positivo a la adhesión celular, 50 cepas no mostraron actividad hemolítica, 26 cepas sobrevivieron a las sales biliares al 0.3%, 0.5% a pH de 3 y solo 2 cepas al pH de 2, la seguridad a la resistencia a los antibióticos mostro que dos cepas de la muestra de la caña de azúcar son multi resistentes a todos los antibióticos evaluados y el 53 % de las cepas de las tres muestras exhibieron susceptibilidad a los antibióticos bacitracina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina y resistencia intrínseca a los antibióticos vancomicina y cotrimoxazol, para la actividad antagónica ninguna cepa inhibido el crecimiento de *E. coli*.
- Se seleccionaron las cepas con mayor potencial probiótico considerando la cepa de la muestra de yuca Y2R2(7)-19 y de la caña de azúcar C1R2(4)-1, los aislamientos con mejor eficiencia debido a que no presentaron actividad hemolítica y poseen adhesión celular, la cepa Y2R2(7)-19 tiene la tolerancia de sobrevivir a pH 2 - 3 y sales biliares de 0.3% - 0.5%, tiene susceptibilidad a seis antibióticos, del mismo modo, la C1R2(4)-1 es la cepa con mayor porcentaje de supervivencia (90%) a pH 3 y sales biliares de 0.3%- 0.5%, es susceptible a cinco antibióticos con el mayor rango de inhibición a comparación de otras cepas.
- Las cepas Y2R2(7)-19 y C1R2(4)-1, se identificó el género y especie de las bacterias mediante el perfil de índice analítico API 50CH, el cual evaluó el perfil fermentativo de 49 carbohidrato, dando como que coincide con la bacteria *Lactobacillus plantarum*.



## 4.2 Recomendaciones

- Se sugiere realizar una investigación a profundidad sobre la resistencia de los antibióticos para conocer los genes de resistencia y confirmar si pertenece a la resistencia intrínseca, mutaciones o es transferible.
- Realizar la prueba de la actividad antagónica con más bacterias patógenas y con diferentes cantidades de las cepas aisladas, para conocer mejor que cantidad de probióticos suministrada es la más eficiente.
- Identificar los probióticos con una secuencia de ADN 16S.
- Evaluar la efectividad de los probióticos en pruebas *in vivo*.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- Abudoleh, S., Hamdan, S., Mahasneh, A., Al-Khani, Z., & Talhouni, A. (2021). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Jordanian traditional pickled and fermented foods. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 78(4), 515–520. <https://doi.org/10.32383/appdr/141300>
- Adugna, M., & Andualem, B. (2023). Isolation, characterization and safety assessment of probiotic lactic acid bacteria from metata ayib (Traditional spiced cottage cheese). *Food and Humanity*, 1, 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.FOOHUM.2023.05.002>
- Ahire, J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M., Lakshmi, S., & Madempudi, R. (2021). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 Isolated from Traditional Indigenous Fermented Food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1413–1424. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09775-7/FIGURES/5>
- Ajibola, O., Thomas, R., & Bakare, B. (2023). Selected fermented indigenous vegetables and fruits from Malaysia as potential sources of natural probiotics for improving gut health. *Food Science and Human Wellness*, 12(5), 1493–1509. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2023.02.011>
- Al-Yami, A., Al-Mousa, A., Al-Otaibi, S., & Khalifa, A. (2022). *Lactobacillus* Species as Probiotics: Isolation Sources and Health Benefits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4). <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.19>
- Andrade, S., Lopes, J., & Cardarelli, H. (2019). Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, 69(13). <https://doi.org/10.1007/S13213-019-01533-Z/TABLES/2>
- Anisimova, E., & Yarullina, D. (2019). Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Strains. *Current Microbiology*, 76(12). <https://doi.org/10.1007/S00284-019-01769-7/METRICS>
- Arsène, M., Davares, A., Andreevna, S., Vladimirovich, E., Carime, B., Marouf, R., &

- Khelifi, I. (2021). The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*, *14*(2). <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.319-328>
- Ban, O., Bang, W., Jeon, H., Jung, Y., Yang, J., & Kim, D. (2023). Potential of *Bifidobacterium lactis* IDCC 4301 isolated from breast milk-fed infant feces as a probiotic and functional ingredient. *Food Science & Nutrition*, *11*(4), 1952–1964. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3230>
- Banco Central del Ecuador. (2020). *Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario*. Banco Central Del Ecuador . [www.bce.ec](http://www.bce.ec)
- Bautista-Gallego, J., Medina, E., Sánchez, B., Benítez-Cabello, A., & Arroyo-López, F. (2020). Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites*, *71*(2). <https://doi.org/10.3989/GYA.0344191>
- Bazireh, H., Shariati, P., Azimzadeh Jamalkandi, S., Ahmadi, A., & Boroumand, M. (2020). Isolation of Novel Probiotic *Lactobacillus* and *Enterococcus* Strains From Human Salivary and Fecal Sources. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 597946. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.597946/BIBTEX>
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M., Tremblay, A., & Ouwehand, A. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 563305. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01662/BIBTEX>
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Nychas, G., & Panagou, E. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *271*, 48–59. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.02.018>
- Bowles, N., Alexander, S., & Hadjikakou, M. (2019). The livestock sector and planetary boundaries: A ‘limits to growth’ perspective with dietary implications. *Ecological Economics*, *160*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLECON.2019.01.033>
- Cardelle-Cobas, A., Coy-Girón, L., Cepeda, A., & Nebot, C. (2022). Swine Production:

