



UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ
EXTENSIÓN CHONE

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
INGENIERO AGROPECUARIO

TÍTULO:

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE
POLIMERASAS (PCR) DEL *Lactobacillus gasseri* EN HEMBRAS BOVINAS”**

AUTOR:

VISMAR STALIN CONFORME BURGOS

TUTOR:

MVZ LIMBERG ZAMBRANO PINARGOTE, Mgs.

CHONE-MANABÍ-ECUADOR

2018

MVZ Limberg Iván Zambrano Pinargote, Docente de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí Extensión Chone, en calidad de Director del Trabajo de Titulación,

CERTIFICO:

Que el presente TRABAJO DE TITULACIÓN titulado: “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASAS (PCR) DEL *Lactobacillus gasseri* EN HEMBRAS BOVINAS**” ha sido exhaustivamente revisado en varias sesiones de trabajo, se encuentra listo para su presentación y apto para su defensa.

Las opiniones y conceptos vertidos en este trabajo de titulación son fruto del trabajo, perseverancia y originalidad de su autor: **VISMARK STALIN CONFORME BURGOS**, siendo de su exclusiva responsabilidad.

MVZ Limberg Zambrano
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

La responsabilidad de las opiniones, investigaciones, resultados, conclusiones y recomendaciones presentados en este Trabajo de Titulación, es exclusividad de su autor.

Chone, Febrero del 2018

VISMAR STALIN CONFORME BURGOS
AUTOR



UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ
EXTENSIÓN CHONE

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

INGENIERO AGROPECUARIO

Los miembros del tribunal Examinador aprueban el informe de investigación, sobre el tema: “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASAS (PCR) DEL *Lactobacillus gasseri* EN HEMBRAS BOVINAS**” elaborado por el egresado de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria.

Chone, Febrero 2018

.....
Ing. Odilón Schnabel Delgado

DECANO

.....
Dr. Limberg Zambrano Pinargote

DIRECTOR DE TESIS

.....
MVZ Gabriela Farías

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Ing. Luvy Loor

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Lcda. Fátima Saldarriaga

SECRETARIA

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios quien me ha dado vida, salud y fuerzas para seguir adelante, guiarme en mis estudios, no desmayar en los obstáculos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A mis padres Stalin y Alexandra, a mis hermanos Fabiola, Albania y Stiven, a mis sobrinitos Marquitos y Erick, que siempre estuvieron apoyándome con sus palabras de aliento, consejos y ayuda en los momentos más difíciles.

Vismark

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida que me ha dado, porque ha sido parte fundamental en mi vida como ser humano, hijo, estudiante, y en esta nueva fase como profesional.

A mis padres, hermanos, sobrinitos, familiares y amistades por apoyarme y estar siempre brindándome apoyo con consejos.

A los catedráticos MVZ Galo Martínez y MVZ Limberg Zambrano, por aportar mucho al haberme impartido sus conocimientos científicos, del campo laboral y por la paciencia que tuvieron al guiarme durante el proceso del desarrollo de esta investigación, mi agradecimiento también a los ganaderos que prestaron sus hatos para trabajar con sus animales.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí Extensión Chone por haberme acogido como alumno, a los docentes, a los compañeros de los cinco años de estudio, a los administrativos, muchas gracias a todos.

Vismark

RESUMEN

A partir de las muestras tomadas en la vagina a 249 hembras bovinas de distintos predios de las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsachilas, se hizo el aislamiento de *Lactobacilos spp.*, con el objetivo de encontrar *Lactobacillus gasseri*, encontrándose *Lactobacillus spp* en el 3,61% de las hembras bovinas mientras que solo se encontró *Lactobacillus gasseri* en el 0,40% del total de las muestras tomadas. En el proceso de toma de muestras por hisopado vaginal se tomó en cuenta el moco vaginal porque su textura está relacionada con infecciones bacterianas y por lo tanto la ausencia o presencia de *Lactobacillus gasseri*. Es posible hacer aislamiento de la bacteria *Lactobacillus gasseri* y hacer la reacción en cadena de polimerasas PCR, lo que confirmó la pureza de la bacteria de las muestras de *Lactobacillus spp*.

Palabras clave: Vacas, Lactobacilos, aislamiento, Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR).

SUMMARY

From the samples taken in the vagina to 249 bovine females from different farms of the provinces of Manabí and Santo Domingo de los Tsachilas, *Lactobacillus spp.* Was isolated, with the objective of finding *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus spp.* Being found in the 3.61% of the bovine females while only *Lactobacillus gasseri* was found in 0.40% of the total samples taken. Vaginal swab was taken into account in the process of sampling by vaginal swab because its texture is related to bacterial infections and therefore the absence or presence of *Lactobacillus gasseri*. It is possible to isolate the bacterium *Lactobacillus gasseri* and make the chain reaction of PCR polymerases, which confirmed the purity of the bacterium from the *Lactobacillus spp.*

Key words: Cows, *Lactobacilli*, isolation, Polymerase Chain Reaction (PCR).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	4
1. Estado del arte	4
1.1. Microorganismos Probióticos	4
1.2. Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	5
1.2.1. Bacterias del género lactobacillus.....	6
1.2.2. Características de la familia lactobacillae	7
1.2.3. Pared celular y ultra estructura	7
1.2.4. Taxonomía.....	8
a) Grupo I (Termobacterias representativas y nuevas especies descritas): Lactobacilos homofermentativos obligados.....	8
b) Grupo II (Estreptobacterias típicas y nuevas especies descritas): Lactobacilos heterofermentativos facultativos	9
c) Grupo III (Betabacterias características y nuevas especies descritas): Lactobacilos heterofermentativos obligados.....	9
1.3. <i>Lactobacillus gasseri</i>	10
1.3.1. Bacteriocinas.....	11
1.3.2. Gasericina A.....	12
1.4. Estudio del moco vaginal.....	14
1.5. Reacción en cadena de polimerasas (PCR).....	15
CAPÍTULO II	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Ubicación	15
2.2. Unidad de estudio	16
2.3. Tipo de investigación.....	16
2.3.1. Investigación descriptiva.....	16
2.3.2. Investigación explicativa	16
2.4. Metodología	17
2.4.1. Métodos	17

2.4.2. Inductivo.....	17
2.4.3. Deductivo.....	17
2.5. Materiales	18
Tabla 1: Materiales que se usaron en la investigación.	18
2.6. Técnicas.....	20
2.6.1. Parte 1.....	20
2.6.2. Parte 2.....	20
2.6.3. Parte 3.....	21
2.6.4. Parte 4.....	21
2.7. Variables a medir	22
CAPÍTULO III	23
3. PROPUESTA.....	23
3.1. Tema.....	23
3.2. Fundamentación	23
3.3 Objetivo	23
CAPÍTULO IV.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Realizar un estudio del arte de <i>Lactobacillus gasseri</i> y sus ventajas como bacteria probiótica.	24
4.2. Establecimiento de la presencia de <i>Lactobacillus gasseri</i> en el canal vaginal de hembras bovinas mediante la reacción en cadena de polimerasas (PCR).....	25
4.3. Determinación del grado de presencia de endometritis subclínica en hembras bovinas correlacionando la existencia de <i>Lactobacillus spp.</i> y <i>Lactobacillus gasseri</i> respecto al grado de moco vaginal.	25
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES.....	27
ANEXOS	28

INTRODUCCIÓN

Hace ya varios años ha resurgido el interés por curar las enfermedades con productos naturales, ya sean estos insumos vegetales o microorganismos, en caso de los últimos se han hecho múltiples investigaciones, descubriendo que en la microbiota existen organismos patógenos y otra parte de la misma son beneficiosos o neutros para el organismo humano y animal. Los medicamentos a base de microorganismos se preparan solos o en complemento, a los que se les llama probióticos.

A la vagina de las hembras bovinas la colonizan una gran cantidad de bacterias por ser el lugar más expuesto del aparato reproductivo, (Sanchez *et al.*, 2011), se pueden encontrar bacterias Gram positivas y Gram negativas (Biberstein & Chung, 1990), en la primeras se encuentran *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, y *Enterococcus spp.*; entre las Gram negativas están las *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, y *Prevotella spp.* Además en la vagina existen bacilos esporoformadores y ácido-alcohol resistentes (Palmer, 2008) de los bacilos están los del género *Clostridium spp.*, como ácido-alcohol están *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium-Actinomyces pyogenes* (Gilbert *et al.*, 2005).

En el tracto gastrointestinal (GI), la boca y el tracto reproductor tanto de animales como en humanos se encuentra normalmente los *Lactobacillus spp.* que son bacterias Gram-positivas de forma bacilar, no creadoras de esporas y forman parte esencial de la microbiota (Cannon *et al.*, 2005). Una de las funciones de los *Lactobacillus spp.* es que poseen una actividad bioconservadora, antimicrobiana y probiótica (Rondón *et al.*, 2008).

“Las especies de *Lactobacillus* spp. que generalmente se aíslan del tracto GI son: *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. salivarius*” (Slover and Danziger, 2008).

