

OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO CONCENTRADO PROBIÓTICO MEDIANTE LA
TECNOLOGÍA DE IMPREGNACIÓN POR ASPERSIÓN



Universidad
del Cauca

YHEFERSON PEÑA VARGAS
SAUL RICARDO VILLAMARÍN RENGIFO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2018

OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO CONCENTRADO PROBIÓTICO MEDIANTE LA
TECNOLOGÍA DE IMPREGNACIÓN POR ASPERSIÓN

YHEFERSON PEÑA VARGAS
SAUL RICARDO VILLAMARÍN RENGIFO

Trabajo de grado en la modalidad de Investigación para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial

Directores
Ph. D. JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA
M. Sc. SANDRA MAGALLY SANCHEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2018

Nota de aceptación

Los Directores y Los Jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

Ph. D. JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA
Director

M. Sc. SANDRA MAGALLY SANCHEZ
Directora

Ph. D. JOSÉ FERNANDO SOLANILLA
Presidente del Jurado

Ph. D. DIEGO FERNANDO ROA
Jurado

Popayán, 9 de octubre de 2018

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias Rengifo Villamarín y Peña Vargas por su apoyo incondicional durante la etapa de formación profesional, en especial a nuestras madres concepción Rengifo y María Mireya Vargas G, que fueron los pilares de ejemplo perseverancia y esfuerzo para lograr alcanzar la finalidad de este proceso de formación.

A José Luís Hoyos Concha el director de este trabajo de grado quien con tiempo y dedicación apporto lo mejor de él como persona y profesional para poder desarrollar cada uno de los objetivos y obstáculos que se presentaron cada día; y así poder finalizar con éxito las metas propuestas en el trabajo de grado.

Al grupo de aprovechamiento de subproductos, residuos y desechos agroindustriales (ASUBAGROIN) y a sus integrantes, por brindarnos el espacio de conocer, aprender y disfrutar de la ciencia como un estilo de vida y así poder brindar soluciones eficientes a problemas que nos enfrentamos actualmente.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 ACUICULTURA	16
1.2 ENFERMEDADES DE LA PISCICULTURA	16
1.2.1 Antibióticos	17
1.3 PROBIÓTICOS	17
1.3.1 <i>Bacillus</i> sp	18
1.4 IMPREGNACIÓN	19
1.4.1 Impregnación atmosférica	19
1.4.2 Impregnación al vacío	19
1.5 MARCO HISTÓRICO	20
2. METODOLOGÍA	22
2.1 LOCALIZACIÓN	22
2.2 IMPREGNACIÓN DEL MICROORGANISMO <i>Bacillus</i> sp 074 POR EL PROCESO DE IMPREGNACIÓN POR ASPERSIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y PRESIÓN DE VACÍO	22
2.2.1 Activación del <i>Bacillus</i> sp 074	22
2.2.2 Conservación del <i>Bacillus</i> sp 074 concentrado en glicerol	22
2.2.3 Cinética de crecimiento	23
2.2.4 Proceso de impregnación del <i>Bacillus</i> sp 074, por aspersion a presión atmosférica y presión de vacío sobre alimento extruido para tilapia en fase de engorde	23
2.2.4.1 Adecuación del equipo Autojet 1550 e impregnador al vacío MP/TV 05	23

	pág.
2.2.4.2 Preparación del inóculo	25
2.2.4.3 Proceso de aspersión del <i>Bacillus</i> sp 074 por aspersión a presión atmosférica y presión de vacío	25
2.2.4.4 Secado de concentrado	25
2.2.5 Análisis estadístico	25
2.2.6 Pruebas biológicas	26
2.2.6.1 Unidades formadoras de colonias (UFC/mL)	26
2.2.6.2 Simulación de resistencia de Ph	26
2.2.7 Pruebas físicas	27
2.2.7.1 Flotabilidad	27
2.2.7.2 Durabilidad	27
2.3 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL <i>Bacillus</i> sp. 074 IMPREGNADO EN EL ALIMENTO EXTRUIDO PARA TILAPIAS EN FASE DE ENGORDE, BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	27
2.3.1 Análisis estadístico	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO IMPREGNACIÓN DEL MICROORGANISMO <i>Bacillus</i> sp 074 A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y PRESIÓN DE VACÍO SOBRE EL CONCENTRADO EXTRUIDO PARA TILAPIAS EN FASE DE ENGORDE	29
3.1.1 Cinética de crecimiento	29
3.1.2 Proceso de impregnación por aspersión del <i>Bacillus</i> sp 074 a presión atmosférica y presión de vacío sobre el alimento extruido para tilapia en fase de engorde	30
3.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL MICROORGANISMO IMPREGNADO ALMACENADO A CONDICIONES DE TEMPERATURA AMBIENTE EN EL CONCENTRADO PARA TILAPIAS	33
3.2.1 Análisis estadístico	33

	pág.
4. CONCLUSIONES	39
5. RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	49

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Diseño experimental ANOVA para determinar el mejor tratamiento	26
Cuadro 2. Diseño experimental de medidas repetitivas con respecto al tiempo	28
Cuadro 3. Análisis estadístico primer objetivo	30
Cuadro 4. Tiempo vs temperatura variable Resistencia a Ph	35
Cuadro 5. Temperatura vs tiempo variable durabilidad	35
Cuadro 6. Tiempo vs temperatura variable durabilidad	36
Cuadro 7. Comparación por pares que respecta a temperatura vs tiempo variable flotabilidad	36
Cuadro 8. Comparación por pares que respecta a tiempo vs temperatura variable flotabilidad	37
Cuadro 9. Resumen de interacción entre factores para las diferentes variables	37

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. (A) módulo Autojet 15 50. (B) Impregnador al vacío MP/TV 05	23
Figura 2. Tanque presurizado 22140	24
Figura 3. (A) Boquilla hidráulica Pulsa Jet AA10000UH-10-NC. (B) Punta estándar de aspersión plana UniJet 11001	24
Figura 4. Canastilla en acero inoxidable	25
Figura 5. Cinética de crecimiento Bacillus sp 074 en Agar Nutritivo a 37 °C	29
Figura 6. Ilustración del principio del revestimiento al vacío	31
Figura 7. Resultado prueba simulación resistencia a jugos gástricos	31

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Resultado obtenido a pruebas de barrera por parte del <i>Bacillus</i> sp 074, resultados obtenidos por el Grupo de Investigación ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca	49
Anexo B. Protocolo general de equipos para la impregnación por aspersión	51
Anexo C. Datos de la cinética de crecimiento del <i>Bacillus</i> sp 074 por 12 horas	67
Anexo D. Análisis estadístico Anova de la impregnación por aspersión	68
Anexo E. Estadísticos descriptivos Anova primer diseño experimental	69
Anexo F. Estadísticos descriptivos Anova segundo diseño experimental	71

GLOSARIO

AGENTE PATÓGENO: es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, ser humano o vegetal.

ALEVINES: crías de pez que incluye la fase comprometida entre la larva y el adulto y que en ciertos casos se utiliza para repoblar.

ALIMENTO EXTRUIDO: los alimentos extruidos son aquellos que han sido elaborados mediante un proceso de extrusión, el proceso de extrusión de alimentos es una forma de cocción rápida, continua y homogénea.

BACTERIAS OPORTUNISTAS: son microorganismos normalmente no patógenos y que producen solo una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas.

FASE DE LEVANTE: pez comprendido entre los 5 y 80 gramos, que son alimentados con un concentrado de 30% o 32% de proteína, dependiendo de la temperatura y el fin industrial que se le vaya a dar.

INÓCULO: un inóculo microbiano es una preparación sólida o líquida la cual contiene una gran cantidad de microorganismo como bacterias y hongos. Estos microorganismos se encuentran activados, es decir son viables física y químicamente y están listos para ser inoculados en un biorreactor; los inóculos pueden ser de un solo tipo de microorganismo específico o una mezcla de microorganismo para ser aplicados ha determinado ambiente o producto.

PROBIÓTICOS: microorganismos vivos que cuando que cuando se administran o aplican en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud del consumidor o huésped.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad del proceso de impregnación por aspersión de un microorganismo con características probióticas sobre un alimento extruido para tilapia roja en etapa de engorde. Se desarrollaron estudios preliminares como la cinética de crecimiento del *Bacillus* sp 074 y los parámetros de funcionamiento del módulo de aspersión Autojet 1500+ y del impregnador al vacío MP/TV 05. Todo esto con el fin de establecer las mejores condiciones para evaluar la viabilidad del *Bacillus* sp 074 impregnado. Para el desarrollo de la investigación primero se estudió el tipo de aspersión que varía de acuerdo a la presión (presión de vacío y presión atmosférica), para ambos casos las variables de respuesta fueron pruebas físicas (durabilidad, flotabilidad) y pruebas biológicas (Unidades formadoras de colonia UFC/g, Resistencia a simulación de jugos gástricos UFC/g). Posteriormente se impregnó el microorganismo en el alimento extruido con el tratamiento de aspersión al vacío pues arrojó mejores resultados con concentraciones de 10^8 UFC/g. posterior fue llevado a anaquel a dos temperaturas (4 °C y 25 °C); durante 30 días; donde se tomaron muestras en los días 0, 15 y 30 para realizar las respectivas pruebas tanto biológicas (UFC/gr, Resistencia a simulación de jugos gástricos) y físicas (durabilidad, flotabilidad); y así poder determinar la viabilidad del microorganismo en cada espacio de tiempo. La temperatura de almacenamiento evaluada no generó una diferencia para las variables unidades formadoras de colonia y digestibilidad, pero el tiempo sí disminuye la viabilidad y la capacidad probiótica del *Bacillus* sp 074.

Palabras claves: Probiótico, Aspersión, Vacío, Durabilidad, Flotabilidad, Resistencia a simulación de jugos gástricos, UFC/gr.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the viability of the process of impregnation by sprinkling of a microorganism with probiotic characteristics on an extruded feed for red tilapia in the fattening stage. Preliminary studies were developed such as the growth kinetics of *Bacillus sp* 074 and the operating parameters of the AutoJet 1500+ spray module and the MP / TV 05 vacuum impregnator. All this in order to establish the best conditions to evaluate the viability of the *Bacillus sp* 074 impregnated. For the development of the research, the type of spray that varies according to the pressure (vacuum pressure and atmospheric pressure) was studied, for both cases the response variables were physical tests (durability, buoyancy) and biological tests (Training units of colony UFC / g, Resistance to simulation of gastric juices UFC / g). Subsequently, the microorganism was impregnated in the extruded food with the vacuum spray treatment, since it gave better results with concentrations of 10^8 CFU / g. Subsequent was brought to shelf at two temperatures (4°C and 25°C); for 30 days; where samples were taken on days 0, 15 and 30 to perform the respective biological tests (UFC / gr, resistance to simulation of gastric juice) and physical (durability, buoyancy); and thus be able to determine the viability of the microorganism in each space of time. The storage temperature evaluated did not generate a difference for the variables colony forming units and digestibility, but the time does decrease the viability and the probiotic capacity of *Bacillus sp* 074.

Keywords: Probiotic, Spraying, Vacuum, Durability, Buoyancy, Resistance simulated gastric juices, CFU / g

INTRODUCCIÓN

Existe una tendencia a nivel mundial que indica que los productos de origen pesquero (peces, moluscos y crustáceos) están siendo apetecidos en los hábitos alimenticios de la humanidad (Melorose, Perroy y Careas 2015) por lo que la acuicultura se ha convertido en una industria que en los últimos años ha crecido a gran velocidad (García y Gutiérrez 2015).

Para el caso de Colombia la acuicultura continental está representada por la piscicultura, principalmente por la producción de tilapia, cachama y trucha. Esta actividad productora de proteína animal es la de mayor crecimiento en el conjunto pecuario (Merino *et al.* 2013), y ha venido aumentando a un ritmo importante, pasando de 572 toneladas en 1985 a 89,140 toneladas en 2014 (Godoy *et al.* 2016). Para nuestro país la piscicultura es un elemento que contribuye al desarrollo del sector agropecuario, y a su vez, es una fuente alimenticia que proporciona todos los nutrientes esenciales en la dieta de una población, es así como la piscicultura ofrece oportunidades en la seguridad nutricional y alimentaria en los hogares de la región, asimismo desempeña un papel importante a la hora de mejorar los índices de pobreza (FAO 2014; Merino *et al.* 2013; Melorose, Perroy y Careas 2015).

Estas situaciones han generado que la producción de organismos acuáticos sea intensiva y bajo condiciones controladas, al querer lograr producciones a gran escala se han tenido problemas de orden técnico, económico y ambiental que en los últimos años han tenido signos recesivos en la producción (Gutiérrez *et al.* 2006; Janko y Weinborn 2007; Merino *et al.* 2013). La producción de peces al ser tan vulnerable a condiciones ambientales, enfermedades y estrés; se promueve con facilidad la propagación de enfermedades infecciosas (García, 2018).

Además según García (2018) entre los organismos causantes de enfermedades en peces podemos encontrar hongos como *Ichthyophonus hoferi* que causa la enfermedad llamada Ictiofonosis, o virus como el *Iridovirus* causante de la Necrosis Hematopoyética, también podemos encontrar parásitos como la *Trichodina*. Pero en bacterias podemos encontrar la mayor variedad de enfermedades causadas, bacterias del género *Aeromonas* o *pseudomonas* causan enfermedades como la septicemia.

Para controlar estos problemas se han llevado prácticas con hormonas, antibióticos y sales compuestas, que al ser usadas de forma inadecuada pueden ser un problema de salud pública (Jha, Bhujel y Anal 2015; Martínez *et al.* 2012; Pandiyan *et al.* 2013). Estos cuestionamientos han proporcionado la búsqueda de nuevas estrategias para el control de patógenos, una alternativa para contrarrestar el impacto negativo de los antibióticos y fomentar procesos productivos limpios es el uso de alimentos con inclusión de microorganismos probióticos, los cuales pueden crear sistemas de producción acuáticos muchos más eficaces (Kubitza 2013; García y Gutiérrez 2015; Janko y Weinborn 2007; Pandiyan *et al.* 2013).

Si bien los probióticos en los alimentos se han usado ampliamente, ha existido un interés en los últimos años para su uso en la acuicultura, gracias a efectos favorables en la nutrición (Hualinga 2013; Janko y Weinborn 2007), aspectos como la mejora del sistema inmunológico, control de patógenos y aumento del bienestar, son efectos que hacen que los probióticos se conviertan en una alternativa para reducir mortalidad en peces, además en contribuir a generar sistemas de producción acuáticos amigables con el medio ambiente lo cual ayudaría a reducir al mínimo el riesgo asociado con el uso de productos químicos tales como: vacunas, antibióticos y quimioterapéuticos; la mayoría de probióticos para la acuicultura pertenecen a los géneros ácido lácticas, *vibrio*, *bacillus* y *pseudomonas* principalmente, ya que han demostrado un excelente potencial en la industria piscícola y pueden ser un enfoque alternativo para mejorar respuesta inmune de los peces (Dawood y Koshio 2016; Sayes, Leyton y Riquelme 2016; Hualinga 2013; Jha, Bhujel y Anal 2015; Martínez *et al.* 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la poca información en relación a la inclusión del microorganismo probiótico en un alimento extruido, surgen nuevas tecnologías para afrontar estos desafíos que demanda la industria piscícola como lo son la aspersión del microorganismo sobre el alimento extruido, que en términos de homogeneidad, estabilidad y conformidad han mostrado resultados prometedores; adicionalmente esta técnica no requiere de tiempos extendidos ni infraestructuras complejas para ser manipuladas, y que pueden permitir una mayor proporción del microorganismo dentro del pellet (Lamichhane *et al.* 2015)

Por tal razón este estudio será un punto de partida para la inclusión de un microorganismo con características probióticas en un alimento extruido para peces mediante el proceso de impregnación por aspersión, se evaluó la viabilidad durante la etapa de almacenamiento al igual la posibilidad de investigación para desarrollar un producto y condiciones tecnológicas de alto impacto en la industria piscícola.

1. MARCO TEÓRICO

A continuación, se describen algunos conceptos que dan referencia a los probióticos en la piscicultura y fundamentos sobre los procesos de impregnación por aspersión e impregnación por aspersión al vacío.

1.1 ACUICULTURA

La acuicultura se puede definir como el cultivo de organismos acuáticos (peces, moluscos crustáceos y plantas acuáticas) bajo condiciones controladas por el hombre para aumentar la producción de dichos organismos, con el objetivo de lograr un aprovechamiento socioeconómico o bien para interés de tipo biológico (Delgado 2013; Baltazar 2014; FAO 2014).

Este es probablemente el sector de producción de alimento de más rápido crecimiento según estadísticas publicadas por la FAO., (2014), la producción pesquera ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces destinado a la alimentación humana es más del 86%, donde el porcentaje restante se destina a uso no alimentario.