- Probiotics as an Alternative to the Use of Antibiotics. *Intechopen*.  
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.108308>
- Cardelle-Cobas, A., Coy-Girón, L., Cepeda, A., & Nebot, C. (2023). Swine Production: Probiotics as an Alternative to the Use of Antibiotics. *IntechOpen*.  
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.108308>
- Chen, C., Cao, Z., Li, J., Tao, C., Feng, Y., & Han, Y. (2020). A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biological Control*, 148, 104306.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2020.104306>
- Dadar, M., Tiwari, R., Sharun, K., & Dhama, K. (2021). Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 137–151. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1894501>
- Dahiya, D., & Nigam, P. (2022). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Fermented Foods as Potential Biotics in Nutrition Improving Health via Microbiome-Gut-Brain Axis. *Fermentation* 2022, Vol. 8, Page 303, 8(7), 303.  
<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION8070303>
- Daniali, M., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2020). Antibiotic resistance propagation through probiotics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16(12).  
<https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1825682>
- Das, D., Shankar, A., Johnson, J., & Thomas, S. (2020). Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition*, 69.  
<https://doi.org/10.1016/J.NUT.2019.110567>
- Ding, S., Yan, W., Ma, Y., & Fang, J. (2021). The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Animal Nutrition*, 7(1), 24–30.  
<https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2020.11.004>
- Flores-Miranda, C., Luna-González, A., Campa, Á., Fierro, J., Partida-Arangure, B., Pintado, J., & González-Ocampo, H. (2012). Isolation and characterization of infectious *Vibrio sinaloensis* strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 60(2), 567–576.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44923872005>

- Fontana, A., Falasconi, I., Molinari, P., Treu, L., Basile, A., Vezzi, A., Campanaro, S., & Morelli, L. (2019). Genomic comparison of *Lactobacillus helveticus* strains highlights probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JUN), 449552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01380/BIBTEX>
- Fredua-Agyeman, M., Ofosu-Boateng, M., Offei, A., Mehta, M., Gaisford, S., & Limayem, A. (2020). Study on the functional properties of potential indigenous probiotics isolated from human samples in West Africa. *LWT*, *133*, 109895. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109895>
- Gao, F., He, L., Bai, H., He, L., Zhang, M., Chen, Z., Liu, Y., & Ying, G. (2023). Airborne bacterial community and antibiotic resistome in the swine farming environment: Metagenomic insights into livestock relevance, pathogen hosts and public risks. *Environment International*, *172*, 107751. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107751>
- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., & Jan, G. (2019). Review: Adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 414862. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00841/BIBTEX>
- Hedman, H., Vasco, K., & Zhang, L. (2020). A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *Animals*, *10*(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/ani10081264>
- Humayun Kober, A., Rajoka, M., Mehwish, H., Villena, J., & Kitazawa, H. (2022). Immunomodulation Potential of Probiotics: A Novel Strategy for Improving Livestock Health, Immunity, and Productivity. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 388, *10*(2), 388. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020388>
- James, A., & Wang, Y. (2019). Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CYTA - Journal of Food*, *17*(1). <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1652693>

- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., & Nitoda, T. (2021). Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT*, *135*, 110061. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110061>
- Jobby, R., Flora, Y., Bora, A., Jha, P., Kawalkar, H., & Desai, N. (2020). Exploring Probiotic Activity of *Lactobacillus* sp. Isolated from Indigenous Breeds of Cattle Milk and Fecal Samples in Bhatan Village, MH., IN. *Current Microbiology*, *77*(7), 1184–1190. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-01910-X>
- Kamboh, A. A., & Carreira, R. (2023). Antibiotics and Probiotics in Animal Food - Impact and Regulation. *Intechopen*, *13*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.100823>
- Kassa, G., Alemayehu, D., & Andualem, B. (2024a). Isolation, identification, and molecular characterization of probiotic bacteria from locally selected Ethiopian free range chickens gastrointestinal tract. *Poultry Science*, *103*(2), 103311. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2023.103311>
- Kassa, G., Alemayehu, D., & Andualem, B. (2024b). Isolation, identification, and molecular characterization of probiotic bacteria from locally selected Ethiopian free range chickens gastrointestinal tract. *Poultry Science*, *103*. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2023.103311>
- Kim, H., Lee, Y., Yu, H., Kwon, M., Kim, K., In, G., Hong, S., Kim, S., Kim, H., Lee, Y.-S., Yu, H.-Y., Kwon, M., Kim, K.-K., In, G., Hong, S.-K., & Kim, S.-K. (2022). Anti-Inflammatory Effects of *Limosi lactobacillus fermentum* KGC1601 Isolated from *Panax ginseng* and Its Probiotic Characteristics. *Foods*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/FOODS11121707>
- Klarin, B., Larsson, A., Molin, G., & Jeppsson, B. (2019). Susceptibility to antibiotics in isolates of *Lactobacillus plantarum* RAPD-type Lp299v, harvested from antibiotic treated, critically ill patients after administration of probiotics. *MicrobiologyOpen*, *8*(2). <https://doi.org/10.1002/MBO3.642>
- Lambo, M., Chang, X., Liu, D., Balasubramanian, B., & Sureshkumar, S. (2021). The Recent Trend in the Use of Multistrain Probiotics in Livestock Production: An

- Overview. *Alternatives of Growth Promoters in Livestock*, 11(10), 2805.  
<https://doi.org/10.3390/ANI11102805>
- Leska, A., Nowak, A., Szulc, J., Motyl, I., & Czarnecka-Chrebelska, K. (2022). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Pathogens*, 11(11).  
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11111367/S1>
- Li, T., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Wang, X., & Wang, J. (2020). A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Food Research International*, 136.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109571>
- Lin, W., Ptak, C., Chang, C., Ian, M., Chia, M., Chen, T., & Kuo, C. (2020). Autochthonous lactic acid bacteria isolated from dairy cow feces exhibiting promising probiotic properties and *in vitro* antibacterial activity against foodborne pathogens in cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 532726.  
<https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00239/BIBTEX>
- Liu, C., Xue, W., Ding, H., An, C., Ma, S., & Liu, Y. (2022). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 4168.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.774903/BIBTEX>
- Liu, J., Wang, Y., Li, A., Iqbal, M., Zhang, L., Pan, H., Liu, Z., & Li, J. (2020). Probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus* isolated from yaks. *Microbial Pathogenesis*, 145. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104213>
- López-Malo, A., Mani-López, E., Davidson, P., & Palou, E. (2020). Methods for Activity Assay and Evaluation of Results. In *Antimicrobials in Food* (4th ed., pp. 13–40). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429058196-2/METHODS-ACTIVITY-ASSAY-EVALUATION-RESULTS-AURELIO-L>
- Lu, H., Yang, P., Zhong, M., Bilal, M., Xu, H., Zhang, Q., Xu, J., Liang, N., Liu, S., Zhao, L., Zhao, Y., & Geng, C. (2023). Isolation of a potential probiotic strain *Bacillus amyloliquefaciens* LPB-18 and identification of antimicrobial compounds responsible for inhibition of food-borne pathogens. *Food Science & Nutrition*, 11(5), 2186–2196. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3094>

- Ma, F., Xu, S., Tang, Z., Li, Z., & Zhang, L. (2021). Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health*, 3(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.BSHEAL.2020.09.004>
- Madjirebaye, P., Xiao, M., Mahamat, B., Xiong, S., Mueed, A., Wei, B., Huang, T., Peng, F., Xiong, T., & Peng, Z. (2022). *In vitro* characteristics of lactic acid bacteria probiotics performance and antioxidant effect of fermented soymilk. *Food Bioscience*, 49, 101952. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101952>
- Mangia, N., Saliba, L., & Deiana, P. (2019). Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. *Annals of Microbiology*, 69(2), 161–170. <https://doi.org/10.1007/S13213-018-1416-1/FIGURES/1>
- Meerza, S., Gulab, S., Brooks, K., Gustafson, C., & Yiannaka, A. (2022). U.S. Consumer Attitudes toward Antibiotic Use in Livestock Production. *Sustainability*, 14(12), 7035. <https://doi.org/10.3390/SU14127035>
- Meleh, H., Choo, S., Mohd Desa, M., Chew, S., Rangasamy, P., Hassan, H., & Than, L. (2020). Isolation and safety characterisation of *lactobacilli* strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use. *LWT*, 131. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109796>
- Menezes, A., Melo, D. de S., Ramos, C., Moreira, S., Alves, E., & Schwan, R. (2020). Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103969. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.103969>
- Mishra, S., Mithul Aravind, S., Charpe, P., Ajlouni, S., Ranadheera, C., & Chakkaravarthi, S. (2022). Traditional rice-based fermented products: Insight into their probiotic diversity and probable health benefits. *Food Bioscience*, 50, 102082. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.102082>
- Mohammed, S., & Con, A. (2021). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. *LWT*, 152, 112319. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112319>