En entornos difíciles para la supervivencia de algunas bacterias los *Lactobacillus* spp. pueden desarrollarse de forma natural, sin importar la variación del pH, sean altos o bajos en rangos de 3.2 a 9.6, aunque lo habitual es encontrar *Lactobacillus* spp. en pH entre 4 a 4.5.

La presencia de *lactobacillus* spp. en el tracto reproductor bovino aumenta el interés de usarlos como prebióticos contra infecciones, ya que estos pueden impedir el desarrollo de patógenos de distintas formas, incluyendo el rechazo competitivo de los patógenos de la superficie celular (Pandey *et al.*, 2013).

Al desarrollar esta investigación se siguió un orden lógico que se inició con la Introducción, Tema, Problema y el Objetivo de la investigación que busca aislar e identificar mediante la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) la presencia de *Lactobacillus gasseri* (Lg) en el canal vaginal de hembras bovinas.

Las muestras se tomaron en distintos predios: en Chone en el Km 10 de la vía Colorado-Balzar, Hda. Vera del Ing. Pedro Vera; en Flavio Alfaro en el sitio Máscara, Finca La Ricardo, propiedad del Sr. José Guido Cedeño; en Marcos en la vía Marcos-Novillo, finca del Dr. Roberti Mejía; en Zapallo en el sitio Arenillas, finca de la Lic. Mercedes Cedeño; en Convento, sitio Cañales en la finca del Sr. Stalin Conforme; y en Santo Domingo en la finca del MVZ. Galo Martínez Cepeda, se procesaron en el laboratorio Microbiológico de La Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí Extensión Chone para hacer el aislamiento de bacterias y los análisis PCR se realizaron en el laboratorio de AGROCALIDAD, en la ciudad de Quito.

En el capítulo I se desarrollaron los temas y subtemas de acuerdo con las variables de esta investigación a partir de las bibliografías compiladas. En el capítulo II se explican materiales y métodos, ubicación, unidad de estudio, tipo de investigación. En el capítulo III se hace una propuesta para realizar la técnica de aislamiento de la bacteria *Lactobacillus gasseri*. En el capítulo IV se muestran los valores obtenidos en el aislamiento de la bacteria *Lactobacillus spp.* y sobre todo la bacteria *Lactobacillus gasseri*.

En las conclusiones y recomendaciones, se destaca que a partir de la presente investigación, se reveló que en la vagina de las hembras bovinas muestreadas existen *lactobacillus gasseri* en poco porcentaje por lo cual son más susceptibles a patologías como la endometritis subclínica.

CAPÍTULO I

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Microorganismos Probióticos

Un probiótico es un microorganismo vivo que tiene efectos beneficiosos en la salud del organismo que lo porta porque equilibra la microbiota (Fuler, 1989 mencionado por Kim *et al.*, 2006) que cuando se usa tienen capacidad para prevenir o tratar enfermedades gastrointestinales, ya que ellos son productores de ácido propiónico, acético y láctico logrando que el pH se reduzca dejando sin posibilidad de desarrollarse a las bacterias patógenas (Slover, and Danziger, 2008).

La mayoría de cepas de *Lactobacillus* son usados como probióticos, pertenecientes al *phylum Firmicutes*, clase Bacilli, orden Lactobacillales (Berger *et al.*, 2007), en el cuerpo humano y animal se pueden localizar *Lactobacillus spp.* en el intestino, cavidad oral, leche y vagina. Supera el 70% de la microbiota en el tracto vaginal, actuando como protectoras de la mucosa por medio de la adherencia al epitelio, además producen agentes antimicrobianos, se han aislados cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. gallinarum*, *L. amyliovorus*, *L. johnsonii*, *L. jensenii* y *L. iners* (Anukam, *et al.*, 2005).

Antes de emplear a los lactobacilos, hay que realizar la correcta selección de las cepas siguiendo los procesos adecuados, para que las bacterias estén viables para ser usadas, la selección de cepas debe ser procesada con el mayor cuidado para que el probiótico tenga éxito y que tenga la capacidad de adaptarse a la mucosa. Entre los probióticos más investigados están los lactobacillus, los que inicialmente se han utilizado en productos y subproductos lácteos, habiéndoles

dado la consideración de organismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros), además en la farmacéutica también se pueden usar (Kim *et al.*, 2006).

En la microbiota intestinal es habitual que estén presentes lactobacilos, ellos desempeñan un rol de gran importancia en la fisiología humana porque son neutras o beneficiosas (Chang *et al.*, 2009).

1.2. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Son bacterias que agrupan algunos géneros de caracteres fisiológicos, metabólicos y morfológicos en común, generalmente dichas bacterias son bacilos o cocos Gram positivos, no esporulados, anaerobios, no móviles, aerotolerantes o microaerófilos; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, no reducen el nitrato a nitrito, no tienen citocromo y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además son ácido-tolerantes que logran crecer en rangos de pH bajo como 3.2, así como también en pH alto de 9.6, lo común es que crezcan en pH de 4 a 4.5, lo que hace que sobrevivan en medios que otras bacterias no resisten la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramirez *et al.*, 2011).

Producen ácido láctico y acético, es posible que produzcan sustancias inhibitoras como: peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina (b-hidroxipropionaldehído) y bacteriocinas, las que son producidas ribosomalmente en forma de proteínas o polipéptidos precursores, los que estando activos hacen un efecto antibacterial contra un espectro limitado de bacterias estrechamente relacionadas (Jack *et al.*, 1995).

Las bacterias ácido lácticas (BAL), ejercen un efecto antimicrobiano produciendo antibióticos y antimetabolitos para ciertos microorganismos, estas sustancias son: acidofilinas, toxinas destructoras de levaduras, nicinas y bacteriocinas (Vanbelle *et al.*, 1989). Entre la gran variedad de propiedades de los *Lactobacillus* se destaca que emiten sustancias antimicrobianas inhibidoras del crecimiento de microorganismos “in vivo” (Davidson and Hoover, 1993), dichos componentes antimicrobianos no son ni microcinas ni ácidos formados por bacterias ácido-lácticas, por lo que no son activos contra otros *Lactobacillus* (Silva *et al.*, 1987).

1.2.1. Bacterias del género lactobacillus

El género *Lactobacillus* pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, pueden existir bacilos cortos o largos, a veces se dividen como los bacilos en un plano, formando cadenas de forma ocasional y filamentos, equivocadamente mencionados como ramificados.

Los *Lactobacillus* – lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos – se conocen por que se presentan como bacilos largos y extendidos, aunque es común encontrar bacillus cortos denominados también coco-bacilos coryneformes (Kandler, and Weiss, 1992) por lo que se los confunde con géneros aislados en materiales clínicos (Marin *et al.*, 1993).

Generalmente se los encuentra formando cadenas no mótils, no esporulan, en caso que sean mótils es porque tienen flagelación peritríca, son Gram positivos, las células muertas pueden dar múltiples resultados distintos a la tinción de Gram, los bacilos homofermentativos grandes tienen gránulos internos mostrados por tinción azul de metileno o por la tinción de Gram (Rondón *et al.*, 2008).

1.2.2. Características de la familia lactobacillae

Los lactobacilos generalmente son bacterias que no tienen motilidad, aunque pueden hacerlo. Las especies móviles tienen flagelación peritrica. Son Gram positivas, producen pocos pigmentos, pocas especies producen colores rojo o pardo, naranja, amarillo. La capacidad de adhesión y producción de sustancias antagonistas contra los patógenos son características de los lactobacilos en la vagina humana y animal (Lepargneur y Rousseau 2002, citados por Otero *et al.*, 2006).

Tienen propiedades que hacen que los lactobacilos pueden ayudar a prevenir patologías infecciosas, una de ellas es la producción de antimicrobianos de bajo peso molecular a los que se conoce como bacteriocinas (Sablon *et al.*, 2000). Es importante medir la capacidad de inhibir el crecimiento de distintos microorganismos perjudiciales en especies de interés zootécnico (Reis *et al.*, 2012), dicho proceso lo hace por medio de algunos mecanismos como: producir ácido láctico y otros ácidos orgánicos que hacen que baje el pH del medio; generan biocinas que atacan varias zonas de la pared celular de microorganismos patógenos, además producen sustancias antagónicas como peróxido de hidrógeno, acetaldehído, diacetilo y compuestos no proteicos de bajo peso molecular, compiten por espacio en el medio donde están alojados (Alfaro-Sanabria, 2007).

1.2.3. Pared celular y ultra estructura

Al observar al microscopio electrónico la pared de las células de lactobacilos es Gram positiva, la conforman peptidoglicanos (mureínas) de diferentes quimiotipos, por lo cual es muy común encontrar al peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina, además existen polisacáridos en la pared que están unidos al peptidoglicano con enlaces fosfodiéster, sin embargo representa solamente ácidos teicoicos relacionados a la membrana en algunas especies, los grandes mesosomas que caracterizan al género se pueden ver en el microscopio (Samaniego Fernández & Sosa del Castillo, s.f.).