Al enfocar la acuicultura en América Latina su participación es relativamente pequeña con respecto al contexto mundial, al hablar de Colombia, esta muestra un crecimiento equiparable al crecimiento mundial, ya que se evidencia al superar la tasa media de crecimiento del conjunto agropecuario y del conjunto total de la economía nacional; a comparación de algunos países de Latinoamérica con niveles de desarrollo relativamente similar en los cuales la participación de la acuicultura en el PIB es inferior (Merino et al. 2013; Delgado 2013).

1.2 ENFERMEDADES DE LA PISCICULTURA

Las enfermedades en la actividad piscícola son las responsables de la baja eficiencia de los cultivos y la causante de pérdidas económicas; por eso se deben poner en práctica procedimientos para prevenir y controlar las enfermedades que potencialmente ponen en riesgo la sanidad y limitan la producción; aunque no siempre la actividad patógena es la responsable de la muerte en los sistemas de producción, hay otros aspectos fundamentales como los son la calidad del agua y el estado nutricional del pez los cuales se pueden ver afectados por factores químicos, físicos o biológicos (Vázquez 2010; Baltazar 2014).

Entre las enfermedades más comunes en el cultivo de tilapia se encuentran la septicemia hemorrágica bacteriana, enfermedad bacteriana del riñón, vibriosis, la enfermedad del

pedúnculo caudal, enfermedad bacteriana de las branquias que son producidas por bacterias del género *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Mycobacterium* *Nocardia* (Vázquez 2010; Baltazar 2014).

Hay nuevas tecnologías de cultivo y en casi todas se habla de garantizar el estado nutricional del pez, para ello se debe tener en cuenta su alimentación y las raciones formuladas se deben hacer en base a los conocimientos de inmuno-nutrición, si resultan adecuados, mejoran la respuesta inmunológica de los animales y contribuyen con la reducción de la severidad de las enfermedades y la pérdida de peces (Kubitza 2013).

1.2.1 Antibióticos. En el siglo XX los antibióticos se convirtieron en la solución a múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos, no solo para humanos sino también en la medicina veterinaria, aunque esto generó un problema debido al uso inadecuado de los antibióticos como la resistencia de los microorganismos a los antibióticos como expresión natural de la evolución y a la variación genética bacteriana (Cabrera, Gómez y Zúñiga 2007) también tiene efecto sobre el ambiente ya que contiene una abundante flora bacteriana en el plancton, susceptible a los antibióticos y así alterando la salud del ambiente acuático, lo que puede influenciar en los ciclos vitales de los peces (Janko y Weinborn 2007; Ronsón y Medina 2002), la adición en masa de los antibióticos tiene efectos adversos en el pez como alteraciones hormonales, intoxicación, predisposición a enfermedades y acumulación de antibióticos no metabolizados totalmente en los órganos del pez, que los hace poco adecuados para la salud humana y comprometen el futuro económico de la industria acuícola y la reputación de calidad de los productos acuícolas (Ronsón y Medina 2002; Janko y Weinborn 2007).

En Colombia la administración y uso de antibióticos en las prácticas acuícolas está regida por la resolución 0676 del 9 de marzo del 2007, en esta se establece el reglamento técnico de emergencia y el plan de control de residuos y medicamentos veterinarios y otras sustancias químicas, que deben cumplir los productos acuícolas para consumo humano. Sin embargo el incumplimiento de dicha regulación y el desconocimiento de la misma en el sector acuícola, ha resultado en la aparición de cepas resistentes en la cadena de producción (Arenas y Melo, 2018); Una de las soluciones podría ser los probióticos, en algunos casos en los cuales el uso inapropiado y excesivo de antibióticos altere la composición de flora y fauna del pez y facilite el establecimiento de patógenos o altere la resistencia a patógenos adquirida en la infancia temprano, se ha demostrado en humanos que las enfermedades isquémicas producidas por lo anterior se pueden revertir con el uso de probióticos (Gil, 2014).

1.3 PROBIÓTICOS

Para sobrellevar los diferentes problemas que se presentan en la piscicultura se ha estudiado el uso de suplementos alimenticios que promuevan el crecimiento y eviten la aparición de enfermedades (Cruz 2015), sin que se eleve drásticamente el costo de la producción. Unas de las opciones más tentativas son los probióticos, ya que son

microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidades adecuadas como aditivo en el alimento o suplemento alimenticio tienen efectos benéficos sobre el equilibrio intestinal y la salud del huésped (Sayes, Leyton y Riquelme, 2016). Se ha demostrado que la incorporación de probióticos en la dieta permite mayor incremento en la respuesta inmune y mayor tasa de crecimiento, sea en talla o peso y por tanto mayor índice de sobrevivencia (Seo, Shin y Lee, 2011)

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe resistir a barreras donde se incluye tolerancia a pH, sales biliares del 0,3%, NaCl 2% resistencia a la acción de enzimas como lisozimas y tripsinas (Gutierrez, 2016) y una de las más importante es que el microorganismo permanezca en estado viable y en cantidades suficiente una vez superada las barreras ácida y biliar, además debe demostrar actividad antimicrobiana y resistencia a antibióticos y sean reconocidos como seguros (Rozo, 2016; Arteaga *et al.* 2017).

El uso de probióticos resulta factible, ya que promueve el balance intestinal, el cual afecta directamente la asimilación de nutrientes y proporcionar bienestar animal, lo cual se ve reflejado directamente en parámetros zootécnicos (Rojas *et al.* 2016) Además se ha demostrado que muchos cambios ontogénicos de diferentes tipos de peces se evidencian por cambios en la características histológicas y anatómicas del tracto digestivo (Munoz *et al.* 2015)

Así fue como la FAO designo el uso de los probióticos como una alternativa importante para la mejora de la calidad del medio ambiente acuático (Ramírez *et al.* 2011; FAO 2014). La mayoría de probióticos propuestos para la acuicultura pertenecen a las bacterias ácidos lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*); a los géneros *Vibrio* (*V. alginoliticus*), *Bacillus* y *Pseudomonas* principalmente (Gutierrez, 2016; García y Gutiérrez, 2015); estas bacterias utilizan mecanismos metabólicos para generar impacto positivo en los peces.

Además de beneficios nutricionales y sanitarios, ciertos probióticos, al añadirse al agua pueden desempeñar un papel muy importante de la descomposición de la materia orgánica, reducción de niveles de nitrógeno y fosfatos, así como el control de los niveles de amonio, nitritos y sulfuro de (Nayak, 2010; Gutierrez, 2016).

1.3.1 *Bacillus* sp. Desde el punto de vista microbiológico, las bacterias del género *Bacillus* se consideran gram positivas. Tienen forma de bastoncillo y están agrupadas en cadena, son anaerobias estrictas o facultativas, son productoras de sustancias antimicrobianas así como de enzimas hidrolasas, como probióticos pertenecientes a este género, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. natto*. (Milián, Pérez y Bocourt, 2008). Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuida en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en suelo; este género comprende una amplia diversidad de tipos fisiológicos, donde se destacan características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de planta y

animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros; además su capacidad para la producción de antibióticos, la nitrificación, la desnitrificación, la fijación de nitrógeno, la litotrofia facultativa, la acidofilia, la alcalofilia, la psicofilia, la termofilia y el parasitismo, ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes (Tejera, Rojas y Heydrich, 2011; Calvo y Zúñiga, 2010; Milián, Pérez y Bocourt, 2008).

Ha habido un éxito importante con el uso de miembros formadores de endosporas como aditivos alimentarios y mejoramiento de la calidad del agua para peces (Newaj-Fyzul, Al-Harbi y Austin, 2014); la habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes les da la ventaja competitiva en el medio donde se encuentren, su síntesis se produce ante las condiciones de limitación de nutrientes, agua y oxígeno, que a su vez constituyen un sistema de protección ante condiciones ambientales adversas. (Calvo y Zúñiga 2010; Milián, Pérez y Bocourt 2008).

1.4 IMPREGNACIÓN

La impregnación es una de las operaciones unitarias que implican sistemas sólido líquido, que aprovecha la microestructura porosa de la matriz del alimento y junto a una acción capilar y gradientes de presión se produce un mecanismo hidrodinámico; el cual promueve cambios fisicoquímicos del producto y por tanto sus atributos de calidad y estabilidad se verán afectados; esta operación permite la incorporación de componentes activos generando un valor agregado en el producto final. La cantidad de líquido impregnado en la estructura, dependerá de la presión de trabajo y la porosidad de la matriz. La viabilidad del proceso se fundamenta en la porosidad estructural de los alimentos, al ser variable en muchos alimentos condicionan la elección de la técnica de impregnación a utilizar (Fernández, 2007; López, 2003; Ostos, Díaz y Suarez, 2012).

1.4.1 Impregnación atmosférica. La aspersion es un sistema de riego que distribuye un líquido en forma de lluvia (gotas), también llamado atomización, este proceso se inicia bombeando líquido a gran velocidad a través de una conducción cerrada y presión determinada, forzando el líquido a pasar por una boquilla (aspersor), la energía potencial del líquido, junto con la geometría de la boquilla hace que el líquido emerja como pequeñas gotas. Existen diferentes formas de orificios en boquillas la cual generan diferentes patrones de aspersion, la distribución y el tamaño de la gota será dependiente del tipo de boquilla (Ostos, Díaz y Suarez, 2012).

1.4.2 Impregnación al vacío. Es una herramienta usada en la ingeniería de alimentos que utiliza las propiedades de la matriz estructural del alimento, para lograr cambios que mejoren propiedades funcionales o sensoriales, por lo cual se requiere pellets de alta duración y estructura porosa para una aplicación efectiva (Monzón, 2010; Lamichhane *et al.*, 2015). Esta herramienta utiliza la técnica de impregnación al vacío que incorpora componentes funcionales (probiótico) en el alimento a través de un mecanismo hidrodinámico (HDM); que ocurre en el momento de la desgasificación de la estructura porosa en función de la presión aplicada lo cual facilita una mayor inclusión del probiótico

gracias a un proceso de transporte físico de capilaridad del líquido dentro de un sistema sólido, poroso, gracias a un gradiente de presión que se crea al momento de que se alcance el equilibrio entre presiones (Marín, Cortés y Montoya, 2010; Monzón, 2010).

Según Kumar (2017) La impregnación al vacío es una tecnología reciente, por la cual se puede introducir varios tipos de soluciones en la estructura porosa de variados alimentos y productos no alimentarios. La transferencia de masa a la que se da lugar en este proceso es el resultado de una diferencia de presiones inducida mecánicamente y que permite llenar grandes volúmenes de espacios intracelulares de frutas y verduras favoreciendo los aspectos físicos químicos.

Los usos de la impregnación al vacío en la alimentación animal y humana son variados, Se utiliza esta técnica, por ejemplo, para el enriquecimiento de productos vegetales con componentes deseados que mejoran el sabor, prolongar la vida útil, o enriquecen con vitaminas y minerales que le den un valor agregado al producto o solo lo llevan hacia el camino de la innovación (Oblitas y Rojas, 2017; Kumar, 2017).

En la actualidad la impregnación al vacío se utiliza para obtener una penetración rápida de compuestos solvatados en tejidos vegetales junto con un perfil de concentración homogénea de los solutos en los productos finales. Está demostrado que es un método no solo útil si no también eficaz de enriquecer el tejido de frutas y vegetales con solutos deseados como antioxidantes, sabores, citoprotectores, vitaminas minerales y probiótico. (Oblitas y Rojas 2017).

1.5 MARCO HISTÓRICO

A lo largo del tiempo no existen muchas investigaciones que aborden la impregnación y la impregnación al vacío de probióticos en un concentrado extruido para tilapias, de hecho Betoret *et al.*, (2003) intenta combinar los efectos beneficiosos de los probióticos con la aspersión al vacío, aplicando esta tecnología en frutas y verduras, con excelentes resultados ya que se concluye que utilizando este método evaluado se puede introducir células microbianas en la matriz o tejido de la manzana por medio de la aspersión al vacío, además que se llega a una concentración del probióticos igual a los productos lácteos comerciales.

Por otro lado Lamichhane., 2015 evaluó la capacidad de tres bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de peces, *Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus Plantarum* CLFP 238 y *Lactobacillus fermentum* CLFP 242, para inhibir la adhesión al intestino de varios patógenos de peces, bajo condiciones *in vitro*. Las conclusiones fueron que sol *Lactococcus Lactis* CLFP 101 redujo la adhesión de todos los patógenos de peces evaluados; mientras que las la cepa de *Lactobacillus Plantarum* CLFP 238 redujo la adhesión de *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.

Arellano (2013) evaluó el efecto del probiótico sobre el crecimiento de alevinos de paco, *Piaractus brachypomus* confinados en jaulas durante la segunda fase de alevinaje. Los resultados mostraron el efecto positivo que genera sobre los alevinos el concentrado impregnado con el probiótico, además que la inclusión de microorganismos probióticos en la dieta mejora los índices de producción de peces y los rendimientos para el acuicultor.

Rozo (2016) evaluó el tiempo de suministro de probióticos en tilapia roja (*Oreochromis spp*), permitiendo mantener durante más tiempo una alta viabilidad de permanencia de microorganismos benéficos. La adición *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Circulams*; se hizo mediante mezclado directo y los resultados evidenciaron la capacidad que tienen los microorganismos benéficos para combatir enfermedades patógenas producidas por invasores como *Aeromona Hydorphila*, se destacó la generación de enzimas digestivas por parte del *Bacillus* y así obtener una mayor absorción de nutrientes.

Según Sun *et al.* (2010) los *Bacillus pumilus* y *Bacillus Claus* tienen actividad antagónica en el intestino del peces de crecimiento rápido siendo un inmuno-estimulante importante que conduce a una mayor supervivencia contra la infección por *A. Hydrophila*. Hay mejoras significativas en el aumento de peso o en la tasa de crecimiento específico de los grupos alimentados con probióticos, pero si se una mejora significativa de la relación de conversión alimenticia.

Raida *et al.* (2003) afirma que observo que la administración de alimento para trucha suplementado con esporas de *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Lichenifomirs* mejoraba la resistencia a la infección *Y. ruckeri*. Además mostraron una mejora significativa en la relación de alimentación de alimentación, la tasa de crecimiento específico y la relación de eficiencia proteica.

Raida *et al.* (2003) ha demostrado La actividad probiotica del *Bacillus Subtilis* en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*); el efecto inhibitor del *B. Subtilis* sobre la *A. hydrophila* y *P. fluorescens* es positivo; también demostro que la tasa de supervivencia y la ganancia de peso corporal aumentaron significativamente en los peces que recibieron *B. Subtilis*.

Janko y Weinborn (2007) menciona que un estudio realizado en Colombia, en el que adicionaron probióticos a base de bacterias como *Bacillus* y *Lactobacillus* y levaduras del género *Saccharomyces*, en el alimento extruido para tilapia roja en fase de engorde, demostró un efecto positivo en incremento de peso, longitud estándar final y conversión alimenticia.

2. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos de esta investigación se adquirió una cepa aislada por el grupo de investigación ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca, la cual demostró tener características probióticas (Anexo A); la fase experimental consistió en dos etapas, primero se realizó la impregnación del *Bacillus* sp 074, mediante los procesos de impregnación por aspersión a presión atmosférica e impregnación por aspersión al vacío. La segunda etapa consistió en evaluar la viabilidad del microorganismo impregnado con respecto al tiempo durante 30 días a dos temperaturas (15°C y 25°C).

2.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, km 2 vía vereda las guacas, con el acompañamiento del grupo de investigación de Aprovechamiento de Subproductos Residuos y desechos Agroindustriales (ASUBAGROIN).

2.2 IMPREGNACIÓN DEL MICROORGANISMO *BACILLUS* SP 074 POR EL PROCESO DE IMPREGNACIÓN POR ASPERSIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y PRESIÓN DE VACÍO

Para el cumplimiento de este objetivo se realizó en primera instancia una cinética de crecimiento del *Bacillus* sp 074, que nos permitió un punto de partida para analizar su comportamiento, obtener información necesaria y realizar una solución de aspersión del *Bacillus* sp 074. Con el fin de realizar las diferentes operaciones que hacen parte del proceso de impregnación como se describe a continuación.

2.2.1 Activación del *Bacillus* sp 074. Se tomó una muestra del *Bacillus* sp 074 y se inóculo en 10 mL de caldo nutritivo (scharlau), se llevó a un Shaker thermo scientific con control de temperatura, que permitió la incubación a 37 °C con agitación a 180 rpm durante 24 horas (Castañeda y Sanchez 2016).

2.2.2 Conservación del *Bacillus* sp 074 concentrado en glicerol. Con el fin de partir siempre desde un mismo punto, se realizó conservación del *Bacillus* sp 074 en glicerol.