- Mojikon, F., Kasimin, M., Molujin, A., Gansau, J., & Jawan, R. (2022). Probiotication of Nutritious Fruit and Vegetable Juices: An Alternative to Dairy-Based Probiotic Functional Products. *Nutrients*, *14*(17). <https://doi.org/10.3390/NU14173457>
- Morrone, S., Dimauro, C., Gambella, F., & Cappai, M. (2022). Industry 4.0 and Precision Livestock Farming (PLF): An up to date overview across animal productions. *Sensors*, *22*(12), 4319. <https://doi.org/10.3390/S22124319>
- Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7179514>
- Panesar, P., & Anal, A. (2022). Isolation, Identification and Characterization of Beneficial Microorganisms from Traditional Fermented Foods. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (First Published, Vol. 1, pp. 14–56). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119702160>
- Patel, S., Wellington, M., Shah, R., & Ferreira, M. (2020). Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clinical Therapeutics*, *42*(9), 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2020.07.004>
- Patrone, V., Al-Surrayai, T., Romaniello, F., Fontana, A., Milani, G., Sgheddu, V., Puglisi, E., Callegari, M., Al-Mansour, H., Kishk, M., & Morelli, L. (2021). Integrated Phenotypic-Genotypic Analysis of Candidate Probiotic *Weissella Cibaria* Strains Isolated from Dairy Cows in Kuwait. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(3), 809–823. <https://doi.org/10.1007/S12602-020-09715-X/FIGURES/4>
- Pei, J., Jin, W., Abd El-Aty, A., Baranenko, D., Gou, X., Zhang, H., Geng, J., Jiang, L., Chen, D., & Yue, T. (2020). Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*, *110*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106923>
- Pereira, W., Mendonça, C., Urquiza, A., Marteinson, V., LeBlanc, J., Cotter, P., Villalobos, E., Romero, J., & Oliveira, R. (2022). Use of Probiotic Bacteria and

- Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms* , 10(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091705>
- Pimentel, T., Gomes de Oliveira, L., de Lourdes Chaves Macedo, E., Costa, G., Dias, D., Schwan, R., & Magnani, M. (2021). Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: Current scenario and main challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 25–59. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.05.024>
- Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria *in-vitro* by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23. <https://doi.org/10.1016/J.YCLNEX.2018.10.001>
- Rashad, H., & Abdul, S. (2023). Co-Aggregative Effect of Probiotics Bacteria against Diarrheal Causative Bacteria. *Archives of Razi Institute*, 78(3). <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359870.2494>
- Reuben, R., Roy, P., Sarkar, S., Alam, R., & Jahid, I. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12866-019-1626-0/TABLES/9>
- Robles-Jimenez, L. , Aranda-Aguirre, E., Castelan-Ortega, O., Shettino-Bermudez, B. S., Ortiz-Salinas, R., Miranda, M., Li, X., Angeles-Hernandez, J., Vargas-Bello-pérez, E., & Gonzalez-Ronquillo, M. (2022). Worldwide traceability of antibiotic residues from livestock in wastewater and soil: A systematic review. *Animal's Production Systems and Environment*, 12(1), 60. <https://doi.org/10.3390/ANI12010060/S1>
- Saeed, S., Mergani, A., Aklilu, E., & Kamaruzzaman, N. (2022). Antimicrobial Peptides: Bringing Solution to the Rising Threats of Antimicrobial Resistance in Livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 851052. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.851052/BIBTEX>
- Sahadeva, R., Leong, S., Chua, K., Tan, C., Chan, H., Tong, E., Wong, S., & Chan, H. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4).

- Sakandar, H., Kubow, S., & Sadiq, F. (2019). Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT*, *104*, 70–75. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.01.038>
- Salminen, S., Collado, M., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E., Sanders, M., Shamir, R., Swann, J., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *2021 18:9*, *18(9)*, 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Samedi, L., & Charles, A. (2019). Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Annals of Agricultural Sciences*, *64(1)*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2019.05.004>
- Sano, D., Wester, A., Schmitt, H., Amarasiri, M., Kirby, A., Medlicott, K., & Roda, A. (2020). Updated research agenda for water, sanitation and antimicrobial resistance. *Water and Health*, *18(6)*, 858–866. <https://doi.org/10.2166/WH.2020.033>
- Santos Leandro, E., Ginani, V., de Alencar, E., Pereira, O., Rose, E., do Vale, H., Pratesi, R., Hecht, M., Cavalcanti, M., & Tavares, C. (2021). Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13(1)*, 173–186. <https://doi.org/10.1007/S12602-020-09679-Y/TABLES/6>
- Sarkar, S., Hossain, M., Monika, S., Sanyal, S., Roy, P., Hossain, M., & Jahid, I. (2020). Probiotic Potential of *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium* Isolated from Indigenous Yogurt and Raw Goat Milk. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, *48(3)*, 276–286. <https://doi.org/10.4014/MBL.1912.12009>
- Shao, Y., Wang, Y., Yuan, Y., & Xie, Y. (2021). A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China. *Science of The Total Environment*, *798*, 149205. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149205>