1.2.4. Taxonomía

Con la ayuda de la biología molecular se ha logrado clasificar criterios de la taxonomía para definir al género *Lactobacillus*, especialmente a las bacterias ácido lácticas, entre los criterios están los siguientes:

- * Determinación de oligonucleótidos del coeficiente de sedimentación (16S) del rRNA (RNA ribosomal).
- * Estudios serológicos que involucran antisueros contra enzimas málicas, del tipo de la fructosa-1,6-difosfato aldolasa y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de varias bacterias ácido lácticas y de algunas bacterias aeróbicas y anaeróbicas.
- * Porcentaje molar de Guanina+Citocina del ADN.
- * Nivel de homología ADN/ADN, poco significativo entre la mayoría de las especies.
- * Hibridización ARN/ ADN. (Samaniego & Sosa del Castillo, s.f.).

Sin embargo, aún se precisa de estudios más profundos para determinar la estructura filogenética de este género, así como de los otros géneros integrantes de las BAL. Los lactobacilos se agrupan en tres grupos tradicionales establecidos por Orla-Jensen: termobacterias, estreptobacterias y betabacterias, pero sin tener en cuenta las temperaturas de crecimiento ni la morfología (Bergey, 1992 citado por Samaniego & Sosa del Castillo, s.f.); características clásicas de la clasificación de Orla-Jensen. De modo que, sus definiciones son las siguientes:

a) Grupo I (Termobacterias representativas y nuevas especies descritas): Lactobacilos homofermentativos obligados.

Fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía Embdn-Meyerhoff; las pentosas y gluconato no los fermentan. Se pueden encontrar especies y subespecies: *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*,

Lactobacillus amylovorus, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus crispatus*,
Lactobacillus farciminis, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*,
Lactobacillus jensenii, *Lactobacillus ruminis*, *L. salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*,
Lactobacillus vitulinus y *Lactobacillus yamanashiensis*.

**b) Grupo II (Streptobacterias típicas y nuevas especies descritas):
Lactobacilos heterofermentativos facultativos.**

Casi exclusivamente fermentan las hexosas a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff o, al menos por algunas especies, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo limitantes de glucosa. Tienen la propiedad también de fermentar las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por la vía de fosfoacetolasa inducible. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bavaricus*, *L. casei subsp. casei*, *L. casei subsp. pseudopantarum*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. casei subsp. tolerans*, *L. coryniformis subsp. coryniformis*, *L. coryniformis subsp. torquens*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus murinus*, *L. plantarum* y *Lactobacillus sake*.

**c) Grupo III (Betabacterias características y nuevas especies descritas):
Lactobacilos heterofermentativos obligados.**

Fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético 12 (etanol) y dióxido de Carbono (CO₂). Además fermentan las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. En general, ambas vías involucran a la fosfoacetolasa. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *Lactobacillus bif fermentans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fructosus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus*

reuteri, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus vaccinoferus* y *Lactobacillus viridescens* (Samaniego & Sosa del Castillo s.f.).

1.3. *Lactobacillus gasseri*

La bacteria Gram-positiva *Lactobacillus gasseri*, baja en citosina y guanina (GC), distinguida por ser una de los principales *Lactobacillus* homofermentativos del tracto gastrointestinal (TGI). Se cree que la mencionada cepa láctica es autóctona del TGI y se asocia con algunas funciones probióticas, entre ellas: adhesión a los tejidos intestinales, reducción de la actividad de las enzimas fecales mutagenicas, estimulación de producción de bacteriocidas y de macrófagos (Selle and Klaenhammer, 2013).

Son bacterias que normalmente existen en la microbiota de la cavidad oral, mucosa vaginal e intestinal. Se relaciona con la producción de bacteriocina (Lakshminarayanan *et al.*, 2013), la productora de gassericina A es *L.gasseri* LA39, una bacteriocina cíclica con amplio espectro inhibitorio (Ito *et al.*, 2009), son beneficiosas para el ser que los hospeda por que producen ácido láctico que reduce el pH, que al estar bajo, retrasa o disminuye el desarrollo de otras bacterias que son patógenas (Fernández *et al.*, 2006).

A los *Lactobacillus gasseri* (*Lg*) se los usa para prevenir algunas infecciones reproductivas en distintos animales además de los bovinos, se administra como probióticos (Otero *et al.*, 1998). En la industria alimentaria los *lactobacillus* se han empleado para fermentar alimentos comunes como yogourth, queso, encurtidos, masa fermentada para pan y chucrut (Hammes & Tichaczek., 1997).

La reducción del pH se debe a que la fermentación produjo ácido láctico, de esta manera no crecen bacterias putrefactivas y patógenas, ya que ellas no sobreviven en pH bajo, las bacterias productoras de ácido láctico causan mayor cantidad de vitaminas, aminoácidos esenciales y mayor biodisponibilidad de minerales, todo esto da más valor nutricional a dichos alimentos fermentados. Siendo así que la industria de la microbiología alimentaria ha investigado ampliamente con lactobacilos, concluyendo que estas bacterias son inocuas (Slover and Danziger, 2008).

1.3.1. Bacteriocinas

Los bacteriocinas son pequeñas proteínas generadas por bacterias que pueden ser tóxicas para otras bacterias (Tagg *et al.*, 1976). Producen antimicrobianos como defensinas, ácidos orgánicos (láctico y acético), bacteriocidas, ácidos grasos, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, son reconocidas como importantes en la fermentación alimentaria, ecología intestinal y conservación de alimentos (Klaenhammer, 1988; De Vuyst & Leroy, 2007). Existen otras bacteriocinas que son antagonistas con especies estrechamente relacionadas y contra especies de los géneros *Listeria* y *Enterococcus*. La nicina es activa contra un grupo amplio de bacterias Gram positivas como *Clostridium botulinum* y las esporas que emite (Hurst, 1981 citado por Stiles, 1996).

El impacto de la producción de bacteriocidas es motivo de estudios que evidencian la capacidad de competir contra las bacterias patógenas en el TGI, además de influir positivamente en la salud del hospedero (Corr *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2008). Por lo que la producción de bacteriocidas se puede considerar como un importante factor de la acción. Pudiendo las bacteriocinas actuar como péptidos colorantes, lo que hace que el probiótico sea capaz de competir con la microbiota

que reside en el área; de esta manera eliminan patógenos, pep-mareas, sirven como péptidos señal, que señalan a otras bacterias o el sistema inmune (Dobson *et al.*, 2012).

1.3.2. Gasericina A

Se trata de proteínas verdaderas de disposición tridimensional bien doblada, se generan a través de la traducción de genes, que están formadas de estructuras secundarias bien definidas y conservadas. Las mismas que tienen estructuras secundarias conservadoras y bien definidas. Se diferencia con las proteínas convencionales es que las proteínas precursoras codificadas por el gen deben ser modificadas pos tradicionalmente para unirse a los extremos N y C, generando un círculo transparente de enlaces peptídicos. La reticulación de los extremos de una cadena disminuye la entropía conformacional de los polipéptidos lineales altamente flexibles y desordenados, estabilizando su conformación bioactiva y aumentando la resistencia a la proteólisis debido a la falta de sitios de escisión de exopeptidasa (Sanchez-Hidalgo *et al*, 2007).

Los microorganismos que defienden, señalan y median las competiciones microbianas en el organismo que los hospeda, producen una cantidad grande de moléculas de proteínas. Últimamente se han encontrado algunas proteínas circulares de origen natural, básicamente diferentes a los péptidos cíclicos no ribosómicos (Trabi & Craik, 2002).

Se han clasificado en cuatro clases a las bacteriocinas: las circulares que se agruparon anteriormente entre los cuatro grupos de bacteriocinas, se han propuesto recientemente para ser convertidas en otra clase distinta, pasando a ser bacteriocinas de clase V. Son moléculas especiales, cuyos precursores deben ser

modificados post-traslacional para unirse al NtoCtermini con un enlace peptídico de cabeza a cola. La ciclización parece hacerlos menos susceptibles a la escisión proteolítica, a alta temperatura y pH, y, por lo tanto, proporciona una estabilidad mejorada en comparación con bacteriocinas lineales. Las ventajas de la circularización también se reflejan en el hecho de que un número significativo de productos naturales macrocíclicos han encontrado aplicaciones farmacéuticas (Pandey *et al.*, 2013).

Otra característica común de la mayoría de las proteínas circulares es su fuerte actividad biológica (acción antibacteriana, antiviral o farmacológica). Por lo tanto, su interés biotecnológico ha aumentado en los últimos años, convirtiéndose en una línea principal de investigación (Trabi y Craik 2002; Craik y otros 2003; Rivas y Andreu 2003).

Desde hace poco tiempo se investiga y se conoce a este tipo de proteínas, inclusive hasta la fecha existen pocas bacteriocinas circulares de un grupo diverso de organismos Gram positivos identificadas. La enterocina AS-48, producida por *Enterococcus faecalis* AS-48 fue la primera en presentarse como ejemplo. La *Gassereccin A* producida por *Lactobacillus gasseri* LA39, la *Reutericina 6* producida por *Lactobacillus reuteri* LA6 y la *Circularina A*, producida por *Clostridium beijerinickii* ATCC 25752, son otros ejemplos de este grupo de péptidos antimicrobianos. *Gassericin* puede ser una herramienta importante en la conservación de alimentos debido a sus propiedades de alto pH y tolerancia a la temperatura y el hecho de que es producida por *Lactobacillus gasseri*, cuyas muchas cepas son probióticas.