Para poder obtener el *Bacillus* sp 074 crio-conservado, primero se activó el *Bacillus* sp 074 (numeral 2.2.1), pasado el tiempo de activación; se procede a tomar 1 mL del *Bacillus* sp 074 ya activado y se vertió en 9 mL de caldo nutritivo; donde se dejó en incubación por 12 horas en un Shaker a 37 ° C y 180 rpm(Castañeda y Sanchez 2016). Se realizó un segundo pase con 3 mL de caldo nutritivo incubado anteriormente que se llevó a un erlenmeyer con 27 mL de caldo, que es llevado a incubación por 6 horas (180 rpm). El

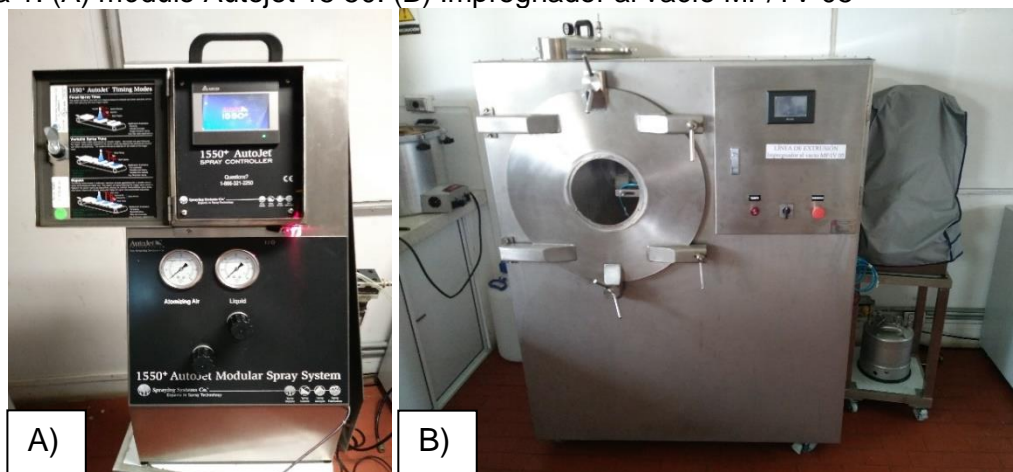
paso final se realizó vertiendo los 30 mL del inóculo a un erlenmeyer con 220 mL de caldo, obteniendo 250 mL de inóculo. Este se llevó a incubación a 37 °C y 180 rpm durante 6 horas. Posterior se centrifugó los 250 mL a 8000 rpm y 4 °C por 10 min y se obtuvo la biomasa del microorganismo concentrada. Que se almacenó en viales donde se depositaron 500 µL de la biomasa obtenida con 500 µL glicerol al 60%. Para poder almacenarlos en refrigeración para su conservación a -4 °C.(Caicedo y Chacón 2010).

2.2.3 Cinética de crecimiento. Se realizó una curva de crecimiento del *Bacillus* sp 074, con el fin de observar el comportamiento en sus diferentes fases. Se tomó 1 mL del *Bacillus* sp 074 crio-conservado y se vertió en 9 mL de caldo nutritivo, dejándolo a 37 °C y 180 rpm por 6 horas en el Shaker con control de temperatura. Pasada las 6 horas se realizó un pase de 1 mL a 9 mL de caldo nutritivo para dejarlo por 12 horas a 37 °C y 180 rpm, el siguiente paso fue tomar 3 mL del inóculo y se depositaron en 27mL de caldo nutritivo para encubarse por 6 horas a 37°C y 180 rpm, pasadas las 6 horas se depositan los 30 mL del inoculo en 270 mL de caldo nutritivo. A partir de aquí se procedió a realizar una fermentación tipo batch; donde se tomaron medidas de 6 mL cada 45 min durante 6 horas y así se midió el crecimiento microbiano mediante densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro shimadzu 1800. Al mismo tiempo se determinó el crecimiento por recuento en placa (Gómez et al. 2004; Castañeda y Sanchez 2016; Caicedo y Chacón 2010).

2.2.4 Proceso de impregnación del *Bacillus* sp 074, por aspersión a presión atmosférica y presión de vacío sobre alimento extruido para tilapia en fase de engorde. Este objetivo requirió de los siguientes pasos.

2.2.4.1 Adecuación del equipo Autojet 1550 e impregnador al vacío MP/TV 05. Para realizar el proceso de impregnación es necesario adecuar dos equipos esenciales. El equipo Autojet 1550 que permite controlar el proceso de impregnación y el impregnador al vacío MP/TV 05 donde se pueden manejar y controlar la presión.

Figura 1. (A) módulo Autojet 15 50. (B) Impregnador al vacío MP/TV 05



Adicional al módulo de aspersión Autojet 1550 se tiene un tanque presurizado en acero inoxidable 304 modelo 22140 con capacidad de 7,6 L, en cuyo interior se depositó el inóculo necesario para realizar la impregnación (figura 2); además se encuentra una boquilla de la serie PulsaJet AA1000AUH-10-NC (figura 3) de accionar hidráulico y con punta estándar de aspersión plana UniJet 11001, encargada de atomizar el microorganismo suspendido en agua, para el caso de la impregnación se cuenta con una canastilla de acero inoxidable donde se deposita el concentrado a impregnar (figura 4) que se encuentra ubicada dentro del impregnador al vacío MP/TV 05. Finalizada la adecuación del sistema de aspersión se procede a su utilización según lo indica el manual (Anexo B).

Figura 2. Tanque presurizado 22140



Figura 3. (A) Boquilla hidráulica Pulsa Jet AA10000UH-10-NC. (B) Punta estándar de aspersión plana UniJet 11001

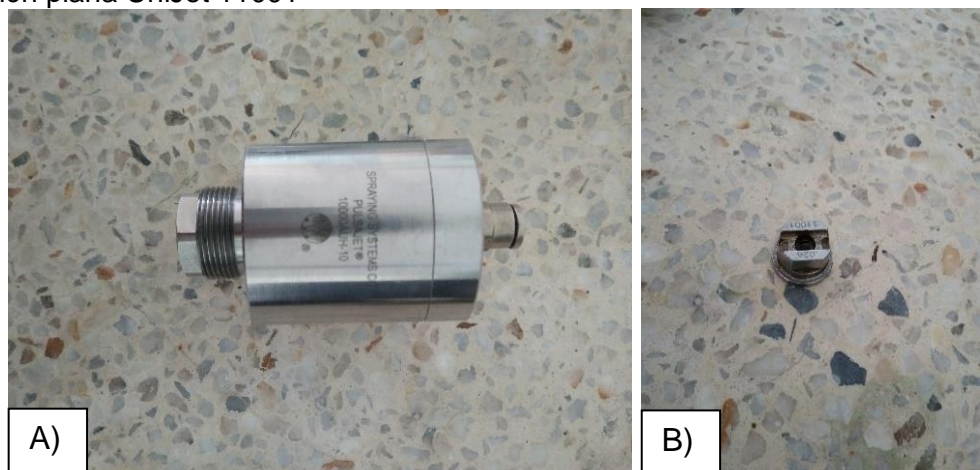


Figura 4. Canastilla en acero inoxidable



2.2.4.2 Preparación del inóculo. El *Bacillus* sp 074 crio-conservado se activó como lo indica el numeral 2.2.1. Posteriormente se tomaron unas muestras para llevarlas al espectrofotómetro shimadzu 1800 donde se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, para verificar la concentración del microorganismo. Terminada la fermentación tipo batch se dispone a realizar la centrifugación del microorganismo en una centrifuga Z326K refrigerada HERMLE a 4°C, 8000rpm durante 10 minutos, donde pasados los 10 minutos se descartó el sobrenadante y se procedió a re suspender el microorganismo concentrado en un volumen de agua de 300 mL (Castañeda y Sanchez 2016).

2.2.4.3 Proceso de aspersión del *Bacillus* sp 074 por aspersión a presión atmosférica y presión de vacío. La impregnación por aspersión atmosférica y presión de vacío se llevó a cabo en el impregnador MP/TV05 donde se depositaron 500 g de concentrado para tilapia en fase de engorde en la canastilla y se cerró la cámara de vacío, luego se conectó junto al Autojet 1550. Se controlaron variables como tiempo de aspersión (41.38 segundos o 0.69 minutos); velocidad de canastilla (30%), frecuencia de (5000); ciclo de trabajo (20%); para el caso de la impregnación atmosférica no se manipulo la variable presión, pero para la aspersión al vacío se controló la presión a (-506 mbar). Estos valores se obtuvieron de estudios preliminares realizados a los equipos de impregnación Autojet 1550 y al impregnador al vacío MP/TV05.

2.2.4.4 Secado de concentrado. Posterior a la impregnación del microorganismo en el concentrado para peces, se llevó a un secador Binder con una temperatura de 40 °C, hasta alcanzar una humedad inferior al 10%.

2.2.5 Análisis estadístico. Con el fin de conocer el método de impregnación más apropiado para el microorganismo se aplicó un diseño completamente al azar por medio del software IBM SPSS Statistics versión 23. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA)

con una significancia ($p < 0,05$). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: presión en el proceso de impregnación (presión atmosférica y presión de vacío (-506 mbar)). Como variables de respuesta se tuvieron en cuenta propiedades físicas (durabilidad, flotabilidad), y propiedades biológicas (Unidades formadoras de colonia UFC, digestibilidad) (Cuadro 1).

Todas pruebas realizadas tuvieron tres replicas con triple repetición, para el caso del blanco solo se corrieron pruebas físicas (durabilidad, flotabilidad).

Cuadro 1. Diseño experimental ANOVA para determinar el mejor tratamiento

Factor	Niveles	Variables de respuesta
Condición de presión en el proceso de impregnación	Presión ambiente Presión de vacío	<p>Propiedades biológicas:</p> <p>Unidades formadoras de colonias (UFC), Resistencia a pH bajo condiciones controladas</p> <p>Propiedades físicas:</p> <p>Durabilidad, flotabilidad.</p>

2.2.6 Pruebas biológicas. A continuación se describen las pruebas biológicas que se evaluaron en el concentrado (tabla 1).

2.2.6.1 Unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Con el fin de obtener una muestra representativa y homogénea se aplicó el método de cuarteo (García 2012). La muestra macerada fue transferida a un erlenmeyer con 90 mL de agua peptonada hasta diluciones seriadas de 1×10^{-6} . Mediante la técnica de siembra en superficie; se llevó el microorganismo a cajas de Petri con agar nutritivo, incubando a 37 °C. Se realizó el recuento en placa pasadas las 12 horas de incubación. (Marín, Cortés y Montoya, 2010; Caicedo y Chacón, 2010).

2.2.6.2 Simulación de resistencia de pH. Inicialmente a 10 g de la muestra macerada del concentrado impregnado se le adicionaron 50 mL de la solución tampón fosfato (0.1M y pH 6) y 15 mL de ácido clorhídrico (0,6 M), se ajustó la solución a pH 2.0 con ayuda de HCl (1M) o NaOH (0,5M). Se lleva a agitación suave y constante a 37°C durante 2 horas en el baño maría con agitación. Pasadas 2 horas se adicionaron 20 mL de solución tampón fosfato (0.2 M y pH 6.8) y 10 mL de NaOH (0.6M), se ajustó a pH 6.8 con ayuda de NaOH (0.5M) o HCl (1M), y se llevó a baño maría a 37°C por 4 horas. Terminadas las cuatro horas se tomó 1 mL de cada erlenmeyer para proceder a realizar las diluciones sucesivas en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada y así sembrar en cajas de Petri con agar nutritivo mediante la siembra en superficie. Se incubaron a 37 °C para su posterior recuento en placa.

2.2.7 Pruebas físicas. A continuación se describen las pruebas físicas evaluadas en el concentrado impregnado (cuadro 1).

2.2.7.1 Flotabilidad. Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Cruz Castellón., (2015), a la cual se le realizaron ajustes. Se tomaron 100 pellets seleccionados por cuarteo, los cuales se depositaron en beakers con 500 mL de agua destilada por un periodo de 20 minutos, al final del periodo de tiempo se cuantificaron los pellets que se mantuvieron en superficie y se determinó el porcentaje de flotabilidad:

$$F = \frac{Ft}{Fi} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde F es la flotabilidad, Ft es la cantidad del pellets suspendidos después de terminada la prueba y Fi es la cantidad de pellets al inicio de la prueba.

2.2.7.2 Durabilidad. Para la prueba de durabilidad se utilizó el durabilímetro New Holmen NHP 100, con una balanza de precisión KERN, se pesaron 100 gramos del concentrado impregnado y se colocaron en el durabilímetro siguiendo las instrucciones del equipo; se utilizó un tiempo de prueba de 60 segundos. Pasados los 60 segundos se procedió a pesar de nuevo la muestra y los datos se analizaron con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{Mi}{Mf} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde D es el porcentaje de durabilidad, Mi es el peso inicial de la muestra y Mf es el peso final de la muestra.

2.3 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL *Bacillus* sp. 074 IMPREGNADO EN EL ALIMENTO EXTRUIDO PARA TILAPIAS EN FASE DE ENGORDE, BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Para el desarrollo de este objetivo se seleccionó el mejor tratamiento entre aspersión a presión atmosférica y aspersión a presión de vacío. Se aplicó un diseño experimental con medidas repetitivas respecto al tiempo, y se evaluaron dos factores intrasujetos (tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento), por un periodo de 30 días, durante el cual se realizó un seguimiento cada 15 días con el fin de determinar la viabilidad del *Bacillus* sp. 074.

Las variables de respuesta analizadas fueron unidades formadoras de colonia y digestibilidad para el caso de pruebas biológicas; flotabilidad y durabilidad para el caso de

pruebas físicas; metodologías explicadas en los numerales 2.1.5.1, 2.1.5.2, 2.1.5.3 y 2.1.5.4.

Cuadro 2. Diseño experimental de medidas repetitivas con respecto al tiempo

Factores		Variables de respuesta
Intrasujetos		Variabes físicas: flotabilidad, durabilidad Variabes biológicas: unidades formadoras de colonia(UFC/kg) Resistencia a pH bajo condiciones del tracto digestivo.
Tiempo de almacenamiento (Días)	Temperatura de almacenamiento (°C)	
0	15 y 25	
15		
30		

2.3.1 Análisis estadístico. Para el procesamiento de los resultados del segundo objetivo se utilizó un diseño de medidas repetitivas con respecto al tiempo; que se analizó por medio del paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 23, donde se contó con un nivel de significancia (α) de 0,05.

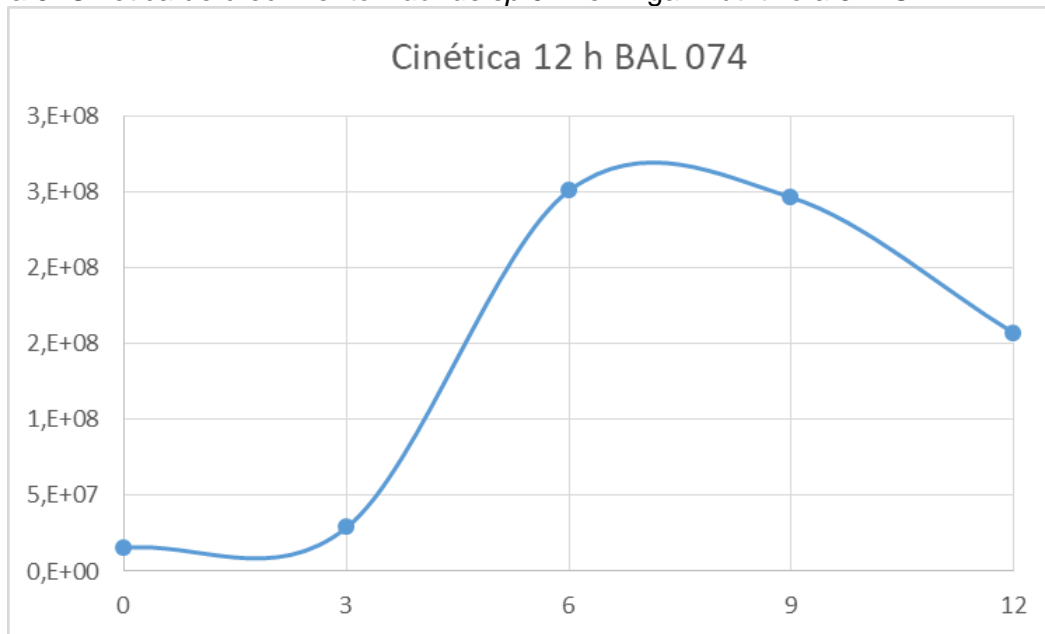
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los siguientes apartados se presentan los resultados, así como una discusión general de la investigación realizada.

3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO IMPREGNACIÓN DEL MICROORGANISMO *Bacillus sp* 074 A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y PRESIÓN DE VACÍO SOBRE EL CONCENTRADO EXTRUIDO PARA TILAPIAS EN FASE DE ENGORDE

3.1.1 Cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos arrojaron un comportamiento sigmoideal (Anexo C); en primer lugar la fase de adaptación se logra en un periodo de 3 horas con una concentración inicial de $1,52 \times 10^7$ UFC/mL, por consiguiente la fase exponencial comenzó a partir de las 3 horas hasta las 6 horas, observándose un incremento en la biomasa pasando de $2,87 \times 10^7$ UFC/mL a $2,02 \times 10^8$ UFC/mL, esto reflejado en la figura 5 (Anexo C). Su vez la fase estacionaria ocurre desde las 6 horas hasta las nueve horas ya que la población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial; las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos o por que se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por combinación de las causas anteriores; esto se ve reflejado en la poca diferencia que se presentó en el crecimiento de la población mientras transcurría el tiempo de fermentación; es así como partir de las 9 horas se observa una disminución progresiva en el número de células viables, es por ello que cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase muerte (Prescott, Harley y Klein, 2013; Dos Santos, 2007; Zocorro, 2015).