- Silva, D., Sardi, J., Pitangui, N., Roque, S., Silva, A., & Rosalen, P. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Functional Foods*, *73*. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.104080>
- Sionek, B., Szydłowska, A., Zielińska, D., Neffe-Skocińska, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Beneficial Bacteria Isolated from Food in Relation to the Next Generation of Probiotics. *Microorganisms*, *11*(7), 1714. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071714>
- Sohn, H., Chang, Y., Yune, J., Jeong, C., Shin, D., Kwon, H., Kim, D., Hong, S., Hwang, H., Jeong, J., & Han, S. G. (2020). Probiotic Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* LB5 Isolated from Kimchi Based on Nitrate Reducing Capability. *Foods*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/FOODS9121777>
- Somashekaraiah, R., Mottawea, W., Gunduraj, A., Joshi, U., Hammami, R., & Sreenivasa, M. (2021). Probiotic and Antifungal Attributes of *Levilactobacillus brevis* MYSN105, Isolated From an Indian Traditional Fermented Food Pozha. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 696267. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.696267/BIBTEX>
- Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*, *58*. <https://doi.org/10.1186/S40781-016-0108-2>
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods 2021*, *Vol. 10*, Page 1306, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/FOODS10061306>
- Surve, S., Shinde, D., & Kulkarni, R. (2022). Isolation, characterization and comparative genomics of potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from Indian foods. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05850-3>
- Tang, K., Millar, B., & Moore, J. (2023). Antimicrobial Resistance (RAM). *British Journal of Biomedical Science*, *80*, 11387. <https://doi.org/10.3389/BJBS.2023.11387/BIBTEX>
- Van, T., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B., Levin, S., Robinson, T., Teillant, A., &

- Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), 5649–5654. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1503141112/SUPPL\\_FILE/PNAS.201503141SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1503141112/SUPPL_FILE/PNAS.201503141SI.PDF)
- Vanniyasingam, J., Kapilan, R., & Vasantharuba, S. (2019). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from cow milk and milk products. *Journal of Agricultural Sciences*, *13*(1), 32. <https://doi.org/10.4038/AGRIEAST.V13I1.62>
- Vinueza, R., Durand, B., & Zanella, G. (2022). Network analysis of cattle movements in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, *201*, 105608. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2022.105608>
- Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, *200*(2), 195–201. <https://doi.org/10.1007/S00203-017-1446-2/METRICS>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.612285/BIBTEX>
- Williams, G., & Anderson, D. (2020). The Latin American livestock industry: growth and challenges. *Choices*, *34*(4), 1–11. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.302483>
- World Health Organization. (2020). Technical Brief on Water, Sanitation, Hygiene and Wastewater Management to Prevent Infections and Reduce the Spread of Antimicrobial Resistance. *World Health Organization*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240006416>
- Wu, C., Zhang, J., Du, G., & Chen, J. (2013). Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(9), 4083–4093. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4647-2>
- Yaqoob, M., Wang, G., & Wang, M. (2022). An updated review on probiotics as an

- alternative of antibiotics in poultry — A review. *Animal Bioscience*, 35(8), 1109. <https://doi.org/10.5713/AB.21.0485>
- Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W., Khaliq, A., Chughtai, M., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., & Tanweer, S. (2020). *In Vitro* Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 354, 8(3), 354. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030354>
- Zampieri, G., Efthimiou, G., & Angione, C. (2023). Multi-dimensional experimental and computational exploration of metabolism pinpoints complex probiotic interactions. *Metabolic Engineering*, 76, 120–132. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2023.01.008>
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A., & Cruz, A. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103–123. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.03.009>
- Zeng, Z., He, X., Li, F., Zhang, Y., Huang, Z., Wang, Y., Li, K., Bao, Y., Iqbal, M., Fakhar-e-Alam, M., & Li, J. (2021). Probiotic Properties of *Bacillus proteolyticus* Isolated From Tibetan Yaks, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.649207/BIBTEX>
- Zhang, M., He, L., Liu, Y., Zhao, J., Zhang, J., Chen, J., Zhang, Q., & Ying, G. (2020). Variation of antibiotic resistome during commercial livestock manure composting. *Environment International*, 136, 105458. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105458>
- Zhang, X., Esmail, G., Alzeer, A., Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Choi, K., & Abdullah, N. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12). <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.10.022>
- Zhang, Y., Walsh, T., Wang, Y., Shen, J., & Yang, M. (2022). Minimizing risks of antimicrobial resistance development in the environment from a public one health perspective. *China CDC Weekly*, 4(49), 1105. <https://doi.org/10.46234/CCDCW2022.224>