Los ciclótidos son un grupo de proteínas ribosómicas sintetizadas en plantas pertenecientes a familias de Rubiaceae, Violaceae y Cucurbitaceae (Craik *et al.*, 2006). Su importancia se revela por el hecho de que son anti-HIV (Gustafson *et al.*, 1994 citado por Pandey, 2013; Chang *et al.*, 2009) insecticidas, antitumorales, antiincrustantes, *antimicrobianos* y también actúan como antagonistas de la neurotensina (Witherup *et al.*, 1994 citado por Pandey, 2013). El inhibidor de tripsina de girasol (SFTI-I) es otro grupo de proteína circular que se encuentra en

semillas de girasol. La proteína circular encontrada en mamíferos es la defensa de Rhesus theta (Tang et al., 1999; Selsted 2004 citados por Pandey, 2013). La RTD-1 es parte del sistema inmune innato del mono macaco y tiene acción microbicida contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, y también tiene actividad anti-retroviral. (Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2007).

1.4. Estudio del moco vaginal

Los hatos bovinos tienen continuas pérdidas económicas por la falla de las vacas lecheras para quedar gestantes, estas fallas se deben a múltiples factores, entre ellos la composición del moco cervical (MC), según la fase lútea que estas atraviesen cambia la secreción endometrial y sobre todo si dicha fase se extiende debido a infecciones uterinas (Sheldon *et al.*, 2009), por lo que es relevante diagnosticar y tratar la enfermedad uterina rápida y eficazmente. El examen del contenido de la vagina para la presencia de pus es el método más útil para el diagnóstico de la endometritis subclínica (ES). Se debe observar la consistencia y olor del moco vaginal y este puntaje de endometritis se correlaciona con la densidad de crecimiento de las bacterias patógenas en el útero y es un pronóstico para el éxito probable del tratamiento (Sheldon & Dobson, 2004).

Sheldon *et al.*, (2009) clasificaron el color y contextura del moco de la siguiente manera: A) El carácter de moco vaginal:

0 = Moco transparente o translúcido;

1 = Moco que contiene manchas de pus blanco o blanquecino;

2 = Exudado que contiene <50% de material mucopurulento blanco o no blanco; Y

3 = Exudado que contiene > 50% de material purulento, usualmente blanco o amarillo, pero ocasionalmente sanguíneo (Sheldon *et al.*, 2006).

B) Los grados de endometritis reflejan el número de bacterias patógenas pero no oportunistas no patógenas aisladas del útero del ganado (Williams *et al.*, 2005). Los datos se presentan como puntajes semicuantitativos del número de unidades

formadoras de colonias (CFU) a partir de hisopos uterinos, donde la puntuación UFC 0 = no crecimiento; 1 = & lt; 10 CFU; 2 = 10 a 100 CFU; 3 = 101 a 500 CFU; Y 4 => 500 CFU.

1.5. Reacción en cadena de polimerasas (PCR)

En 1985 Kary Mulis, premio Nobel de Química en 1993, inventó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que durante varios ciclos repetidos hace reaccionar enzimas in vitro amplificando millones de veces una secuencia específica de ADN copiando fielmente la secuencia blanco. La técnica sintetiza varias veces el fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, que se hace con la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en altas temperaturas (79° C a 85° C), por eso su nombre comercial: taq polimerasa.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

El trabajo investigativo se desarrolló en la Hda. Vera en el sitio San Lorenzo de la parroquia Boyacá, Km 10 de la vía Colorado – Balzar, propiedad del Ing. Pedro Alejandro Vera; en la finca Stalin, situada en el sitio Cañales, Convento, propiedad del Sr. Stalin Conforme; Sto. Domingo; en la finca La Ricardo, sitio Mascara, Km 4 de la vía Flavio – Máscara, propiedad de la Lic. Mercedes Cedeño; En la finca “Lara” propiedad del Dr. Roberti Mejía, situada en el Km 1 de la vía Marcos – Novillo del sitio Marcos de Flavio Alfaro, y la finca “Las Arenas” en la Parroquia Zapallo, propiedad de la Lic. Mercedes Cedeño.

2.2. Unidad de estudio

Se utilizaron 249 vacas mestizas, las cuales estaban en buena condición corporal, se sometieron a la técnica de hisopado vaginal; cada una de ellas representa una unidad experimental.

2.3. Tipo de investigación

La presente investigación fue de tipo: descriptivo y explicativo.

2.3.1. Investigación descriptiva

Este tipo de investigación tiene como objetivo conocer las costumbres, situaciones y actitudes que dominan en la descripción exacta de actividades, procesos y objetos del aislamiento de la bacteria *Lactobacillus gasseri*, además de recolectar datos se hace identificación y predicción de las relaciones existentes entre las variables. El investigador compiló datos no solo para tabular, además utilizó la información para exponer, resumir y trabajar sobre la base de la hipótesis con cuidado al analizar minuciosamente los resultados, con la finalidad de contribuir al conocimiento con datos significativos.

Se anexó la información de los resultados obtenidos, explicando los resultados investigados, los mismos que se hicieron en el Laboratorio de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí Extensión Chone y en el Laboratorio de AGROCALIDAD de Quito.

2.3.2. Investigación explicativa

Este tipo de investigación busca responder como aislar el *lactobacillus gasseri*, bacterias beneficiosas al hospedante por ser antagonistas de las bacterias patógenas.

2.4. Metodología

La metodología utilizada fue de medición, ya que solo determinó como aislar *Lactobacillus gasseri*.

2.4.1. Métodos

Los métodos utilizados para el desarrollo de la investigación fueron: Inductivo y Deductivo.

2.4.2. Inductivo

Se usó el método inductivo porque se obtuvieron conclusiones generales a partir de las premisas particulares. Es la metodología más usual caracterizada por cuatro etapas básicas: registro de todos los hechos, la observación, la clasificación de las acciones y el análisis, generalización inductiva a partir de los hechos y la contrastación. A través de la primera observación, análisis y la clasificación, se deduce a una hipótesis que soluciona el problema planteado.

2.4.3. Deductivo

El método deductivo es un método científico que considera que la conclusión está implícita en las premisas; ósea, que las conclusiones se derivan de acuerdo a las cepas de lactobacilos encontrados y al estado del moco vaginal.

Por lo tanto, supone que las conclusiones siguen necesariamente a las premisas: si el razonamiento deductivo es válido y las premisas son verdaderas, la conclusión solo puede ser verdadera.

2.5. Materiales

Tabla 1: Materiales que se usaron en la investigación.

MATERIALES	TOTAL
Hisopos vaginales	300
Guantes de manejo	4 cajas
Guantes obstétricos	2cajas
Gel obstétrico	4 litros
Bolígrafo	4
Hisopos vaginales	300
Libreta de apuntes	1
Hojas de registro	14
Jarra incubadora	2
Alcohol	1 litro
Algodón	1kg
Toallas desechables	10 rollos
Tubos de ensayo	300
Caldo MRS	600gr
Agar MRS	300gr
Gel refrigerante	4 litros
Mandil	2
Botas de caucho	1
Cooler conservador	1

Gradillas	4
Agua destilada	30 litros
Cajas Petri	150
Kit de tinción de Gram	1
Portaobjetos	300
Sobres de microbiology anaerobic	24
Azas	2
Cinta de papel	2
Flameador	1
Marcador graso	1
Balanza	1
Microscópio	4
Incubadora	1
Estufa	1
Cabina de flujo laminar	1
Centrífuga	1
Estufa	1
Autoclave	1
Papel aluminio	1

2.6. Técnicas

2.6.1. Parte 1

Antes de cada toma de muestra se preparaba 250 ml de caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), cuyo uso es para el aislamiento y cultivo de especies de *Lactobacillus*. En cada tubo de ensayo se colocó 3 ml del caldo MRS para la conservación de la muestra tomada (anexo1, fotos 1 y 2). Así mismo se dejaron preparadas las cajas Petri con 20 ml de agar MRS para hacer el sembrado bacteriano (anexo 1, foto 3), tubos con 1ml de agua destilada par el aislamiento de las bacterias, portaobjetos para hacer el aislamiento y tinción necesarios para poder observar al microscópio, todo esto se esterilizaba en el autoclave 15 minutos a una temperatura de 120° C para que existiese una asepsia adecuada, evitar la contaminación cruzada y por lo tanto el crecimiento bacteriológico sea únicamente de la muestra vaginal.

Ya en el hato se lavó y secó el área perineal de la hembra bovina (anexo 1, foto 4), para realizar la técnica de hisopo cubierto, se tomaron las medidas de bioseguridad para el operario y el animal, usando un guante obstétrico se introdujo la mano por la vulva, dentro del puño se llevó el hisopo de 15 cm hasta llegar a fondo de vagina (anexo 1, foto 5), una vez allí se sacaba el hisopo y se hizo un giro circular para hisopar uniformemente, se cubrió con la mano la muestra y después se retiró la mano, se colocó en el tubo que contiene caldo MRS el cual servirá como medio de transporte y cultivo (anexo 1, fotos 6 y 7).