Figura 5. Cinética de crecimiento *Bacillus sp* 074 en Agar Nutritivo a 37 °C



Dado que después de seis horas no se observa ningún cambio diferencial en UFC/mL y además tiene como consecuencia la disminución de la velocidad de crecimiento (Anexo C). La fase más importante y de interés es la fase logarítmica o exponencial, dado que es aquella donde el microorganismo crece y se divide hasta el nivel máximo posible (Calvo y Zúñiga, 2010; Rojas *et al.*, 2010); por consiguiente se estableció esta fase como la indicada para poder realizar la impregnación del *Bacillus sp* 074 en el alimento concentrado para peces. Además que en esta fase la población es más uniforme en términos físicos y químicos; por ello, los cultivos en fase exponencial se utilizan normalmente en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, Harley y Klein, 2013).

El tiempo de generación es de $0,46 \text{ h}^{-1}$, el cual fue calculado con la pendiente de la fase de crecimiento (Anexo C), este valor encontrado contrasta con los publicados por Prescott., (2002), de $0,43 \text{ h}^{-1}$ y $0,33 \text{ h}^{-1}$ de Rojas., (2010); cuyos medios fueron modificados y optimizados respectivamente, además las fases exponenciales fueron inferiores a 9 horas, variando así el tiempo de fermentación entre ellas (Zocorro, 2015).

3.1.2 Proceso de impregnación por aspersión del *Bacillus sp* 074 a presión atmosférica y presión de vacío sobre el alimento extruido para tilapia en fase de engorde. La prueba ANOVA indico que el factor presión es significativo ($p < 0,05$) para las variables unidades formadoras de colonias, como también para resistencia a pH ($p < 0,05$); en cambio para la variable flotabilidad no presento diferencia alguna; los resultados de las variables se muestran en el cuadro 3.

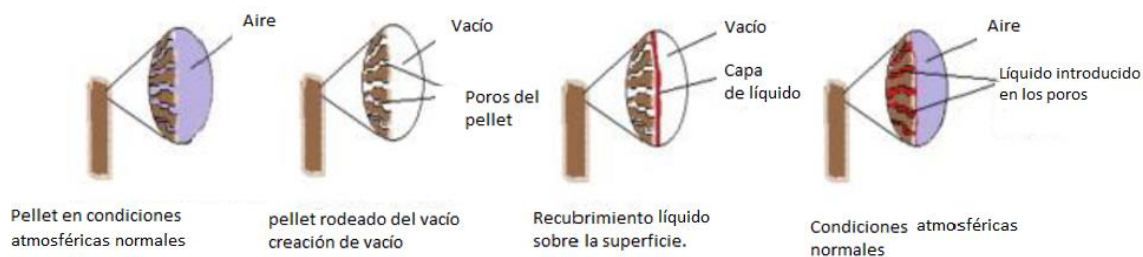
Cuadro 3. Análisis estadístico primer objetivo

Variables	Tratamiento	Media (LogUFC/g)
UFC/g	Atmosférico	6,032 a \pm 0,065
	Vacío	8,344 b \pm 0,073
Resistencia a pH	Atmosférico	4,043 a \pm 0,074
	Vacío	6,199 b \pm 0,078
Durabilidad	Atmosférico	96,295 a \pm 0,273
	Vacío	97,894 b \pm 0,449
Flotabilidad	Atmosférico	99,888 a \pm 0,333
	Vacío	99,666 b \pm 0,500

El factor presión con una significancia de $P < 0.05$ tiene un valor diferencial en el conteo de las células viables (Anexo D), ya que para la impregnación por aspersión a presión atmosférica arrojo un valor promedio de $6,033 \pm 0,065$; comparado con la impregnación por aspersión a presión de vacío cuyo valor fue de $8,344 \pm 0,073$, teniendo en cuenta que se partió de la misma cantidad de inóculo y concentración del *Bacillus* 074, y las mismas condiciones de operación. Los valores obtenidos de $1 \cdot 10^8$ concuerdan con Sun *et al.*, (2010), que reporta valores por encima de $1 \cdot 10^6$ son beneficiosos para la salud del pez.

Esta diferencia se puede haber dado ya que con la impregnación al vacío se efectúa un intercambio físico de aire dentro de los poros del concentrado con un líquido como se observa en la figura 6 (Lamichhane *et al.* 2015).

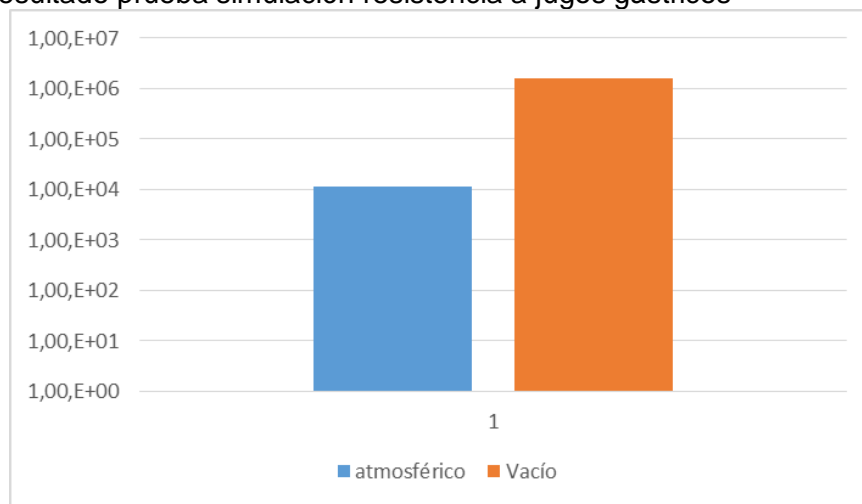
Figura 6. Ilustración del principio del revestimiento al vacío



Este principio de intercambio aire-líquido favoreció el conteo viable de UFC/mL del *Bacillus* sp 074 impregnado dentro del pellet, debido a que se permitió la inclusión de una mayor proporción de probiótico en su interior Lamichhane., 2015. Considera que este tipo de impregnación protege de cierta manera al microorganismos, y a su vez limita la exposición del microorganismo a condiciones ambientales. Por estas razones se puede decir que el proceso de impregnación al vacío se consideró como el mejor tratamiento y de ahí su diferencia significativa en Unidades formadoras de colonia.

Por otro lado el conteo de células viables en la resistencia a pH fue otra variable que obtuvo diferencia significativa ($P < 0.05$); ya que en la impregnación a presión atmosférica se evidencio una resistencia por parte del *Bacillus* sp 074 del 67% con valores de $1,124E+04 \pm 0,074$ UFC/mL en comparación con la impregnación a presión de vacío cuya resistencia fue del 74% presentando valores de $1,636E+06 \pm 0,078$ UFC/mL (figura 7).el porcentaje de disminución que se presentó se debe que los microorganismos probióticos que ingresen al organismo deben soportar la acción de la barrera acida del estómago que puede llegar a pH 2.0,(Pérez et al. 2015), por lo tanto llevar el microorganismo a pH 2 genera la mayor disminución en la concentración por el stress que le produce tal acides, según lo reporta (Rondón *et al.* 2008).

Figura 7. Resultado prueba simulación resistencia a jugos gástricos



Además Lamichhane 2015 opina que la aspersión al vacío del probiótico dentro del pellet puede ser útil para proteger este microorganismo del entorno hostil del tracto digestivo, sin embargo hay pocos estudios para verificar que tan exitoso sería la aspersión al vacío para este caso. La capacidad del *Bacillus* sp 074 a resistir niveles de pH ácidos, es una cualidad que se pueden considerar como ventaja en las bacterias del género *Bacillus*, ya que poseen diversos mecanismos de defensas. Una de ellas es la habilidad de producir endosporas protectoras; permitiendo al microorganismo tolerar condiciones ambientales externas desfavorables tales como: temperatura, Humedad. Radiación y acides extremas (Portillo y Martínez 2009; Zuñiga 2009; Calvo y Zúñiga 2010).

El *Bacillus* sp 074 demostró ser resistente a condiciones de pH ácidos simulados, teniendo un conteo de células viables después de 6 horas, los resultados del presente experimento coincide con los encontrados por (Dante et al. 2012; Arteaga et al. 2017; Pérez et al. 2015), ellos evaluaron cepas del género *Bacillus*; donde dichas cepas demostraron la capacidad que tienen de resistir a condiciones de pH ácidos. Estas capacidades de ser metabólicamente diversos aumentan la posibilidad de que el *Bacillus* sp 074 pueda llegar a una colonización en el tracto digestivo del pez, donde iría a desarrollar su actividad probiótica, contribuyendo al mantenimiento de un adecuado balance en la microbiota intestinal.

En cuanto a durabilidad existió una diferencia significativa ($P < 0.05$) de los dos tratamientos con respecto al blanco; presentando valores dureza en la impregnación atmosférica de $96,295 \pm 0,273$ y una dureza de $97,894 \pm 0,449$ para el concentrado impregnado a presión de vacío, con el blanco se presentó una dureza de $94,943 \pm 0,030$. Ahora según Lamichhane., 2015 la aspersión al vacío permite una mayor inclusión de probióticos dentro de las celdas del pellet sin comprometer la durabilidad del pellet; esta afirmación es consistente con este hallazgo.

Este resultado se pudo haber dado ya que se consiguió una penetración uniforme del líquido debido a la mayor área superficial impregnada; la adición de humedad post pellet favorece a la unión de los ingredientes gracias a la lignina que se extiende como adhesivo natural por todo el producto durante el proceso de impregnación; un secado lento permite que el flujo de humedad desde el interior hacia afuera sea adecuado y no se presente choques térmico que pueda crear fisuras, este flujo de humedad lento ayuda a mantener el producto aglomerado en el momento en el que se enfría y así poder mejorar la durabilidad del concentrado (Lamichhane, 2015; Moncada, 1999; Zapata, 2016), estas serían las razones por las cuales la impregnación favoreció la durabilidad de los pellets con respecto al blanco y en una mejor instancia a los pellets impregnados al vacío.

Para el caso de la flotabilidad, el factor presión no fue influyente; ya que bajo cualquier tipo de aspersión no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto al blanco; los datos obtenidos para flotabilidad por aspersión a presión atmosférica fue de $99,888\% \pm 0,192$; para aspersión por presión al vacío fue de $99,666\% \pm 0,385$ y del blanco fueron de $97,777 \pm 1,271$; estos resultados se dan ya sea con la impregnación a presión atmosférica o a presión de vacío.

Los tipos de impregnación evaluados no modifican la estructura física del pellet y por lo tanto no tienen efecto en la flotabilidad. De todas maneras esta es una variable importante a la hora de producir concentrado extruido para peces; es uno de los criterios para evaluar el alimento y debe estar por encima del 85% según Mancilla y Caceres., 2012; los resultados obtenidos en flotabilidad en nuestra investigación están por encima del 90%, lo que nos indica que la tecnología por aspersión es favorable para esta variable y no tendrá ningún inconveniente en estudios futuros que se quieran realizar y pueda ser aceptada por los consumidores.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL MICROORGANISMO IMPREGNADO ALMACENADO A CONDICIONES DE TEMPERATURA AMBIENTE EN EL CONCENTRADO PARA TILAPIAS

Para la evaluación de la viabilidad en anaquel de la cepa caracterizada como *Bacillus* sp 074 impregnada al vacío en un concentrado extruido para tilapia se analizaron dos factores intrasujetos: el primero fue tiempo de almacenamiento; evaluación realizada durante un mes tomando muestras a los 0, 15 y 30 días respectivamente. El segundo factor fue temperatura de almacenamiento, factor que se evaluó a 15°C temperatura promedio Silvia, Cauca, y 25°C temperatura promedio Popayán, Cauca (Andres y Realpe 2018) (Ver Anexo F).

El cuadro 9 resume la interacción entre factores para cada una de las variables que se tuvieron en cuenta en la investigación.

3.2.1 Análisis estadístico. En cuanto a la variable de respuesta unidades formadoras de colonias (UFC/g), la prueba de análisis ANOVA con medidas repetitivas en el tiempo demostró que existe diferencia estadísticamente significativa para el factor tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$) y no existe para el factor temperatura de almacenamiento ($P > 0.05$), además para la combinación de temperatura vs tiempo no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) (Ver Anexo F).

Esto demuestra que la vida útil del *Bacillus* sp 074 en el producto almacenado se ve directamente afectada por el tiempo presentando al día 30 una disminución del 13 % para ambas temperaturas de almacenamiento (Anexo F). Esta disminución se debió a que el *Bacillus* sp 074 se expone a contacto directo con factores como oxígeno y humedad (Tripathi y Giri 2014); lo cual vuelve vulnerable al microorganismo a sufrir estrés por la prolongación en el contacto con estos factores con respecto al tiempo. (Aly et al. 2008). Aun así la concentración pasados los 30 días resulta la adecuada según lo reporta (Rodríguez y Chávez 2018), que referencia valores por encima de $1 \cdot 10^6$ para que sea considerado probiótico.

Además al ver las tablas de comparación por pares para las variables tiempo (Anexo F) y temperatura vs tiempo (Anexo F) podemos observar en ambas que no hay diferencias

significativas ($P > 0.05$) entre los días 0 y 15, pero si hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los días 0 y 30, también existe una significancia ($p < 0.05$) entre los días 15 y 30. Lo que evidencia que la pérdida de la variable unidades formadoras de colonia solo fue significativa para el día 30 presentando valores de $7,119 \pm 0,104$ para 15°C en almacenamiento y de $7,125 \pm 0,057$ para 25°C .

Además que la viabilidad del microorganismo se ve más afectada por el tiempo que por la temperatura, algo que se corrobora en el cuadro de comparación por pares para la variable tiempo vs temperatura (Anexo F) de las variables resistencia a pH y unidades formadoras de colonia. Donde podemos notar que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) para las temperaturas 15°C y 25°C en los días 0 y 30, pero existe una diferencia significativa ($P < 0,05$) para el día 15, por ende el rango de temperatura de almacenamiento que se analizó, no genera alguna diferencia en la vida útil del microorganismo impregnado en el concentrado pasados 30 días. Esto es debido a que el rango de temperatura de supervivencia del género *Bacillus* va desde una temperatura mínima de 10°C a 15°C a una temperatura máxima de 40 a 45°C (Cruz, 2018), lo cual genera un ambiente adecuado para la supervivencia del microorganismo.

Aun así Astesana *et al.* (2018)., demostró que a menor temperatura de anaquel mayor viabilidad del pro biótico; en cuanto al tiempo de almacenamiento, este resulta importante en la conservación de la viabilidad del microorganismo y sus características probióticas como lo es la tolerancia a variaciones de pH (Rondón *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2008).

Para la variable de respuesta resistencia a pH, la prueba de ANOVA con medidas repetitivas arrojó que en el factor tiempo existen diferencias significativas ($P < 0,05$), Además para la combinación temperatura vs tiempo existieron diferencias significativas ($P < 0,05$). (Ver Anexo F).

Cuando revisamos el cuadro de comparación por pares de la variable tiempo (Anexo F), encontramos un comportamiento similar a la misma tabla de comparación por pares de la variable de respuesta UFC/g (Anexo F), donde no existen diferencias significativa en para los días 0 y 15 ($P > 0,05$), pero si existe diferencia significativa ($P < 0.05$) para los días 0 y 30 y 15 y 30.

Ahora cuando revisamos el cuadro de comparación por pares para la variable temperatura vs tiempo (Anexo F) podemos observar que para la temperatura de almacenamiento de 15°C existe diferencia significativa ($P < 0.05$) para los días 0 y 15, 15 y 30 y 0 y 30. Pero para la temperatura de almacenamiento a 25°C no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) para los días 0 y 15, Aun así para los días 15 y 30, 0 y 30 existieron diferencias significativas ($P < 0,05$). Lo cual nos indica que la temperatura de almacenamiento no afecto la viabilidad del *Bacillus* sp 074 impregnado en el concentrado, Además que no afecto la capacidad de tolerancia a variaciones de pH del *Bacillus* sp 074 (Astesana *et al.*, 2018; Rondón *et al.*, 2008), como se puede observar de igual manera en el cuadro 4 de comparación por pares tiempo vs temperatura.