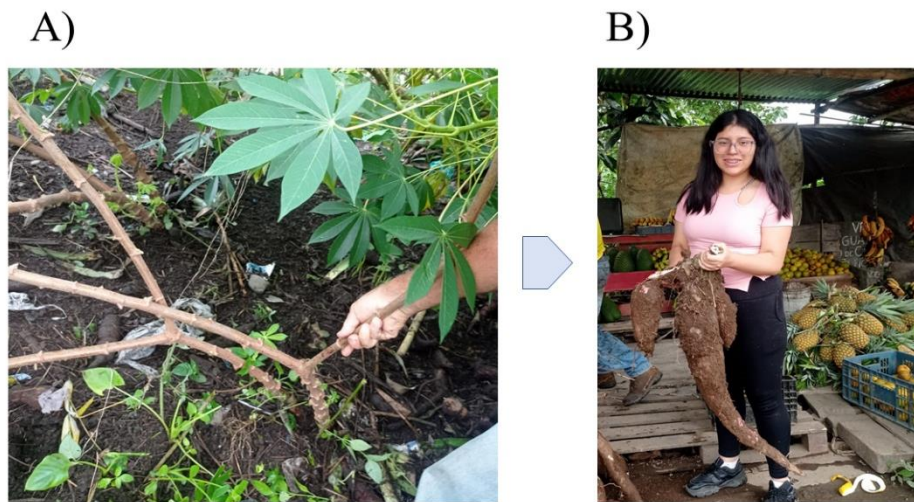
- Zhao, L., Dong, Y. H., & Wang, H. (2010). Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment*, 408(5), 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2009.11.014>
- Zhao, Y., Yang, Q., Zhou, X., Wang, F., Muurinen, J., Virta, M., Brandt, K., & Zhu, Y. (2021a). Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159–2196. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>
- Zhao, Y., Yang, Q., Zhou, X., Wang, F., Muurinen, J., Virta, M., Brandt, K., & Zhu, Y. (2021b). Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159–2196. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>
- Zucko, J., Starcevic, A., Diminic, J., Oros, D., Mortazavian, A. M., & Putnik, P. (2020). Probiotic – friend or foe? *Current Opinion in Food Science*, 32, 45–49. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.01.007>

## Anexos

### Anexo 1. Recolección de muestras vegetales

#### Figura 7.

*Recolección de muestras vegetales en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas*