2.6.2. Parte 2

Se evaluó el moco vaginal presente en el momento del hisopado, el mismo se categorizó utilizando los grados descritos por Sheldon, *et al.*, (2006), (anexo 2, figura 1).

Grado 0: Limpio traslúcido.

Grado 1: Mucosidad que contiene motas blancas u opacas.

Grado 2: Descarga que contiene material mucopurulento blanco en 50%.

Grado 3: Descarga 50% de material purulento blanco o amarillento.

2.6.3. Parte 3

En el laboratorio se identificaron con un marcador graso los tubos con la muestra (anexo 1, fotos 8 y 9), luego se colocaron en la jarra de incubación (anexo 1, foto 10) para guardar en la incubadora a 37 C° (anexo 1, foto 11), durante 18 horas. Al segundo día en la cámara de flujo laminar se realizó el sembrado en cajas petri marcadas con los códigos identificativos que las vacas (anexo 1, foto 13), se guardaron en la jarra de incubar con el sobre microbiológico anaeróbico (anexo 1, foto 14), se sellaba la jarra con film transparente para evitar la entrada de aire, se marcaba con fecha y hora y luego se procedió a guardar para el desarrollo de las bacterias a 37 C° en la incubadora durante 18 horas (anexo 1, foto 15).

Al retirar de la incubadora las cajas Petri se hace la observación (anexo 1, foto 16), acto seguido se llevaron a la cámara de flujo laminar, se procedió a aislar bacterias, usando el asa se tomó una colonia (anexo 1, foto 17) y se aisló la bacteria en un tubo de ensayo con agua estéril (anexo 1, foto 18) y se colocó en un portaobjeto previamente marcado (anexo 1, foto 19), se hizo el fijado, luego se realizó la tinción de Gram (anexo 1, foto 20), se dejó secar y luego se procedió a leer en el microscopio (anexo 1, foto 21).

2.6.4. Parte 4

El procedimiento de la reacción en cadena de polimerasas PCR se realizó en el laboratorio de La Agencia De Regulación y Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD.

2.7. Variables a medir

Tabla 2: En la tabla se analiza las variables a medir.

	Moco Vaginal				PCR	
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Presencia	Ausencia
Animal 1						
Animal 2						
Animal n						

CAPÍTULO III

3. PROPUESTA

3.1. Tema

“Determinación de la presencia de *Lactobacillus gasseri* en hembras bovinas por medio del aislamiento y reacción en cadenas de polimerasas (PCR)”

3.2. Fundamentación

El aislamiento de bacterias del canal vaginal de hembras bovinas es importante para que el productor pueda conocer el estado sanitario de la vaca al ver si la microbiota del tracto reproductor esta equilibrada por la presencia de dicha bacteria benéfica, además al tomar la muestra en campo se podrá ver la textura del moco vaginal que es un indicador de la existencia de patologías.

3.3 Objetivo

Se puede obtener un probiótico a partir de los *Lactobacillus gasseri* aislados para inocular a vacas con endometritis subclínica, al aplicar el probiótico este producirá ácidos orgánicos haciendo que el pH del área baje y sea difícil el desarrollo de los patógenos, la salud de las hembras bovinas se fortalecerá ya que una vez que los *Lactobacillus gasseri* se adhieran al tracto reproductor se alojarán allí y cada vez que el animal pase por la fase reproductiva tendrá antimicrobianos que regulen la presencia de microbiota vaginal.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Realizar un estudio del arte de *Lactobacillus gasseri* y sus ventajas como bacteria probiótica.

En la presente investigación realizada a 249 hembras bovinas se aisló *Lactobacillus gasseri* en un 0,4% de las vacas, sin embargo un 4,4% de las muestras poseían *Lactobacillus spp.* lo que indica que en los hatos muestreados hay poca presencia de Lactobacilos, lo cual hace que las vacas tengan una alta incidencia de infecciones del tracto reproductor que causan subfertilidad y situación que hace que el productor tenga altas pérdidas económicas por que la cantidad de días abiertos aumenta. Slover *et al.*, 2008 citando a McGroarty y Reid, describieron a los lactobacilos como antimicrobianos que previenen el desarrollo excesivo de varias bacterias gastrointestinales y urogenitales, previniendo así las infecciones. Los *Lactobacillus gasseri* tienen la capacidad de inducir interferones en macrófagos (Kitazawa *et al.*, 1992; Matsumura *et al.*, 1992), incluido el esplénica y macrófagos de parche de peyer (Kitazawa *et al.*, 1994). Existe entonces la posibilidad de que estos LAB activen los macrófagos y estimulan una variedad de funciones de macrófagos según Kitazawa, 2002. En una investigación sobre inhibición de *Lactobacillus gasseri* sobre *Yersinia* se demostró que el *L. gasseri* presentó resistencia a la cefalotina y la dicloxacilina, y fue sensible a la penicilina la ciprofloxacina y la gentamicina. Cunha *et al.* 2013 consideran que las especies bacterianas probióticas deben presentar ausencia de resistencia a antimicrobianos, porque el riesgo de transferencia de genes de resistencia a bacterias patógenas o potencialmente patógenas del tracto gastrointestinal del hospedero es importante. De igual manera, Dhamale *et al.* 2015 mencionan que la selección de especies con potencialidades probióticas debe incluir un perfil de susceptibilidad a los antibióticos.

4.2. Establecimiento de la presencia de *Lactobacillus gasseri* en el canal vaginal de hembras bovinas mediante la reacción en cadena de polimerasas (PCR).

En las muestras tomadas a hembras bovinas de distintas fincas de Manabí y Santo Domingo de los Tsachilas se encontró un bajo porcentaje (4,4%) de *Lactobacillus spp.*, (cuadros: 1, 2, 4, 5, 6), habiéndose encontrado en once vacas la antes mencionada bacteria, de acuerdo a las pruebas de Reacción en Cadena de polimerasas (PCR) sólo en una muestra contenía *Lactobacillus gasseri* que corresponde a un 0,4% (cuadro 4, vaca número 10).

4.3. Determinación del grado de presencia de endometritis subclínica en hembras bovinas correlacionando la existencia de *Lactobacillus spp.* y *Lactobacillus gasseri* respecto al grado de moco vaginal.

De acuerdo a lo encontrado en la investigación se puede observar que las vacas no tienen moco vaginal totalmente transparente o sea, en grado 0 el moco vaginal, lo cual es normal por la existencia de bacterias en el área. La mayoría tiene moco clasificación 1, se obtuvo resultados en un 77,9 %, de esas muestras con esa clasificación de moco vaginal, nueve vacas (81,81%) presentaron presencia de lactobacilos spp. y una de ellas tenía presencia de *Lactobacillus gasseri*; mientras que con clasificación de moco 2 se encontró un 16,5 % de las muestras tomadas, de las cuales dos vacas (18,18%) tenían lactobacilos spp.; con clasificación 3 hubieron un 5,6 % de muestras, lo que indica existencia de infección bacteriana como puede ser endometritis subclínica, la misma que no tiene signos visibles pero causa subfertilidad a las hembras bovinas, patología que persiste al faltar lactobacilos que protejan al tracto reproductivo produciendo ácidos orgánicos y pH bajo en el que no sea posible el desarrollo de bacterias patógenas, existiendo una cantidad mayor de días abiertos entre partos.

CONCLUSIONES

- En el canal vaginal de hembras bovinas muestreadas se encontró *Lactobacillus gasseri* (0,4%), fue posible encontrar varias cepas de *Lactobacillus spp.* (4,4%), lo que demuestra que un bajo porcentaje de vacas tienen ese tipo de bacterias benéficas.
- La técnica de Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) usada como técnica de identificación de *Lactobacillus gasseri* fue eficiente para distinguirla entre las once muestras de *Lactobacillus spp.*
- Las vacas de los hatos bovinos de Manabí tienen poca presencia de *Lactobacillus gasseri* en su canal vaginal, por lo que suelen tener poca defensa ante bacterias que causan infecciones como Endometritis Subclínica y acaban padeciendo subfertilidad ya que las hembras bovinas no muestran muchos signos de la patología, a lo que el productor no se preocupa y llega a tener grandes pérdidas económicas.
- El estado del moco vaginal según su grado de cristalinidad o consistencia mucopurulenta es un signo de que existe patología en el tracto reproductivo del animal, en la investigación se encontró que un 77% de vacas tenían moco en clasificación 1, una vaca con ese grado de moco mostro presencia de *Lactobacillus gasseri*.
- No se encontró ninguna vaca que presentase moco vaginal con clasificación 0, lo que indica que tienen patógenos en el tracto reproductor unas con moco vaginal, muy pocas (5,6%) tenían infección aguda con clasificación 3 del moco vaginal.