Cuadro 4. Tiempo vs temperatura variable Resistencia a pH

Comparaciones por pares							
Medida: Resistencia a pH							
Tiempo	(I) Temperatura	(J) Temperatura	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia	
						Límite inferior	Límite superior
0 días	15 °C	25 °C	,031	,064	,645	-,132	,195
	25 °C	15 °C	-,031	,064	,645	-,195	,132
15 días	15 °C	25 °C	,115	,019	,002	,067	,164
	25 °C	15 °C	-,115	,019	,002	-,164	-,067
30 días	15 °C	25 °C	-,016	,015	,323	-,055	,022
	25 °C	15 °C	,016	,015	,323	-,022	,055

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Para la variable de respuesta durabilidad, la prueba de ANOVA con medidas repetitivas (Anexo F) nos arrojó que no existen valores significativos ($P > 0,05$) para los factores tiempo, temperatura. Además que en las relaciones temperatura vs. Tiempo (Cuadro 5) y tiempo vs temperatura (tabla 6); tampoco se presentó alguna diferencia significativa ($P > 0,05$). Esto nos demuestra que la temperatura de almacenamiento y el tiempo analizado no generan alguna alteración en la durabilidad del concentrado impregnado al vacío.

Cuadro 5. Temperatura vs tiempo variable durabilidad

Comparaciones por pares							
Medida: Durabilidad							
Temperatura	Tiempo (días)	Tiempo (días)	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia	
						Límite inferior	Límite superior
15 °C	0	15	,000	,000	.	,000	,000
		30	,210	,492	1,000	-3,551	3,971
	15	0	,000	,000	.	,000	,000
		30	,210	,492	1,000	-3,551	3,971
	30	0	-,210	,492	1,000	-3,971	3,551
		15	-,210	,492	1,000	-3,971	3,551
25 °C	0	15	,000	,000	.	,000	,000
		30	,920	,197	,129	-,589	2,429
	15	0	,000	,000	.	,000	,000
		30	,920	,197	,129	-,589	2,429
	30	0	-,920	,197	,129	-2,429	,589
		15	-,920	,197	,129	-2,429	,589

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

La durabilidad obtenida pasados los treinta días de almacenamiento fue de 97,83 % para 15 °C y de 97,36 % para 25 °C valores que resultan adecuados según lo reporta (Joaquín 2013) quien reporta valores del 96 % en la prueba de durabilidad e indica que un 80 % resulta aceptable. (Ver Anexo F).

Cuadro 6. Tiempo vs temperatura variable durabilidad

Comparaciones por pares							
Medida: Durabilidad							
Tiempo	(I) Temperatura	(J) Temperatura	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia	
						Límite inferior	Límite superior
0 días	15	25	-,240	,113	,167	-,725	,245
	25	15	,240	,113	,167	-,245	,725
15 días	15	25	-,240	,113	,167	-,725	,245
	15	25	,240	,113	,167	-,245	,725
30 días	25	15	,470	,235	,184	-,543	1,483
	15	25	-,470	,235	,184	-1,483	,543
Basadas en las medias marginales estimadas.							
a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.							

Con respecto a la variable flotabilidad la prueba de ANOVA con medidas repetitivas respecto al tiempo nos arrojó que las variables tiempo y temperatura evaluados (Anexo F) presentaron una diferencia significativa ($p < 0,05$). Para el cuadro 7 de comparación por pares con respecto a temperatura vs tiempo, se observó que, a 25 °C en almacenamiento del concentrado la flotabilidad no presentó una medida significativa ($P > 0,05$) en los treinta días analizados, pero a 15 °C de almacenamiento pasados los treinta días se observó una diferencia significativa ($P < 0,05$). Pero en el cuadro 8 de comparación por pares respecto a tiempo vs temperatura, se observó que para las dos temperaturas pasados los 30 días de almacenamiento no se presentó diferencia significativa ($p < 0,05$); Lo que indica que la flotabilidad no se ve afectada por la temperatura en el tiempo de almacenamiento.

Cuadro 7. Comparación por pares que respecta a temperatura vs tiempo variable flotabilidad

Comparaciones por pares							
Medida: Flotabilidad							
Temperatura	Tiempo (días)	Tiempo (días)	Diferencia de medias (I- J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia.	
						Límite inferior	Límite superior
15 °C	0	15	,000	,000	.	,000	,000
		30	-4,444	,766	,001	-6,754	-2,135
	15	0	,000	,000	.	,000	,000
		30	-4,444	,766	,001	-6,754	-2,135
	30	0	4,444	,766	,001	2,135	6,754
		15	4,444	,766	,001	2,135	6,754

Cuadro 7. (Continuación)

Comparaciones por pares							
Medida: Flotabilidad							
Temperatura	Tiempo (días)	Tiempo (días)	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia.	
						Límite inferior	Límite superior
25 °C	0	15	,000	,000	.	,000	,000
		30	,000	,000	.	,000	,000
	15	0	,000	,000	.	,000	,000
		30	,000	,000	.	,000	,000
	30	0	,000	,000	.	,000	,000
		15	,000	,000	.	,000	,000

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Cuadro 8. Comparación por pares que respecta a tiempo vs temperatura variable flotabilidad

Comparaciones por pares							
Medida: Flotabilidad							
Tiempo	(I) Temperatura	(J) Temperatura	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia	
						Límite inferior	Límite superior
0 días	15 ° C	25 ° C	-5,111	,351	,000	-5,921	-4,301
	25 ° C	15 ° C	5,111	,351	,000	4,301	5,921
15 días	15 ° C	25 ° C	-5,111	,351	,000	-5,921	-4,301
	25 ° C	15 ° C	5,111	,351	,000	4,301	5,921
30 días	15 ° C	25 ° C	-,667	,667	,347	-2,204	,871
	25 ° C	15 ° C	,667	,667	,347	-,871	2,204

Basadas en las medias marginales estimadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

Cuadro 9. Resumen de interacción entre factores para las diferentes variables

Tiempo vs temperatura de almacenamiento	15 °C	25°C	15 °C	25°C
Factores	Unidades Formadoras de colonia		Resistencia a pH	
0 y 15 días	NE	NE	NE	NE
15 y 30 días	E	E	E	E
0 y 30 días	E	E	E	E
Factores	Flotabilidad		Durabilidad	
0 y 15 días	E	E	E	E
15 y 30 días	NE	NE	NE	NE
0 y 30 días	NE	NE	NE	NE

E= existe diferencia significativa **NE**= no existe diferencia significativa

El concentrado impregnado al vacío que se evaluó pasados los treinta días de almacenamiento presentó valores de flotabilidad del 100% para 25°C en anaquel y de 99,33% para 15°C en anaquel (Anexo F), estos valores son los adecuados según propone (Mancilla y Cáceres 2012), cuyos criterios hablan, que una flotabilidad mayor al 85% es necesaria para la aceptación del producto, y porcentajes inferiores llevan al rechazo del mismo comercialmente; los valores obtenidos pasados los 30 días superan este valor mínimo de aceptación y por ende son comercialmente viables.

4. CONCLUSIONES

El mejor tratamiento de impregnación por aspersión del *Bacillus* sp 074 sobre un alimento extruido para tilapia; fue la impregnación por aspersión al vacío, ya que con este tipo de impregnación fue con la que se obtuvo una mayor concentración del microorganismo, y presento los mejores resultados en las variables físicas flotabilidad y durabilidad.

Las temperaturas de almacenamiento evaluadas no demuestran diferencias significativas para las variables biológicas, de igual manera tampoco presenta diferencia para las variables físicas flotabilidad y durabilidad evaluadas en el concentrado impregnado.

El tiempo de almacenamiento afecta la viabilidad y la capacidad de resistencia a jugos gástricos del *Bacillus* sp 074. En cambio Propiedades físicas como durabilidad y flotabilidad no se ven afectadas.

5. RECOMENDACIONES

Evaluar un medio de cultivo alternativo, el cual disminuya los costos de producción del microorganismo en un posible escalamiento.

Evaluar en tilapias la capacidad probiótica del *Bacillus* sp 074 impregnado al vacío, para así observar los beneficios in-vivo.

Evaluar la tecnología de micro-encapsulación, como un método alternativo de impregnación del *Bacillus* sp 074.

Analizar una mezcla de microorganismos de características probióticas y evaluarlas bajo la misma tecnología de impregnación al vacío.

Probar la tecnología de impregnación al vacío en el concentrado de otras especies o en su defecto para las otras fases de crecimiento de la tilapia.

BIBLIOGRAFÍA

ALY, S.M.; ABDEL-GALIL AHMED, Y.; ABDEL-AZIZ GHAREEB, A. y MOHAMED, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. En: *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, vol. 25, no. 1-2, pág. 128-136. ISSN 10504648. DOI 10.1016/j.fsi.2008.03.013.

ARELLANO, H. Efecto del probiótico em (microorganismos eficientes) sobre el crecimiento de alevinos de paco. *Escuela de Ciencias Biológicas: 2013* [en línea], pp. 17-18-19. Disponible en internet en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2426/EfectodelprobióticoEM%28microorganismoseficientes%29sobrelcrecimiento dealevinosdepaco%2CPiaractus brachypomus.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ARENAS, N.E. y MELO, V.M. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia : Revisión sistemática. En: *Infectio*, 2018, vol. 22, no. 2, pág. 110-119. ISSN 24223794. DOI 10.22354/in.v22i2.717.

ARTEAGA, F.; LÓPEZ, M.; LAURENCIO, M.; RONDÓN, A.; MILIÁN, G.; BARRIOS, V.; BOCOURT, R.; LIMÓN, S. El y ECUADOR, M. Selection and identification of *Bacillus* spp. isolates from the digestive tract of backyard chicken, with probiotic potential. En: *Pastos y forrajes*, 2017, vol. 40, no. 1, pp. 55-64.

ASTESANA, D.M.; ZIMMERMANN, J.A.; FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.; BLAJMAN, J.; BERISVIL, A.P.; ROMERO, A.; SIGNORINI, M.; ROSMINI, M. y SOTO, L. Desarrollo de macrocápsulas con cepas de *Lactobacillus* spp. en alta densidad como suplemento nutricional de terneros jóvenes y análisis de su viabilidad durante el almacenamiento. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 2018, vol. 50, no. 3, pág. 1-10. ISSN 03257541. DOI 10.1016/j.ram.2017.11.001.

BALTAZAR, P.M. *Manual Cultivo de Tilapia* [en línea]. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero-FONDEPES: Perú: 2014 [citado febrero, 2018]. Disponible en internet en: http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_tilapia.pdf.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.; PAGÁN, M.; GARCÍA, M.; GRAS, M.; MARTÍNEZ, J. y FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. En: *Journal of Food Engineering*, 2003, vol. 56, no. 2-3, pág. 273-277. ISSN 02608774. DOI 10.1016/S0260-8774(02)00268-6.

CABRERA, C.E.; GÓMEZ, R.F. y ZÚÑIGA, A.E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. En: *Colombia Médica*, 2007, vol. 38, no. 2, pág. 149-158.

CAICEDO, S. y CHACÓN, J. Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *alternaria* spp. en *brassica oleracea* var *italica* y técnicas de conservación de cepas. Tesis Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana. Sde Quito: 2017, pág. 275.

CALVO, P. y ZÚÑIGA, D. Physiological characterization of *Bacillus* spp. Strains from potato (*Solanum tuberosum*) rhizosphere. En: *Ecología Aplicada*, 2010, vol. 9, no. 1. ISSN 1726-2216.

CASTAÑEDA, E. y SANCHEZ, L.C. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. En: *Nova*, 2016, vol. 13, no. 26, pág. 53-65.

DANTE, I.; MÉNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, D.; PUENTE, L.; GARCÍA, F. y SALGADO, R. Tecnología Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. En: *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 2012, no. 11, pág. 115-122. >

DAWOOD, M. y KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. En: *Aquaculture*, 2016, vol. 454, pág. 243-251.

DELGADO, I. Colombia crecimiento, confianza y oportunidad para invertir [en línea]. Procolombia.co ®: 2013 [citado marzo, 2018]. Disponible en internet en: <http://inviertaencolombia.com.co/ACUICULTURA2016.pdf>.

DOS SANTOS, A. Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Tesos Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. España: 2007.

FAO, 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 28 mayo 2016]. ISBN 9789253082759. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s/index.html%5Cnhttp://www.fao.org/3/7870db4d-2558-4714-9c56-0cf49f010f3e/i3720s.pdf%5Cnhttp://www.fao.org/fishery/sofia/es>.

FERNÁNDEZ, P. Estudio de la impregnación a vacío de miel y su efecto en atributos de calidad de hojuelas de manzana (var. Granny Smith) deshidratadas. Tesis Ingeniería de Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago: 2007.

GARCÍA, Á. Muestreo y envío de muestras. Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Universitaria, Coyoacán: 2012, pág. 6.

GARCÍA, J. Selección de extractos vegetales como inhibidores de bacterias patógenas de peces y utilización en acuicultura. Tesis Maestría en acuicultura y pesca. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Puerto Real: 2018.

GARCÍA, R. y GUTIÉRREZ, L. El uso de los probióticos en la industria acuícola. Artículo de revisión. En: Revista Alimentos Hoy, 2015, vol. 23, no. 36, pág. 165-178.

GIL, L.P. La resistencia a antibióticos: El efecto colateral. En: Horizonte Sanitario, 2014, vol. 11, no. 1, pág. 24-31. ISSN 1665-3262.

GODOY, C.; MOJICA, H.O.; RIOS, V.M. y MENDOZA, D. El Rol de la Mujer en la Pesca y La Acuicultura en Chile, Colombia, Paraguay y Perú [en línea]. Santiago: 2016 [citado junio, 2018]. Disponible en internet en: www.consejoanticorruptcion.cl/informe.

GÓMEZ, C.J.; PARRA, M.E.; ROMERO, M.A. y VARGAS, E.M. Revista de ingeniería. En: Revista de Ingeniería, 2004, no. 20, pág. 23-33.

GUTIERREZ, A. Caracterización de cepas de Bacillus sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis sp*) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación. Tesis Doctoral en biología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín: 2016.

GUTIERREZ, Y.; MOCHCCO, O.; DÍAZ, J. y CHAÑI, O. Efecto de la inclusión del probiótico comercial “amino plus” en el alimento extruido sobre el crecimiento del pez híbrido “pacotana” (*Piaractus brachypomus* ♀ x *Colossoma macropomum* ♂). 2006.

HUALINGA, K. Biólogo acuicultor [en línea] 2013. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/304/1/TESISPROBIOTICOEM-AGUA.pdf>.

JANKO, J. y WEINBORN, A. Desarrollo de Alimento con Probiótico de Alto Impacto Productivo para la industria del salmón. Chile: 2007.

JHA, D.; BHUJEL, R. y ANAL, A. Dietary supplementation of probiotics improves survival and growth of Rohu (*Labeo rohita* Ham.) hatchlings and fry in outdoor tanks. En: Aquaculture, 2015, vol. 435, pág. 475-479.

JOAQUIN, P. Peletización y calidad del pelet [en línea]. Ergomix ®: 2013, pp. 8-11. [citado: 11, junio, 2018]. Disponible en internet en: http://www.avideter.com/ftp_public/A3100114.pdf.

KUBITZA, A.F. Nutrición y sanidad en el cultivo de tilapia [en línea]. Agroindustria argentina ©: 2013 [citado 31, mayo, 2016]. Disponible en internet en: [http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivos/130910_Nutrición y Sanidad en cultivos de tilapias.pdf](http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivos/130910_Nutrición_y_Sanidad_en_cultivos_de_tilapias.pdf).

KUMAR, P. Optimization of Vacuum Impregnation Conditions Using Response Surface Methodology for soaking of pantoa. En: International Journal of Chemical Studies IJCS, 2017, vol. 6, no. 61, pág. 1103-1107.

LAMICHHANE, S. Valuation of vacuum post-pellet applications of bioactives to broiler feed on efficacy and protected delivery. Tesis Maestría en Ciencias. University of Saskatchewan. Saskatoon, SK: 2015.

LAMICHHANE, S., SAHTOUT, K., SMILLIE, J. y SCOTT, T.A. Vacuum coating of pelleted feed for broilers: Opportunities and challenges. En: Animal Feed Science and Technology, 2015, vol. 200, no. 1, pág. 1-7. ISSN 03778401. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2014.11.015.

LÓPEZ, Y. impregnación de lactobacillus en productos de manzana. Capítulo 1 introducción [en línea], pp. 1-37. 2003 [citado 1, junio, 2016]. Disponible en internet en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/santacruz_l_ya/capitulo1.pdf.

MANCILLA, M. y CACERES, J.D.C. Factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de tilapia roja (*Oreochromis sp*) ubicada en la granja de Guatiguara (uis) Municipio de Piedecuesta, Departamento de Santander. Tesis Profesional en Producción Industrial. Universidad Industrial de Santander. Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. Bucaramanga: 2012.

MARÍN, Z.T.; CORTÉS, M. y MONTOYA, O.I. uchuva (*Physalis peruviana L.*) Ecotipo colombia, mínimamente procesada inoculada con la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 mediante la técnica de impregnación a vacío. En: Revista chilena de nutrición, 2010, vol. 37, no. 4, pág. 461-472.

MARTÍNEZ, P.; IBÁÑEZ, A.L.; MONROY HERMOSILLO, O.A. y RAMÍREZ SAAD, H.C. Use of probiotics in aquaculture. En: ISRN microbiology, 2012, pág. 916845. ISSN 2090-7478. DOI 10.5402/2012/916845.