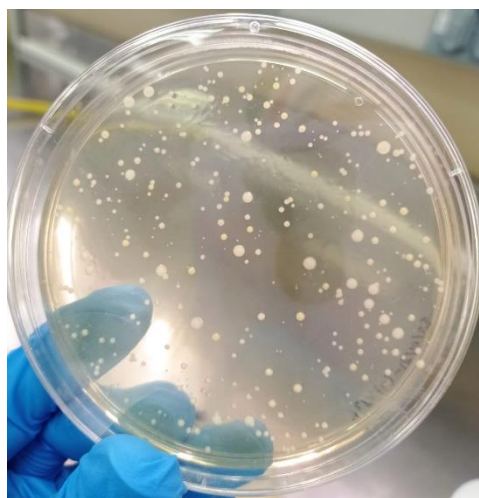


*Nota.* A) Recolección, B) Limpieza

### Anexo 2. Morfología de las cepas aisladas

#### Figura 8.

*Morfología de las cepas aisladas*

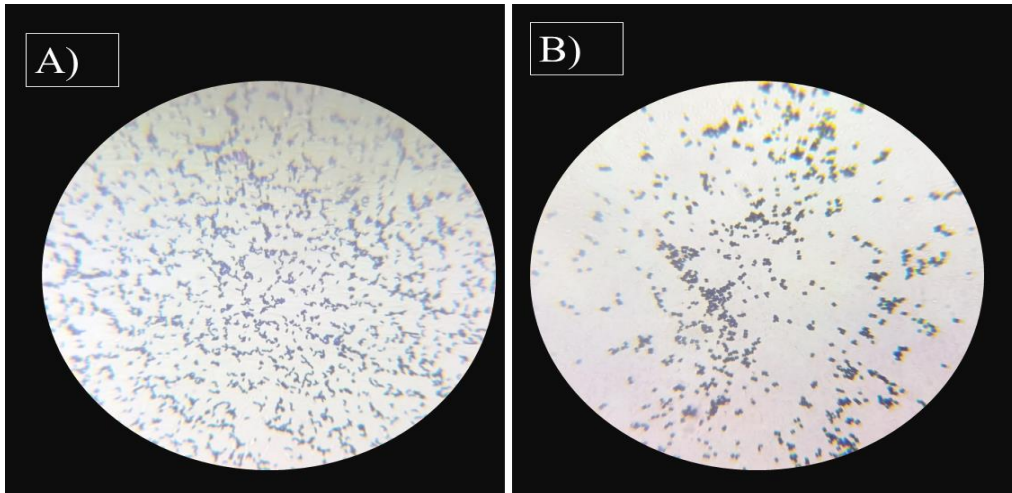




### Anexo 3. Tinción de Gram

#### Figura 9.

##### *Tinción de Gram*

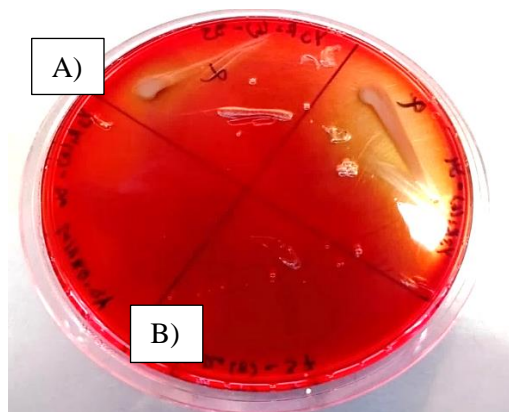


*Nota.* A) Morfología varilla o bacilo, B) Morfología cocos con una visualización de 100x

### Anexo 4. Prueba de Hemólisis

#### Figura 10.

##### *Prueba de Hemólisis*



A)  $\alpha$ -hemólisis posee una zona verde alrededor de las colonias, B)  $\gamma$ -hemólisis no se visualiza ningún halo alrededor de las colonias.