RECOMENDACIONES

- Cada hato ganadero debe conocer el beneficio de la bacteria *Lactobacillus gasseri* como antagonista para bacterias patógenas, los técnicos deben informarles de lo positivo que es la presencia de la bacteria antes mencionada.
- Antes de hacer un programa de inseminación artificial (IA) se debe tomar muestras del canal vaginal de las vacas a tratar para conocer la presencia de bacterias benéficas y patógenas en el área.
- *Lactobacillus gasseri* es una bacteriocina que debería ser inoculada en forma de probiótico en el tracto reproductor de las vacas ya que se adhieren a la mucosa y generan ácidos que hacen bajar el pH a un punto que las bacterias patógenas no pueden sobrevivir.
- La investigación debe hacerse en un número de vacas más amplio para saber cuál es el estado sanitario de los hatos en Manabí.

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Sanabria L. . (2007). *Efecto de Penicilinas y Tetraciclinas en Leche sobre el Crecimiento de Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris y Streptococcus thermophilus* [Tesis de maestría]. Zamorano (México): Universidad de Zamorano.
- Anukam K C, Osazuwa E O, Ahonkhal I, Raid G. . (2005). *16s rDNA gene sequence and phylogenetic tree of Lactobacillus species from vagina of healthy Nigerian women*. Afr J Biotechnol.4(11):, 1222-1227.
- Berger B, Pridmore RD, Barretto C, Delmas-Julien F, Schreiber K, Arigoni F, et al. (2007). *Similarity and differences in the Lactobacillus acidophilus group identified by polyphasic analysis and comparative genomics*. J Bacteriol. 189(4), 1311-1321.
- Biberstein E, Chung Y. (1990). *Bacterias. En: Tratado de microbiología veterinaria*. España: Acribia 15, 6 -10.
- Cannon, J.P. et al. (2005). *Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24., 31-40.
- Chang Liu, Zhuo-Yang Zhang, Ke Dong, Jian-Ping Yuan, and Xiao-Kui Guop. (2009). *Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs*. Biomedical and environmental sciences 22, 401-412 .
- Christine M. Slover, and Larry Danziger. (2008). *Lactobacillus: a Review*. Clinical Microbiology Newsletter 30:4, 23-27.
- Colin Palmer . (2008). *Endometritis en vacas lecheras*. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos del IRAC 10(37), 25-32.
- Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CGM. . (2007). *Bacteriocin production production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*. Proc Natl Acad Sci 104, 7617–21.
- Craik DJ, Cemazar M, Wang CK, Daly NL . (2006). *The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template*. Biopolymers 84:, 250–266.
- De Vuyst L, Leroy F. (2007). *Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications*. J Mol Microbiol Biotechnol 2007;13., 194–9.
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. . (2012). *Bacteriocin production as a probiotic trait*. Appl Environ Microbiol 78, 1-6.
- Fernández A, Silveira E, López O. (2006). *Las infecciones uterinas en las hembras bovinas*. Redvet 7(10), 1-39.

- Gilbert R, Shin S, Guard C, Erb H. (2005). *Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows*. Theriogenology 9, 1879-1888.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA. . (2008). *The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics*. Appl Microbiol Biotechnol 81, 591–606.
- H. S. Kim, S. G. Jeong, J. S. Ham, H. S. Chae, J. M. Lee and C. N. Ahn. (2006). *Antioxidative and Probiotic Properties of Lactobacillus gasseri NLRI-312 Isolated from Korean Infant Feces*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 19, No. 9 , 1335 - 1341.
- Hammes, W.P. and P.S. Tichaczek. . (1997). *The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food*. Z. Lebenschm. Unters. Forsch. 198, 193-201.
- I.M. Sheldon & H. Dobson. (2004). *Postpartum uterine health in cattle*. Animal Reproduction Science 82–83 (2004), 295–306.
- Ito Y, Kawai Y, Arakawa K, Honme Y, Sasaki T, Saito T. (2009). *Conjugative plasmid from Lactobacillus gasseri LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A*. Appl Environ Microbiol;75, 6340–51.
- Jack, R. W; Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). *Bacteriocins of Gram positive bacteria*. Microbiol. Rev. 59: , 171-200.
- José Carmen Ramirez Ramirez, Petra Rosas Ulloa, Martha Yanira Velazquez Gonzalez, José Armando Ulloa, Francisco Arce Romero. (2011). *Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Revista Fuente Año 2, Nº 7, 1-16.
- Kandler, O. and Weiss, N. . (1992). *Regular nonsporing Gram-positive rods*. P. En P. H. A. Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (Editor). Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, 10th edition, vol. 2., 1208-1260.
- Klaenhammer TR. (1988). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochimie 70, 337-49.
- Lakshminarayanan B, Guinane CM, O'Connor PM, Coakley M, Hill C, Stanton C. (2013). *Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects*. J Appl Microbiol;114, 886–98.
- Luz María Samaniego Fernández & Maryla Sosa del Castillo. (s.f.). *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Cuba., 1-34.
- M.C. Otero¹, L. Morelli and M.E. Nader-Macías. (2006). *Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle*. Journal compilation - The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 43 , 91–97.

- Marin, M; Bantar, C; Monterisi, A; Smayevsy, J; Suárez de Basnec, M. C. y Bianchini, H. (1993). *Aislamiento e identificación de Lactobacillus spp. vancomicina-resistentes en materiales clínicos*. Infect. & Microbiol. Clin. Vol. 5. No. 4: , 28 - 31.
- Martin Sheldon, James Cronin, Leopold Goetze, Gaetano Donofrio, and HansJoachim Schuberth. (2009). *Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle 1*. Biol Reprod 81(6) doi:10.1095/biolreprod.109.077370., 1025–1032.
- Milena Sanchez L., Carolina Gonzalez C., Rubiela Castañeda S., Adriana Pulido V., HG M., Moises Aranda S., & Milton Rueda V. (2011). *Evaluación Citológica y Microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos*. Rev.MVZ Córdoba 16(3), 2711-2720.
- Otero C, Silva C, Wilde O, Ruiz A, Nader-Macias M. (1998). *Variaciones de Lactobacillus y Enterococcus aislados de vagina de vacas durante ciclo estral*. Congreso argentino de producción animal. Argentina:Universidad de Tucumán., 22.
- Pandey, N., Malik, R. K., Kaushik, J. K., & Singroha, G. (2013). *Gassericin A: circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria Lactobacillus gasseri*. World J Microbiol Biotechnol 29(11)., 1977, doi: 10.1007/s11274-013-1368-3.
- Ramírez-Ramírez J, Rosas-Ulloa P, Velásquez-González M, Ulloa JA. Arce-Romero F. (2011). *Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Rev Fuente. 2(7), 1-16.
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN , Penna ALB. . (2012). *Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications*. Food Engin Rev. 4(2). Doi: 10.1007/s12393-012-9051-2., 124-140.
- Rondón A. J., Samaniego, L.M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Millán, G., Ranilla, M.J., & Perez, M. . (2008). *Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas del Lactobacillus spp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba Isolation*. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6(1)., 56-63.
- Sablon, E., B. Contreras, and E. Vandamme. (2000). *Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 68, 21-60.
- Sanchez-Hidalgo M, Montalban-Lopez M, Martinez-Bueno M, Valdivia E, Maqueda M. (2007). *Natural ribosomally synthesized circular proteins. I. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. In: Mendez-Vilas A (ed).

- Selle K, and Klaenhammer TR. . (2013). *Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences Lactobacillus gasseri on human health*. FEMS Microbiol Rev. 37(6). Doi: 10.1111/1574-6976.12021., 915-935.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. . (2006). *Defining postpartum uterine disease in cattle*. Theriogenology. 65, 1516–1530.
- Silva, M; Jacobus, N. V; Deneke, C. and Gorbach, S. L. . (1987). *Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain*,. Antimicrob. Agents and Chemotherapy 31:, 1231-1233.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. . (1976). *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Bacteriol. Rev. 40, 722-756.
- Trabi M, Craik DJ . (2002). *Circular proteins—no end in sight*. Trends Biochem Sci 27, 132–138.
- Vanbelle, M; Teller, E. and Focant, M. (1989). *Probiotics in animal nutrition: a review*. Publication No. 55 de l' Unité de Biochimie de la Nutrition. Louvain-la-NeuveBelgique Belgique., 1348.
- Williams EJ, Fischer DP, England GCW, Dobson H, Pfeiffer DU, Sheldon IM. . (2005). *Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle*. Theriogenology. 63, 102–117.

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE MATERIALES



Foto 1



Foto 2



Foto 3

Fotos 1 y 2: Preparación de caldo de cultivo MRS / Agar MRS.

Foto 3: Plaqueado de agar MRS en cajas Petri.

TOMA DE MUESTRAS



Foto 4:



Foto 5:



Foto 6:



Foto 7:

Foto 4: Limpieza a la zona perianal y perivulvar.

Foto 5: Toma de muestra en canal vaginal.

Foto 6: Guardando hisopo con muestra en caldo MRS.

Foto 7: Muestra almacenada y lista para llevar a laboratorio.