MELOROSE, J.; PERROY, R. y CAREAS, S. Avances de acuicultura y pesca en Colombia. En: Avances de acuicultura y pesca, 2015, vol. 5. ISBN 9788578110796.

MERINO, C.M.; BONILLA, S.P.; BAGES, F. y FLORES NAVA, A. Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia [en línea]. En: 102 insumos AUNAP, 2013. Disponible en:

internet en: <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-Colombia.pdf>.

MILIÁN, G., PÉREZ, M. y BOCOURT, R. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp y de sus endosporas en la producción avícola. En: Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 2008, vol. 42, no. 2, pág. 117-122pp. ISSN 2079-3472.

MONCADA, L., F. Puntos de control en la fabricación de alimentos balanceados para acuicultura (3: Simposium de Nutrición Acuicola. México: 1999).

MONZÓN, C.C. Influencia del método de secado en parámetros de calidad relacionados con la estructura y el color de manzana y fresa deshidratadas [en línea]. 2010 [citado 6, marzo, 2018]. Disponible en internet en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1932/tesisUPV2345.pdf>.

MUNOZ, A., SEGOVIA, E., FUTAGAWA, M., MARCHANT, C. y FLORES, H. Coeficientes de digestibilidad total y de proteínas en alimentos experimentales para juveniles de *Oplegnathus insignis* (Kner, 1867) (Perciformes, Oplegnathidae). En: Latin American Journal of Aquatic Research, 2015, vol. 43, no. 2, pág. 304-308.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. En: Fish and Shellfish Immunology, 2010, vol. 29, no. 1, pág. 2-14. ISSN 10504648. DOI 10.1016/j.fsi.2010.02.017.

NEWAJ-FYZUL, A., AL-HARBI, A.H. y AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture [en línea]. 2014 [citado 14, agosto, 2017]. ISBN 00448486 (ISSN). Disponible en: http://ac.els-cdn.com/S0044848613004249/1-s2.0-S0044848613004249-main.pdf?_tid=c1e51b9a-813d-11e7-88ca-00000aab0f02&acdnat=1502748970_a2a525519e2141f906c56cfefaff8a2b.

OBLITAS, J.F. y ROJAS, E.L. Optimizing the incorporation of aloe vera in yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) Through vacuum impregnation using response surface. En: Ingeniería y Universidad, 2017, vol. 22, no. 1. ISSN 2011-2769. DOI 10.11144/Javeriana.iyu22-1.oiv.

OSTOS, S.L., DIAZ, A.C. y SUAREZ, H., 2012. Evaluación de diferentes condiciones de proceso en la fortificación de mango (Tommy Atkins) con calcio mediante impregnación a vacío. En: Revista Chilena de Nutrición, 2012, vol. 39, no. 3, pág. 181-190.

PANDIYAN, P., BALARAMAN, D., THIRUNAVUKKARASU, R., GEORGE, E.G.J., SUBARAMANIYAN, K., MANIKKAM, S. y SADAYAPPAN, B. Probiotics in aquaculture.

En: Drug Invention Today, 2013, vol. 5, no. 1, pág. 55-59. ISSN 09757619. DOI 10.1016/j.dit.2013.03.003.

PÉREZ, M., MILIAN FLORIDO, G., RONDON, A., BOCOURT SALABRRIA, R. y TORRES, V. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. En: Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 2015.

PINEDA LÓPEZ, C. y VÉLEZ SALAS, S. Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*. Tesis Ingeniería en Biotecnología. Universidad de la Amazonia. Facultad de Ingeniería y ciencias agropecuarias. 2018.

PORTILLO, J.E. y MARTINEZ, A.L. Obtención de amilasa por cinética de crecimiento con el microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando como medio de cultivo cascara de papa. 2009, pág. 1-116.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P. y KLEIN, D.A. Microbiología. En: Journal of Chemical Information and Modeling, 2013, vol. 53, no. 9, pp. 1689-1699. ISSN 1098-6596. DOI 10.1017/CBO9781107415324.004.

RAIDA, M.K., LARSEN, J.L., NIELSEN, M.E. y BUCHMANN, K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). en: Journal of Fish Diseases, 2003, vol. 26, no. 8, pp. 495-498. ISSN 01407775. DOI 10.1046/j.1365-2761.2003.00480.x.

RAMÍREZ, J.C., ULLOA, P., VELÁZQUEZ, M., ULLOA, J. y ARCE, F. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente, 2011, vol. 2, no. 7, pág. 16.

RODRÍGUEZ, G. y CHÁVEZ, A., 2018. Proteolytic activity and peptide concentration of goat milk yogurt added with probiotics. January, vol. 43, no. 1.

ROJAS, D.I.O., MONROY DOSTA, M. del C., MEJÍA, J.C., PARTIDA, A.H. y TORREZ, A.R. Intestinal microbiota of ornamental fish *Carassius auratus*. En: Scientific Journal of Animal Science, 2016, vol. 5, no. 2, pág. 239-245. DOI 10.14196/SJAS.V5I2.2107.

ROJAS, N.E., VÁZQUEZ-CRUZ, C., SÁNCHEZ-ALONSO, P. y SANSINENEA-ROYANO, E. Análisis poblacional de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en interacción in

vitro con bacterias del suelo. En: *Agrociencia*, 2010, vol. 44, no. 8, pp. 941-953. ISSN 14053195.

RONDÓN, A., SAMANIEGO, L., BOCOURT, R., RODRÍGUEZ, S., MILIÁN, G., RANILLA, M., LAURENCIO y PÉREZ, M., 2008. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos. En: *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2008, vol. 6, no. 1, pág. 56-63. ISSN 1135-8122. DOI 10.1080/11358120809487628.

RONSON, J.Á. y MEDINA, R. Probióticos en la acuicultura. En: *Ciencia y Mar*, 2002, pág. 45-49.

ROZO, C.M. Determinar el tiempo de suministro de probióticos que permita mantener durante más tiempo una alta viabilidad de permanencia de microorganismos benéficos. [en línea]. 2016 [citado 20, junio, 2018]. Disponible en: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/20821/13092046_2016.pdf?sequence=1.

SAYES, C., LEYTON, Y. y RIQUELME, C.E. Bacteria *Pseudoalteromonas* sp. con potencial probiótico para cultivos larvales de peces. En: *Am. J. Aquat. Res*, 2016, vol. 44, no. 1, pág. 76-84. DOI 10.3856/vol44-issue1-fulltext-8.

SEO, J.Y., SHIN, I.S. y LEE, S.M., 2011. Effect of dietary inclusion of various plant ingredients as an alternative for *Sargassum thunbergii* on growth and body composition of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. En: *Aquaculture Nutrition*, 2011, vol. 17, no. 5, pág. 549-556. ISSN 13535773. DOI 10.1111/j.1365-2095.2010.00849.x.

SUN, Y.Z., YANG, H.L., MA, R.L. y LIN, W.Y. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. En: *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, vol. 29, no. 5, pág. 803-809. ISSN 10504648. DOI 10.1016/j.fsi.2010.07.018.

Sustitución del aceite de pescado en piensos para *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae): Efectos en el crecimiento, parámetros nutritivos, composición corporal y calidad del filete. Tesis Maestría en Acuicultura. Universitat Politècnica de Valencia. España: 2015

TECHNOLOGY, S. AutoJet ® Model 1550 Modular spray system automatic spray control made simple new modular spray system optimizes the performance of your automatic spray nozzles [en línea] 2015.[citado 27, junio, 2018]. Disponible en internet en: https://www.spray.com.mx/literature_pdfs/B626F_AutoJet_1550-plus_Modular_Spray_System.pdf.

TEJERA, B., ROJAS, M. y HEYDRICH, M. Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. En: Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2011, vol. 42, no. 3, pág. 131-138. ISSN 0253-5688.

TRIPATHI, M. y GIRI, S. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. En: Journal of Functional Foods, 2014, vol. 9, no. 1, pág. 225-241. ISSN 17564646. DOI 10.1016/j.jff.2014.04.030.

TROCHEZ REALPE, A. Planeación estratégica: Análisis a partir de una organización familiar y producción en sociedad en la piscicultura los corrales. Tesis Especialización en Gerencia Estratégica de Mercadeo. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Administrativas, Contables, Económicas y de Negocios. Popayán, 2018.

VÁZQUEZ, J.P. Manual para la producción de supermachos de tilapia del Nilo. 2010, pág. 49.

ZAPATA, A.J., 2016. Investigación del efecto de los parámetros de elaboración de pellets de cusco de palma en el proceso de pirólisis [en línea]. 2016. Disponible en internet en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/55986/>.

ZOCORRO, G., 2015. Editorial Las Líneas de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. [en línea]. 2015. [Citado 30, abril, 2018]. Disponible en internet en: [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5073/Zegarra Zuñiga%2C Gabi Zocorro.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5073/Zegarra_Zuñiga%2C_Gabi_Zocorro.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

ZUÑIGA, O., 2009. Crecimiento de Bacillus pumilus productor de la auxina AIA, como base para formular un biofertilizante [en línea]. 2009 [citado 30, abril, 2018], pág. 60. Disponible en internet en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/faz.95c/doc/faz.95c.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A. Resultado obtenido a pruebas de barrera por parte del *Bacillus sp 074*, resultados obtenidos por el grupo de investigación ASUBAGROIN de la Universidad Del Cauca.

A1. PRUEBA DE ANTAGONISMO

A1.1 Resultado de la resistencia medidas en milímetros (mm) del halo de inhibición por parte del *Bacillus sp 074*.

ANTAGONISMO					
Halos de inhibición (mm)	DS	Halos de inhibición (mm)	DS	Halos de inhibición (mm)	DS
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473		<i>A. salmonicida</i> ATCC 39659		<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	
21	± 2 ^{GF}	21	± 3 ^A	18	± 2 ^{CB}

A2. PRUEBA RESISTENCIA A SALES BILIARES.

A2.1 resultado del *Bacillus sp 074* a la resistencia a sales biliares.

Bacteria	Medio sin sales biliares		Medio con sales biliares		Jugos gástricos	
	% supervivencia	DS	% supervivencia	DS	% supervivencia	DS
Tolerancia a sales biliares						
BAC074	212	±23 ^C	1	±0 ^C	0,013	±0,002 ^B

A3. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

A3.1 resultado del *Bacillus sp 074* a sensibilidad a antibióticos.

Sensibilidad a antibióticos por bacterias seleccionadas.	BAC	DS
ANT	74	
OT	42	± 2 ^A
C	28	± 0,9 ^B
SXT	29,4	±1,0 ^B
CN	31	± 2 ^B
S	28	± 5 ^B
AML	27,4	± 0,5 ^B
AMP	27,6	±0,8 ^B

A4. IDENTIFICACION MOLECULAR.

Identificación molecular de las bacterias probióticas seleccionadas.		
IDENTIFICACIÓN	%ID	BD
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NCBI

A5. RESISTENCIA A pH.

Bacteria	%	DS	%	DS	%	DS	%	DS	%	DS	%	DS		
	Cto*		Cto*		Cto*		Cto*		Cto*		Cto*		Cto*	
	pH1		pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
BAC074	0	± 0 ^M	1,7	± 0,6 ^{KL}	11,7	± 0,6 ^{HJIG}	368	± 29 ^E	547	± 41 ^{OPOSTRN}	513	± 29 ^{USVT}	424	± 30 ^{KIJ}

ANEXO B. Protocolo general de equipos para la impregnación por aspersión

B1. EQUIPOS

Los principales equipos que son usados para la impregnación se muestran en la figura 1. (A) Módulo de aspersión Autojet 1150, (B) Impregnador al vacío MP/TV05 y (C) compresor DeWalt D2002M.

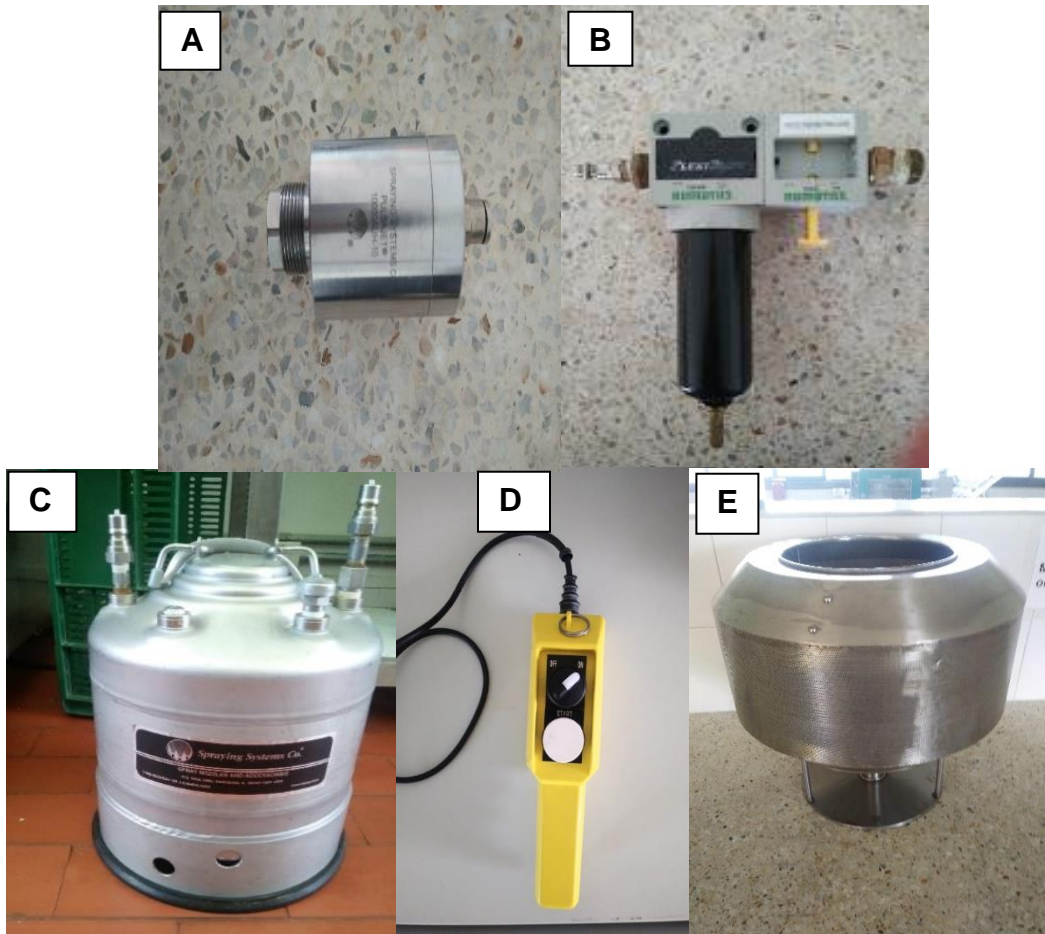
Figura 1. Módulo de aspersión Autojet, impregnador al vacío y compresor DeWalt.



B2. INSTRUMENTOS

Como instrumentos se requieren (figura 2). (A) Boquilla hidráulica PulsaJet AA10000AUH-10-NC, (B) filtro de aire Numatics, (C) tanque presurizado 22140 (D) mando de gatillo y (E) canastilla de acero.

Figura 2. Instrumento del sistema de aspersión.



B3. PROCEDIMIENTO PARA ENSAMBLAR EL EQUIPO DE ASPERSIÓN E INSTRUMENTOS.

Garantizar las condiciones de lavado y desinfectado de la totalidad de equipos, instrumentos y accesorios es indispensable para obtener mejores resultados en el proceso.

B3.1. SISTEMA DE APERSION AUTOJET 1550

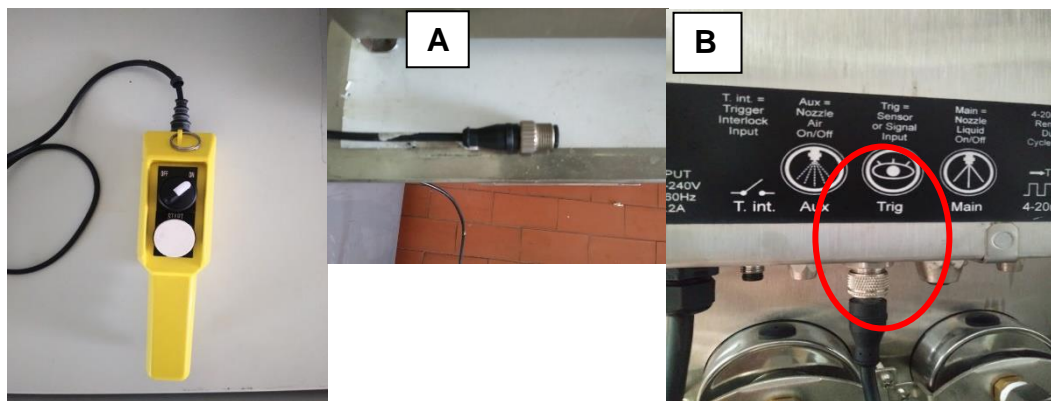
3.3.1 colocar primero la punta de aspersión (A) y luego el empaque plástico blanco (B) en la tapa rosca (C), para luego proceder a ensamblar la tapa rosca en la boquilla de aspersión (D).