**Anexo 5.** Prueba de rojo Congo y Hemolisis

**Tabla 12.**

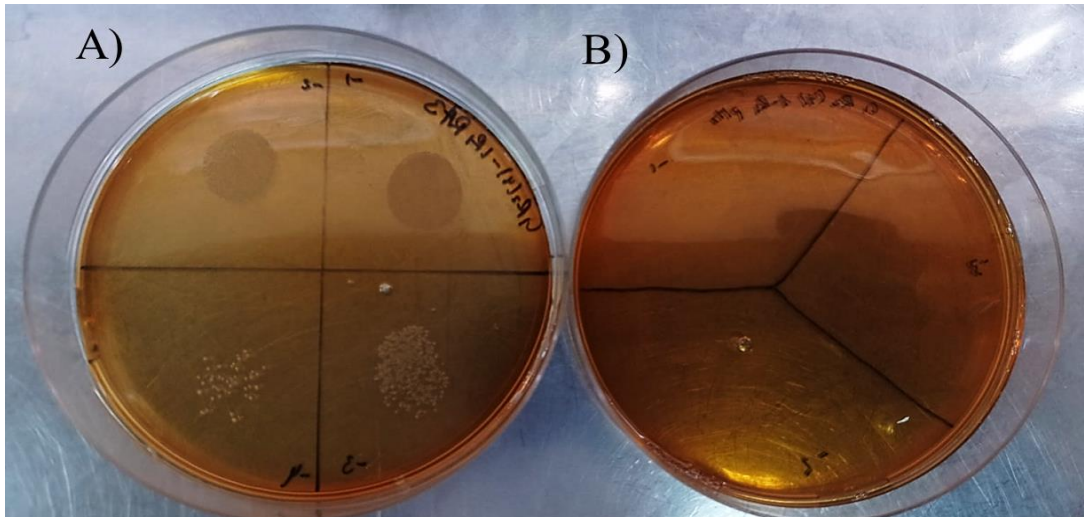
*Prueba de rojo Congo y Hemolisis*

<b>Banco de cepas</b>	<b>Rojo congo</b>	<b>Hemólisis</b>	<b>Banco de cepas</b>	<b>Rojo congo</b>	<b>Hemólisis</b>
Y1R2(5)-1	+	Gama	C1R2(4)-5	+	Gama
Y1R1(5)-2	+	Gama	C1R2(4)-6	+	Gama
Y1R1(5)-3	+	Gama	C1R2(4)-7	+	Gama
Y1R1(5)-4	+	Gama	C1R2(4)-8	+	Gama
Y1R1(5)-5	+	Gama	C1R2(4)-9	+	Gama
Y1R1(5)-6	+	Gama	C1R2(4)-10	+	Gama
Y1R1(5)-7	+	Gama	C1R2(4)-11	+	Gama
Y1R1(5)-8	+	Gama	C1R2(4)-13	+	Gama
Y2R1(6)-10	+	Gama	C1R2(4)-14	+	Gama
Y2R1(7)-11	+	Gama	C1R2(4)-16	+	Gama
Y2R1(7)-12	+	Gama	C1R2(4)-17	+	Gama
Y2R1(7)-13	+	Gama	C1R2(4)-18	+	Gama
Y2R1(7)-14	+	Beta	C1R2(4)-19	+	Alfa
Y2R2(7)-15	+	Gama	C3R2(6)-21	+	Gama
Y2R2(7)-16	+	Gama	C1R2(4)-20	+	Gama
Y2R2(7)-18	+	Gama	C1R2(4)-24	+	Alfa
Y2R2(7)-19	+	Gama	C1R2(4)-22	+	Alfa
Y2R2(8)-20	+	Gama	C1R2(4)-23	+	Gama
Y2R2(8)-21	+	Gama	C1R2(4)-25	+	Alfa
Y2R2(6)-29	+	Gama	C1R2(4)-26	+	Gama
Y2R2(8)-37	+	Gama	C1R2(4)-27	+	Gama
Y3R2(6)-30	+	Alfa	C1R2(4)-28	+	Gama
Y3R1(6)-31	+	Alfa	C1R2(4)-29	+	Gama
Y3R2(6)-32	+	Gama	C1R2(4)-30	-	Alfa
Y3R2(6)-33	+	Gama	C3R1(5)-32	+	Gama
Y3R2(6)-34	+	Alfa	C3R1(6)-33	-	Gama
Y3R2(6)-35	+	Alfa	VH1(1)-1	+	Gama
Y3R1(7)-36	+	Gama	VH1(1)-2	+	Gama
C1R2(4)-1	+	Gama	VH1(1)-3	-	Alfa
C1R2(4)-2	+	Gama	VH1(1)-4	+	Gama
C1R2(4)-3	+	Gama	VH1(1)-5	+	Alfa
C1R2(4)-4	+	Gama			

**Anexo 6.** Tolerancia a pH bajos

**Figura 11.**

*Tolerancia a pH bajos*

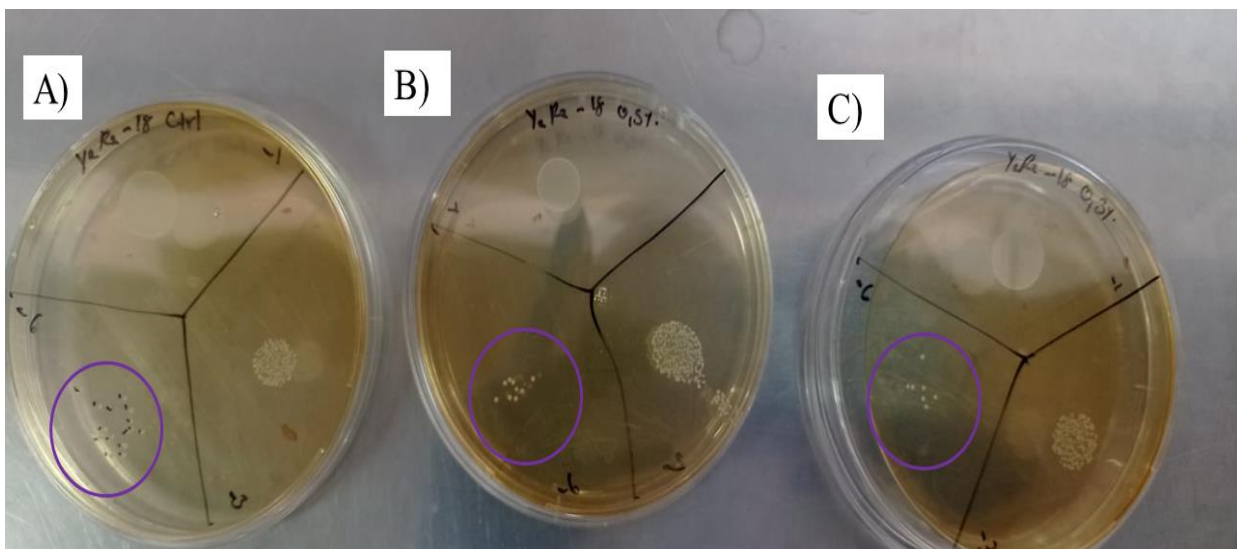


**Nota.** A) crecimiento de la bacteria en pH 3, B) No presenta crecimiento al pH 3

**Anexo 7.** Tolerancia a sales biliares

**Figura 12.**

*Tolerancia a sales biliares*



**Nota.** A) Control de la cepa sin sales biliares tiene mayor crecimiento, B) Cepas con 0.5% de sales biliares, C) Cepas con 0.3% de sales biliares.

**Anexo 8.** Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

**Figura 13.**

*Prueba de susceptibilidad a los antibióticos*