PREPARACIÓN E INCUBADO DE MUESTRAS



Foto 8



Foto 9



Foto 10



Foto 11

Foto 8 y 9: Marcado de muestras antes de incubar.

Foto 10: Colocando las muestras en la jarra de incubación.

Foto 11: Guardando las jarras en la incubadora a 37° C.

SEMBRADO EN AGAR MRS



Foto 12

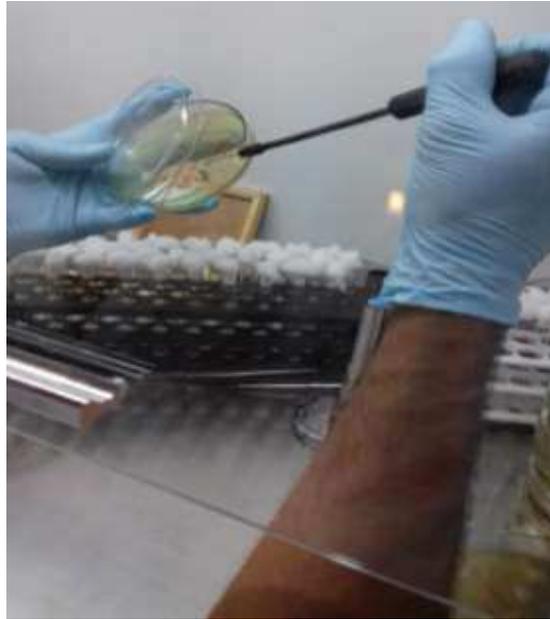


Foto 13



Foto 14



Foto 15

Foto 12: Toma de muestra bacteriana para sembrar en agar.

Foto 13: Sembrado en agar MRS.

Foto 14: Sobre microbiológico anaeróbico.

Foto 15: Guardando las cajas Petri en la jarra.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS



Foto 16



Foto 17



Foto 18

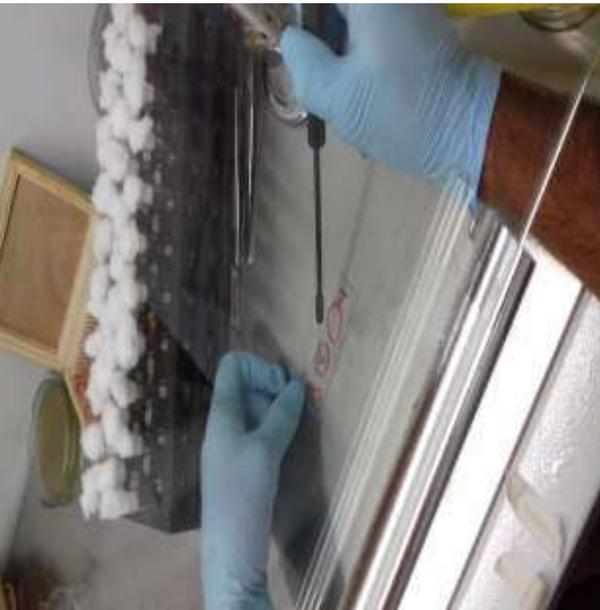


Foto 19

Foto 16: Desarrollo bacteriano en caja Petri.

Foto 17: Toma de colonia de bacterias.

Foto 18: Colocando la colonia en tubo con agua destilada.

Foto 19: Muestra bacteriana en portaobjeto.

TINCIÓN Y OBSERVACIÓN DE BACTERIAS



Foto 20



Foto 21

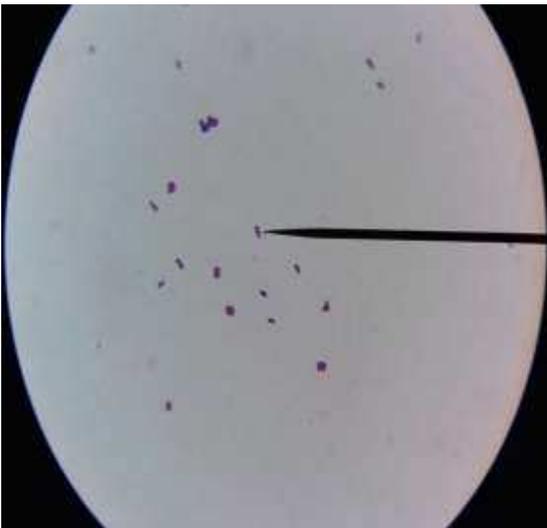


Foto 22



Foto 23

Foto 20: Haciendo tinción de Gram.

Foto 21: Observación en Microscópio electrónico.

Foto 22: Lactobacillus corto.

Foto 23: Grupo de trabajo en el laboratorio microbiológico de Agropecuaria de la ULEAM Extensión Chone.

LABORATORIO DE AGROCALIDAD

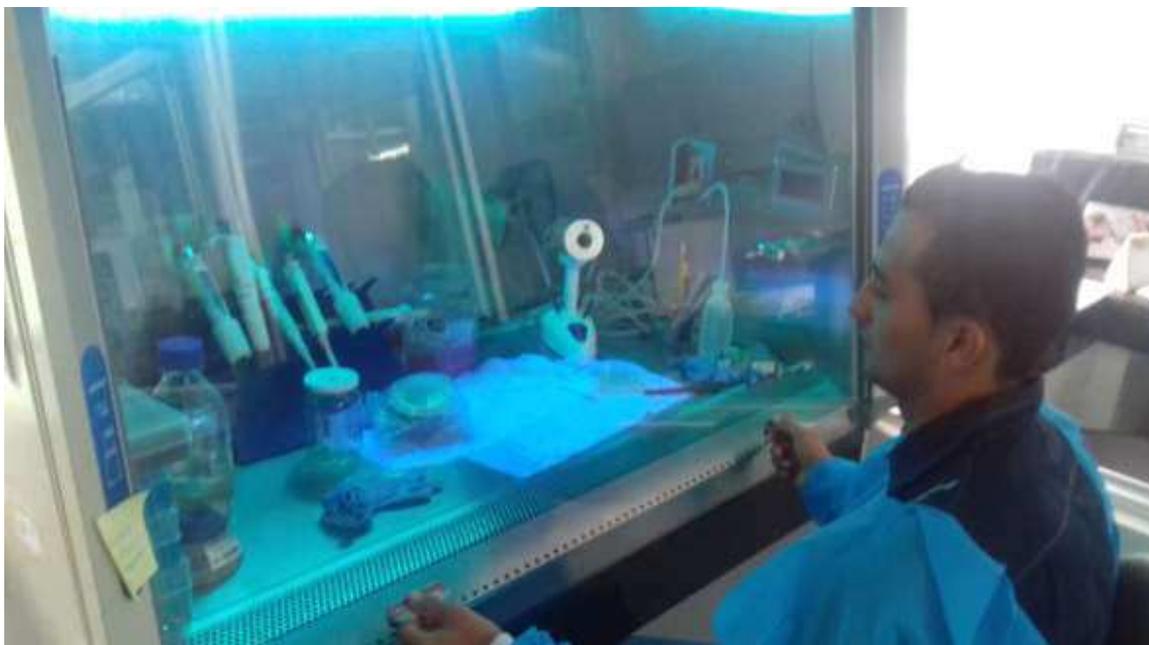


Foto 24: En la cámara de flujo laminar.

ANEXO 2

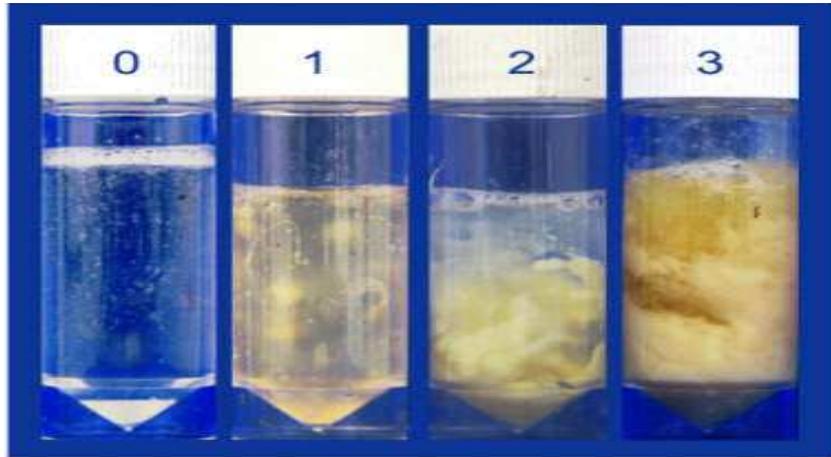


Fig1. Esquema de clasificación para la Endometritis (Sheldon *et al.*, 2009)

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI # 1			
Finca:	LA RICARDO		
Localidad:	MÁSCARA - FLAVIO ALFARO		
Propietario:	Lic. MERCEDES CEDEÑO		