Figura 3. Boquilla de aspersión (D).



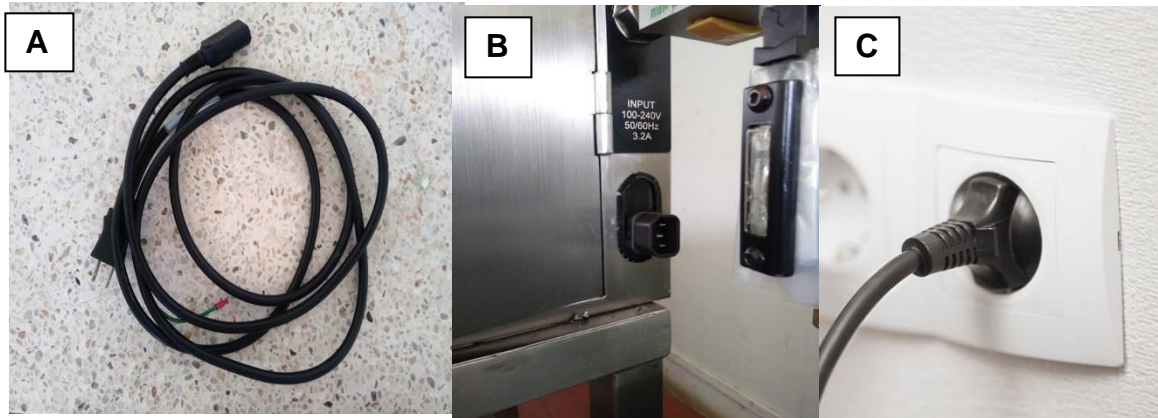
3.1.2 Conectar el cable del gatillo de acción manual (A), en la entrada Trig (sensor or signal input) (B) que se encuentra en la parte interior trasera del módulo AutoJet 1550.

Figura 4. Conexión del gatillo de acción manual al módulo AutoJet.



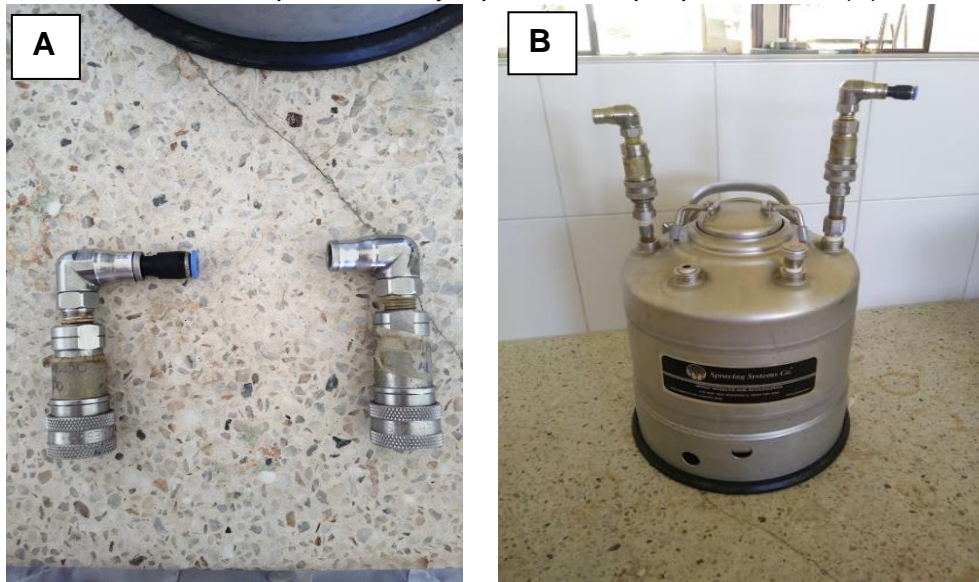
3.1.3 conectar el cable de poder del módulo del AutoJet (A), primero a la entrada de poder del módulo Auto Jet (B) y en segunda instancia a un toma corriente 110 V.

Figura 5. Conexión del módulo AutoJet al toma corriente 110V.



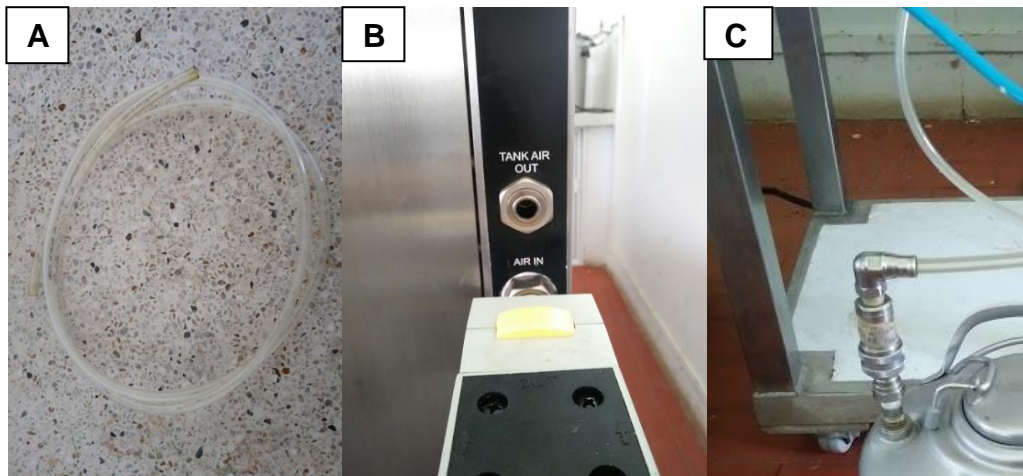
3.1.4 conectar los acoples rápidos (A) al tanque presurizado, donde el acople con terminación de color azul es para la salida del líquido del tanque presurizado y el acople con terminación de color metálico es para la entrada de aire al tanque presurizado.

Figura 5. Conexión de los acoples de aire y líquido al tanque presurizado (B).



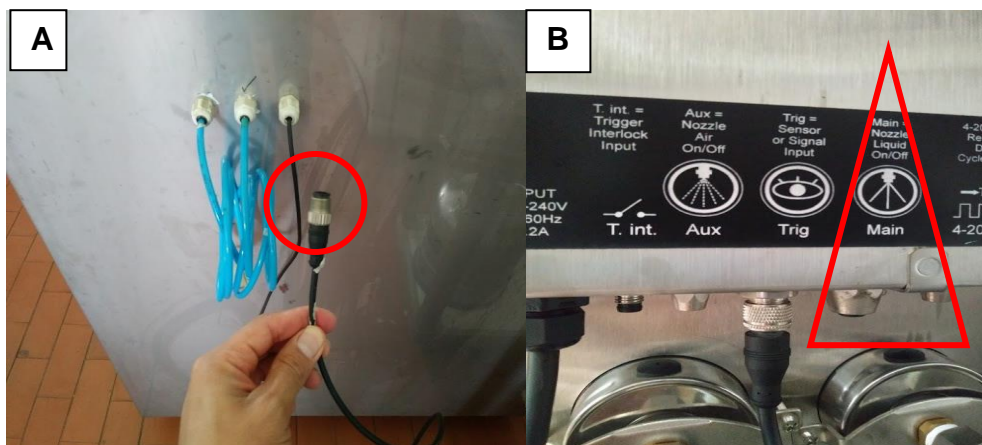
3.1.5 conectar la manguera Transparente (A) a la salida de aire del módulo de aspersión (B) (TANK AIR OUT); y en el otro extremo de la conexión conectarlo al acople de entrada de aire al tanque presurizado (C) y acoplar al tanque presurizado.

Figura 6. Conexión manguera entrada de aire.



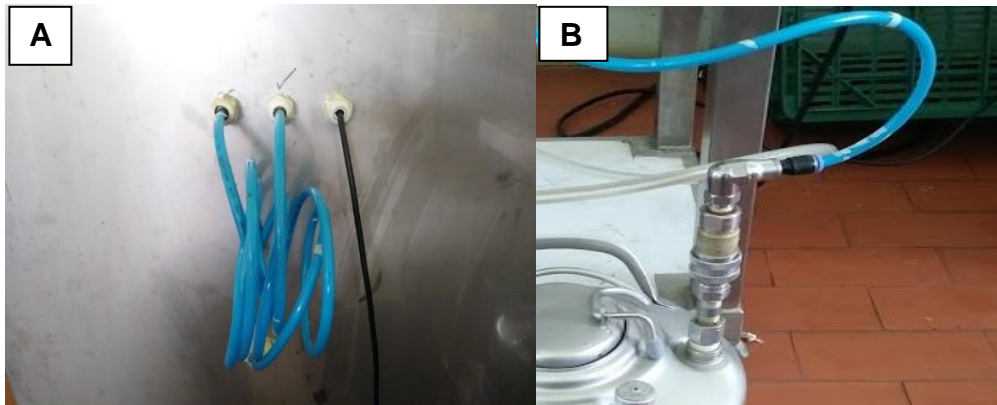
3.1.6 conectar la el cable de impregnador al vacío MP/TV05 (A), en el tablero de la parte trasera del módulo AutoJet (B), exactamente en la entrada Main (nozzle liquido on/off).

Figura 7. Conexión entre el impregnador MP/TV05 y el módulo AutoJet.



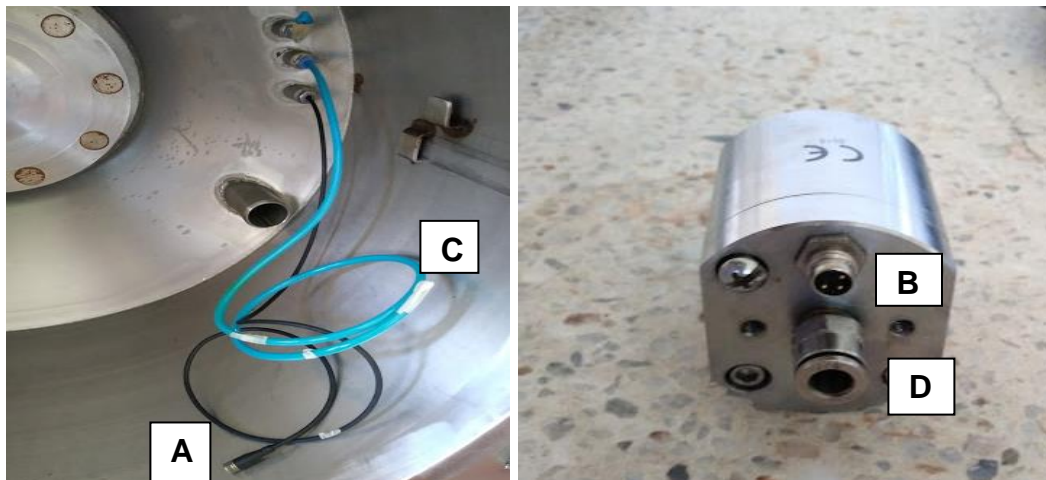
3.1.7 conectar la manguera azul (transporte de líquido) del impregnador al vacío MP/TV05 (A), al acople de salida de líquido (B) del tanque presurizado y acoplar al tanque.

Figura 8. Conexión entre el impregnador al vacío MP/TV05 y el tanque presurizado.



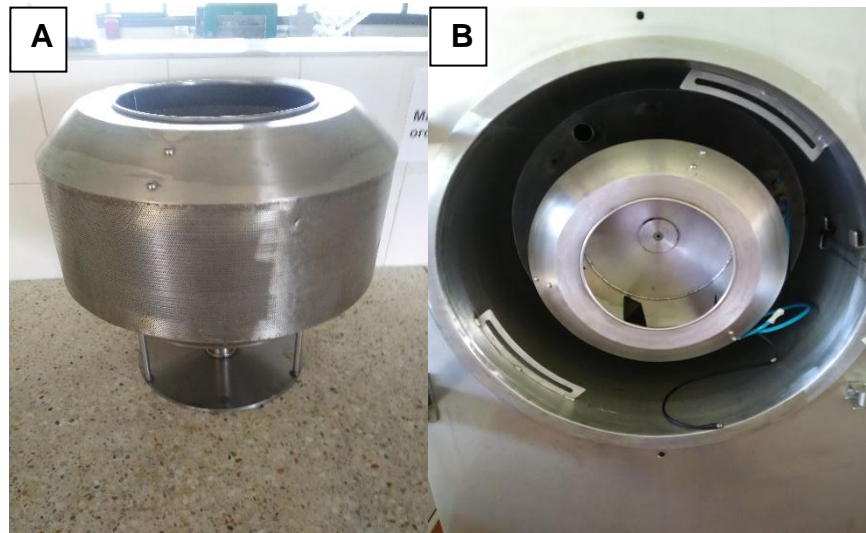
3.1.8 conectar el cable pulsaJet (A) del impregnador al vacío MP/TV05 que se encuentra en la parte interior de la cámara de vacío a la entrada tres pines de la boquilla de aspersión (B) que se encuentra en la parte trasera de la misma, luego ensamblar la manguera azul (C) del impregnador al vacío MP/TV05 al acople de entrada de líquido (D) de la boquilla de aspersión, que también se encuentra en la parte trasera de la boquilla.

Figura 9. Conexiones a la boquilla de aspersión.



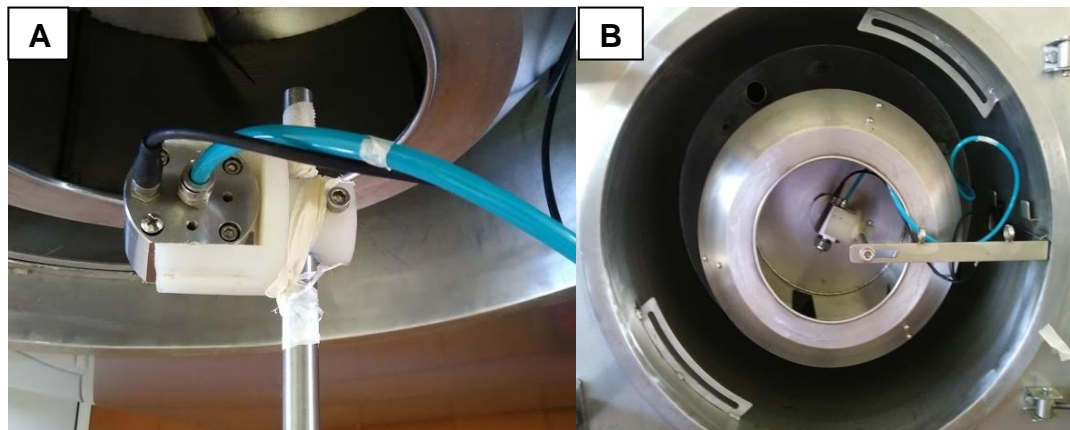
3.1.9 ingresar la canastilla de acero (A), a la cámara de vacío (B) del impregnador MP/TV05.

Figura 10. Canastilla de acero y cámara de vacío.



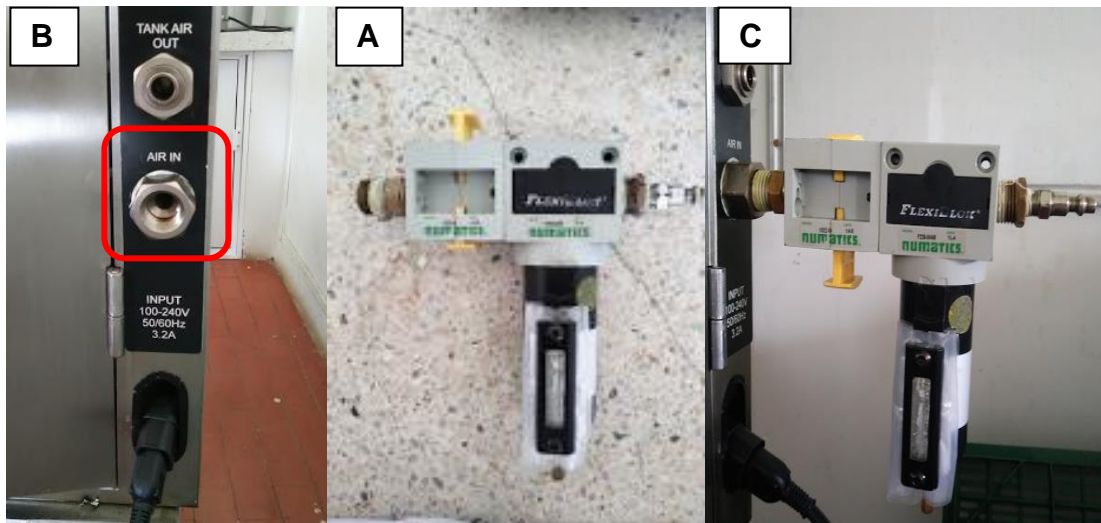
3.2 Ajustar la boquilla de aspersión al soporte base (A), para luego ser ingresada a la cámara de vacío (B).

Figura 11. Boquilla de aspersión en la cámara de vacío.



3.2.1 adaptar el filtro de aire (A), en el acceso AIR IN (B) del módulo AutoJEt ubicado en la parte derecha del módulo, el filtro debe quedar ubicado verticalmente (C).