- 1 BRAMAN
- 2 GIROLANDO
- 3 JERSEY
- 4 HOLSTEIN
- 5 GIR
- 6 BROWN SWISS
- 7 GYR

SI 1	SI 1	8 MEZTIZO
NO 0	NO 0	RAZA

NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	LACTOBACILLUS SPP.	L. Gasseri	1,2,3,4,5,6,7,8.
1	La pintada lucero blanco	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
2	La morena	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
3	Teta larga	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
4	La dura	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
5	Cacho desparramada	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
6	Negra cacho fino	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
7	La café	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
8	Cara de queso	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
9	Toma leche	1	Cocos y Bacillus	1	0	8
10	Mama del oregon	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

ANEXO 3 CUADROS

11	La chivi	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
12	Garsa	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
13	3 Tetas negra	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
14	Cacho de pancora	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
15	Motonga ceniza	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
16	La chavarria	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
17	Chorro de ducha	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
18	Pintadita roja	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
19	Leoparda	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
20	Mama del zorro	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
21	Negrita chichita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
22	La carmela	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
23	Amarilla	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
24	Rumba coja	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
25	Pintadita chiquita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
26	Fajada	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
27	Negra de la abuela	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
28	Pata fina	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
29	Blandita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
30	Cacho chuponado	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
31	Rojita chiquita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
32	Motonga dura	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
33	La pochita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
34	Motonga blanca	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
35	La patuja	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
36	Corazoncito	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
37	La cachona	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
38	Motonga pintada	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

39	La chorreada	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
40	La chiquita negrita	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI #2

						1 BRAMAN
Finca:	ARENILLAS					2 GIROLANDO
Localidad:	ZAPALLO					3 JERSEY
Propietario:	Lic. MERCEDES CEDEÑO					4 HOLSTEIN
						5 GIR
						6 BROWN SWISS
						7 GYR
						8 MEZTIZO
				SI 1	SI 1	
				NO 0	NO 0	
NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO DE MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	LACTOBACILLUS SPP.	L. Gasseri	RAZA
1	La roja oreja mocha	1	Cocos y Bacillus	1	0	8
2	Oreja mocha	1	Cocos y Bacillus cortos	0	0	8
3	3784	2	Cocos, levaduras y Bacillus	0	0	8
4	Pintadita	1	Cocos	0	0	8
5	Negra 3 tetas	2	Cocos	0	0	8
6	La amarillita	1	Cocos	0	0	8
7	Negrita cachito fino	1	Cocos y levaduras	0	0	8
8	Cara blanca	1	Cocos, levaduras y artefactos	0	0	8
9	Amarilla	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
10	3721	1	Cocos y levaduras	0	0	8
11	3738	1	Cocos	0	0	8
12	La roja	1	Cocos	0	0	8

13	Amarilla del teniente	1	Cocos	0	0	8
14	4057	2	Cocos	0	0	8
15	Hija de la mayonesa	3	Cocos	0	0	8
16	La negra de la salsa	1	Cocos y Bacillus cortos	1	0	8
17	233	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
18	3787	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
19	La paulina	2	Cocos y levaduras	0	0	8
20	3723	3	Cocos y artefactos	0	0	8
21	La rabo mocho	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
22	3795	1	Cocos y artefactos	0	0	8
23	Cachona	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
24	3757	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI # 3						1 BRAMAN
Finca: HADA. MEJÍA Localidad: MARCOS Propietario: Dr. ROBERTI MEJÍA						2 GIROLANDO
						3 JERSEY
						4 HOLSTEIN
						5 GIR
						6 BROWN SWISS
						7 GYR
						8 MEZTIZO
NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO DE MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	LACTOBACILLUS SPP.	L. Gasseri	RAZA
1	264	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
2	265	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
3	266	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
4	267	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
5	268	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
6	269	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
7	270	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
8	271	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
9	272	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
10	274	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
11	275	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
12	276	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
13	277	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
14	288	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
15	289	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
16	290	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
17	291	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

18	292	3	Cocos y Bacillus	0	0	8
19	293	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
20	294	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
21	295	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
22	296	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
23	297	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
24	298	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
25	299	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
26	300	3	Cocos y Bacillus	0	0	8
27	301	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
28	302	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
29	303	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
30	304	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
31	305	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
32	306	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
33	307	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
34	308	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
35	309	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
36	310	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
37	311	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
38	312	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
39	313	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
40	314	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
41	315	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
42	316	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
43	317	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
44	318	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
45	319	2	Cocos y Bacillus	0	0	8

46	320	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
47	321	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
48	322	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
49	323	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
50	324	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
51	325	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
52	326	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
53	327	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
54	328	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
55	329	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
56	330	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
57	331	1	Cocos y Bacillus	0	0	8

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI # 4	
Finca:	HDA. LA VERA
Localidad:	CTRA. COLORADO-BALZAR KM 7- ENTRADO A MEJÍA
Propietario:	ING. PEDRO VERA ALCÍVAR – Ganadería del Dr. Mario Zambrano Argandoña.

1 BRAMAN
2 GIROLANDO
3 JERSEY
4 HOLSTEIN
5 GIR
6 BROWN SWISS
7 GYR

NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	SI 1	SI 1	8 MEZTIZO
				NO 0	NO 0	RAZA
				LACTOBACILLUS SPP.	L. Gasseri	1,2,3,4,5,6,7,8
1	4087	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
2	4482	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
3	4635	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
4	4468	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
5	5164	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
6	4041	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
7	3493	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
8	3000	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
9	NEGRA	2	Cocos y Bacillus	1	0	2
10	3671	1	Cocos y Bacillus	1	1	2
11	4024	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
12	CAFÉ	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
13	YARY	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
14	4881	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
15	682	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
16	3266	1	Cocos y Bacillus	0	0	2

17	4691	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
18	2710	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
19	4155	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
20	4090	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
21	4819	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
22	4678	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
23	4319	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
24	2604	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
25	3143	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
26	4331	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
27	PINTADA	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
28	2895	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
29	3270	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
30	4482	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
31	4998	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
32	4554	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
33	3735	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
34	4590	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
35	3866	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
36	3585	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
37	3695	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
38	3654	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
39	3042	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
40	2413	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
41	3719	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
42	4116	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
43	4393	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
44	4309	2	Cocos y Bacillus	0	0	2

45	3294	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
46	PINTA BLANCA	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
47	3195	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
48	4643	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
49	2499	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
50	8687	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
51	4341	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
52	3180	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
53	3047	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
54	3196	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
55	2831	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
56	2966	2	Cocos y Bacillus	1	0	2
57	4978	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
58	3531	1	Cocos y Bacillus	1	0	2
59	3749	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
60	3874	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
61	CAFÉ GRANDE	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
62	2960	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
63	3446	2	Cocos y Bacillus	0	0	2
64	4429	3	Cocos y Bacillus	0	0	2
65	4089	1	Cocos y Bacillus	0	0	2

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI # 5						1 BRAMAN
						2 GIROLANDO
						3 JERSEY
Finca:	HADA. MARTINEZ					4 HOLSTEIN
Localidad:	SANTO DOMINGO DE LOS COLORADOS					5 GIR
Propietario:	MVZ GALO MARTINEZ					6 BROWN S
					SI 1	SI 1
					NO 0	NO 0
NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO DE MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	L. SPP	L. G	RAZA
1	332	1	Cocos y Bacillus	1	0	2
2	333	1	Cocos y Bacillus	1	0	2
3	334	1	Cocos y Bacillus	1	0	2
4	335	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
5	336	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
6	337	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
7	338	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
8	339	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
9	340	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
10	341	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
11	342	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
12	343	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
13	344	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
14	345	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
15	346	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
16	347	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
17	348	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
18	349	1	Cocos y Bacillus	0	0	2

19	350	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
20	351	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
21	352	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
22	353	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
23	354	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
24	355	1	Cocos y Bacillus	0	0	2
25	356	1	Cocos y Bacillus	0	0	2

MUESTREO DE LACTOBACILLUS GASSERI # 6						
Finca:	RANCHO VISMARK					1 BRAMAN
Localidad:	CONVENTO					2 GIROLANDO
Propietario:	SR. STALIN CONFORME					3 JERSEY
						4 HOLSTEIN
						5 GIR
						6 BROWN SWISS
						7 GYR
						8 MEZTIZO
NUMERO DE MUESTRA	CODIGO O CARABANA	GRADO MOCO CERVICAL	BACTERIAS IDENT X GRAM	SI 1	SI 1	RAZA
				NO 0	NO 0	
			L. SPP	L. G		
1	357	2	BACTERIA	0	0	8
2	358	3	Cocos y Bacillus	0	0	8
3	359	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
4	360	2	Cocos y Bacillus	1	0	8
5	361	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
6	362	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
7	363	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
8	364	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
9	365	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
10	366	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
11	367	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
12	368	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
13	369	3	Cocos y Bacillus	0	0	8

14	370	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
15	371	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
16	372	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
17	373	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
18	374	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
19	375	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
20	376	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
21	377	2	Cocos y Bacillus	0	0	8
22	378	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
23	379	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
24	380	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
25	381	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
26	382	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
27	383	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
28	384	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
29	385	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
30	386	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
31	387	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
32	388	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
33	389	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
34	390	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
35	391	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
36	392	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
37	393	1	Cocos y Bacillus	0	0	8
38	394	1	Cocos y Bacillus	0	0	8