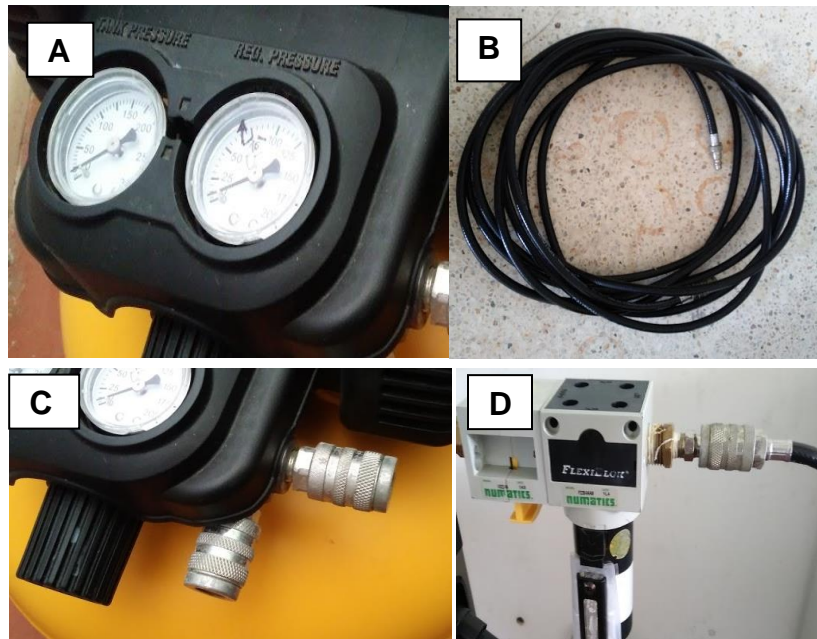
Figura 12. Conexión filtro de aire al módulo AutoJet.



3.2.2 ubicar el compresor Dewalt D2002M en un lugar limpio, seco y ventilado

3.2.3 asegurar que el manómetro (A) marque una lectura de 0 psi; luego se procede a conectar la manguera (B) (caucho SBR negro) en uno de los dos conectores de acople rápido (C) que tiene el compresor en la parte superior; el otro extremo de manguera acoplarlo a la entrada del filtro de aire (D) conectado al módulo AutoJet.

Figura 13. Conexión manguera (caucho SBR negro).



3.2.4 conectar el compresor a la alimentación de corriente de 110V más cercana.

3.2.3 garantizar que la válvula de drenaje (A) se encuentre completamente cerrada; esta se encuentra en la parte inferior del compresor.

B4. MANEJO DE EQUIPOS PARA EL PROCESO DE ASPERCIÓN.

B4.1 ENCENDIDO DE EQUIPOS

4.1.1 adecuar la presión de salida del aire del compresor, con el regulador de presión ubicado junto a los manómetros; la presión de salida debe estar por encima de la presión de trabajo del módulo AutoJEt; para caso de nuestra investigación se trabajó con una presión de salida del compresor de 70 psi y una presión de trabajo del módulo AutoJet de 40 psi.

4.1.2 encender el módulo AutoJet, con el interruptor de encendido/apagado que se encuentra ubicado en la parte inferior derecha del panel de control táctil del módulo AutoJet; la indicación de que el modulo se encuentra encendido es que se observara una luz roja en el led ubicado al lado del interruptor.

4.1.3 conectar el impregnador al vacío MP/TV05 a una alimentación de 220V.

4.1.4 encender el impregnador al vacío MP/TV05 con la perilla de encendido/apagado que se encuentra en la parte inferior del panel de control del impregnador. Inmediatamente se encenderá el panel de control táctil del impregnador al vacío MP/TV05.

A4.2 OPERACIÓN DEL SISTEMA.DEL MODULO AUTOJET E IMPREGNADOR AL VACÍO MP/TV05

4.2.1 esperar a que el modulo arranque y muestre la pantalla de inicio en el panel de control táctil.

4.2.2 ajustar la variables a trabajar que se indican en el inicio del panel de control táctil

Figura 14. Menú principal del módulo de aspersión.



4.2.3 descripción de las variables que aparecen en el panel de control táctil del módulo AutoJet.

- Ciclo de trabajo (Duty cycle): control del flujo del líquido mediante la apertura y cerrado rápido de la boquilla durante el periodo de aspersión.
- Retraso de arranque (Start delay): tiempo de espera del sistema antes de comenzar el periodo de rociado o aspersión.
- Periodo de rociado o aspersión (Spray period): tiempo de aspersión del sistema después de recibir la señal del gatillo o el tiempo de retraso ha finalizado.
- Intervalo apagado (Interval Off): periodo de pausa de una aspersión por intervalos; disponible para el modo de sincronización REPEAT.
- Intervalo encendido (Interval On): tiempo de aspersión por intervalos disponible para el modo de sincronización REPEAT.
- Retraso de parada (Stop delay): tiempo de parada después de que a señal del gatillo ha cesado; disponible para los modos de sincronización VARIABLE SPRAY TIEME Y REPEAT.
- Gatillo o activador apagado/encendido (trigger Off or trigger On): mando del panel de control táctil, que permite activar la aspersión manualmente desde el gatillo trigger o en su defecto desde el panel táctil.
- Ajustes: accede a más parámetros del módulo de aspersión.

Con respecto a las variables nombradas, para efectos de este estudio se configuraron las siguientes variables.

Cuadro 1. Variables manipuladas.

Ciclo de trabajo	20%
Retraso de inicio	0 s
Periodo de aspersión	41,38 s
Intervalo de apagado	No aplicable
Intervalo encendido	No aplicable
Retraso de parada	No aplicable
Activador trigger	On

4.2.4 descripción de variables del menú de configuración del módulo AutoJet.

Figura 15. Menú de configuración del módulo AutoJet.



- Modo de temporización (Timing mode): modos de aspersión que presenta el módulo AutoJet que se requieren en diferentes procesos; como FIXED SPRAY TIME (tiempo de aspersión fijo), VARIABLE SPRAY TIME (tiempo de aspersión variable) y REPEAT (repetición).
- Tiempo de anticipación y tiempo de continuación: se usan para los modos VARIABLE SPRAY TIME y REPEAT para anticipar y continuar la aspersión en determinado tiempo.
- Frecuencia máxima (Max frequency): velocidad completa o ciclo completo de la boquilla eléctrica.
- Ciclo de trabajo (Duty cycle): botón que permite cambiar el modo de entrada de los datos en la pantalla de inicio del ciclo de trabajo (REMOTE/LOCAL).
- Activador: permite establecer que señal de disparo es recibido en el módulo para activar la boquilla.
- Sensor de nivel (Level sensor): uso de sensores.
- Configuración avanzada (figura flecha): entrada a más configuraciones del módulo AutoJet.
- Inicio (figura casa): retorno al menú inicial.

Con respecto a las variables nombradas, para efectos de este estudio se configuraron las siguientes variables

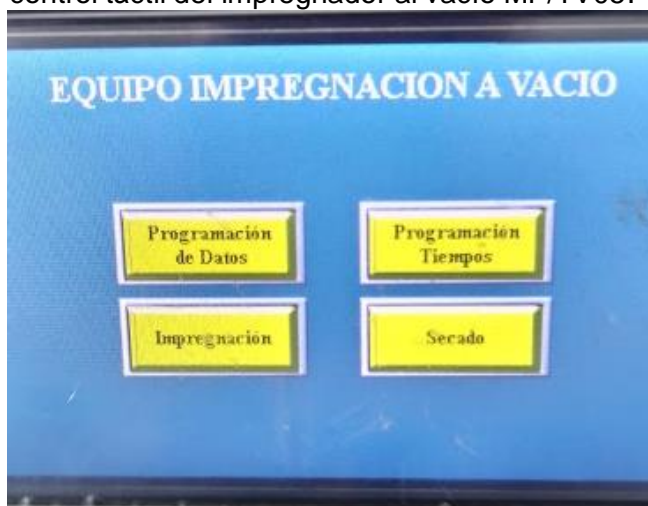
Cuadro 2. Variables manipuladas en el menú 1 de 2

Modo de temporización	Tiempo de aspersión fijo
Tiempo de anticipación	0 s
Tiempo de continuación	0 s
Frecuencia máx	5000 ciclos/min
Ciclo de trabajo	Local
Activador	D12
Sensor de nivel	No

La información presentada con respecto al significado de cada una de las variables es una adaptación del manual Model 1550+ AutoJet Modular Spray System (Technology 2015).

4.2.5 configuración de variables del impregnador al vacío que se encuentran en el panel de control táctil del impregnador al vacío.

Figura 16. Panel de control táctil del impregnador al vacío MP/TV05.



4.2.6 descripción de las variables a controlar de la pantalla de inicio táctil del impregnador al vacío MP/TV05.

- Programación de datos: en el submenú de este ítem encontraremos variables a configura como lo son la velocidad de la canastilla, la presión (mmbar) y temperatura (°C).
- Programación de tiempos: aquí encontraremos variables como los son el tiempo de impregnación (min), tiempo de secado (min).
- Secado: encontraremos la temperatura de secado (°C)
- Impregnación: encontraremos la representación gráfica del impregnador al vacío MP/TV05, y las variables ingresadas para el proceso, adicionalmente encontraremos el botón de inicio y apagado de la impregnación.

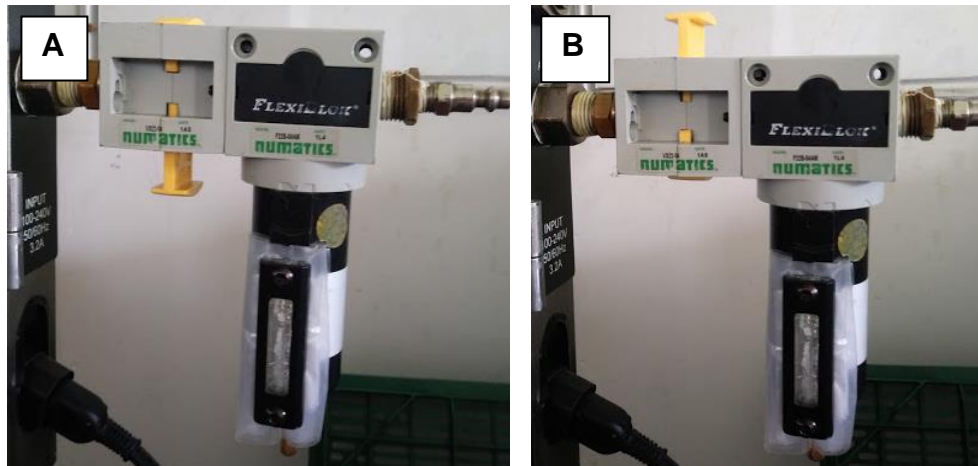
Las variables manipuladas fueron.

Cuadro 3. Variables manipuladas en el impregnador al vacío MP/TV05

Velocidad de canastilla	30%
Presión	-506 mmbar y presión ambiente
temperatura	ambiente
Tiempo de impregnación	0,69 min
Tiempo de secado	No aplica

4.2.7 desbloqueo de la válvula del filtro de aire de entrada al módulo AutoJet.

Figura 16. Válvula del filtro de aire bloqueado (A), válvula desbloqueada (B).



4.2.8 halar y mover la perilla LIQUID (A) a la derecha para aumentar la presión del módulo AutoJet a (40 psi), y así asegurar una presión constante de trabajo.

Figura 17. Perilla Liquid del módulo AutoJet.

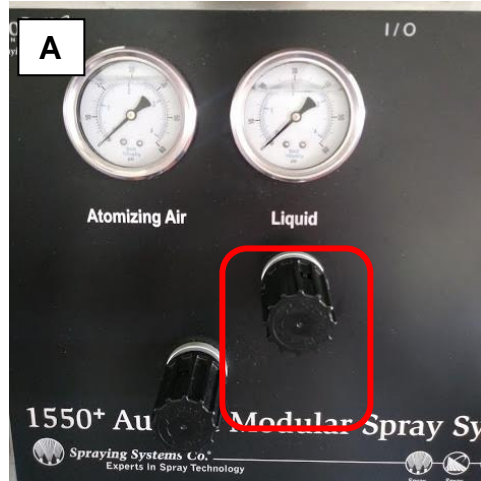


Figura 18. Equipo de impregnación al vacío MP/TV05 y módulo AutoJet ensamblado totalmente.



4.2.9 comenzar el proceso de aspersión cerrando la cámara de vacío, esperar que se forme el vacío en el interior de la cámara (si el proceso lo exige) y con el uso del gatillo de mano, dar la orden al presionar el botón para que el proceso de aspersión empiece.

B5. FINALIZACIÓN DEL PROCESO Y DESERME DE EQUIPOS.

5.1 finalizado el proceso se dispone a hacer la limpieza y purga del equipo de aspersión.

5.1.1 se adiciona agua (80mL) al tanque presurizado y se hace una aspersión por lo menos de 40 segundos para retirar las trazas que quedaron del inoculo para la impregnación.

5.1.2 se adiciona alcohol al 90% (80mL) al tanque presurizado y se realiza una aspersión por lo menos de 40 segundos y así garantizar un desinfectado con alcohol de todas las partes que hicieron contacto con el inoculo de impregnación.

5.1.3 en este último paso se realiza una aspersión con solo aire, aproximadamente unos 2 minutos para garantizar que no quede residuos de ningún líquido dentro del equipo de impregnación al vacío.

5.2 apagar todos los equipos desde su interruptor On/Off, después proceder a desconectarlos de sus respectivas conexiones de electricidad 110V o 220V.

5.3. Halar y mover la perilla LIQUID a la izquierda que se encuentra en la parte frontal del módulo AutoJet, hasta llegar a una lectura en el manómetro de 0 psi; presionar para asegurar.

5.4 cerrar la válvula del filtro de aire.

5.5 girar la perilla del regulador de presión del compresor en sentido derecha-izquierda o sentido contrario a las agujas de reloj, para permitir así la descompresión del tanque de aire del compresor DeWalt. Confirmar que la presión se encuentre en 0 psi en los manómetros de salida de aire, y por último proceder a abrir la válvula de drenaje que se encuentra en la parte inferior del compresor de manera lenta para así asegurar una total descompresión del equipo y poder limpiar y guardarlo.

5.6 desacoplar la manguera de caucho SBR de los acoples de entrada del compresor DeWalt y del filtro de aire.

5.7 desconectar el cable del gatillo de mano (trigger) del módulo AutoJet. O en su defecto guardarlo en la parte interior del módulo AutoJet sin desconectar; si su uso es frecuente.

5.8 desconectar el cable PulsaJet que conecta al impregnador al vacío MP/TV05 con el Módulo AutoJet.

5.9 desacoplar la manguera azul que permite la salida de líquido del tanque presurizado y también desacoplar la manguera traslúcida que conecta al tanque presurizado con el módulo AutoJet para posteriormente almacenarlas.

5.10 desmontar el filtro de aire

5.11 desconectar los acoples rápidos del tanque presurizado.

5.12 desmontar la boquilla de aspersion, limpiar y almacenarla.

5.13 desmontar la canastilla del impregnador al vacío MP/TV05 lavar, secar y almacenarla.

5.14 lavar y secar y dejar completamente limpio y seco el tanque presurizado y la cámara de vacío del impregnador la vacío.

5.15 asegurarse que todo el equipo, accesorios queden completamente limpios y secos para asegurar una mejor utilidad del equipo en futuras aspersiones.

B6. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD IMPORTANTES

Leer con detenimiento las normas de seguridad y mantenimiento de los manuales del módulo de aspersion AutoJet 1550, compresor DeWalt D2002M e impregnador al vacío MP/TV05; que se encuentran en la base de datos del grupo de investigación de la universidad del cauca ASUBAGROIN. Y así obtener una mayor información a la hora de manipular el equipo y evitar al máximo los riesgos que puedan ocurrir; y así asegurar la vida útil de los mismos.

ANEXO C. Datos de la cinética de crecimiento del Bacillus sp 074 por 12 horas

Tiempo (h)	Replicas	Repeticiones	Dilución -3	Dilución -4	Dilución -5	UFC
0	R1	1	>300	203	9	2,E+07
		2	>300	110	0	1,E+07
		3	>300	120	6	1,E+07
	R2	1	>300	214	7	2,E+07
		2	>300	123	17	1,E+07
		3	>300	120	0	1,E+07
	R3	1	>300	208	13	2,E+07
		2	>300	128	9	1,E+07
		3	>300	144	10	1,E+07
3	R1	1	>300	342	44	3,E+07
		2	>300	259	46	3,E+07
		3	>300	255	40	3,E+07
	R2	1	>300	382	33	4,E+07
		2	>300	263	54	3,E+07
		3	>300	270	36	3,E+07
	R3	1	>300	304	46	3,E+07
		2	>300	246	29	2,E+07
		3	>300	261	0	3,E+07
6	R1	1	>300	>300	256	3,E+08
		2	>300	>300	272	3,E+08
		3	>300	>300	262	3,E+08
	R2	1	>300	>300	209	2,E+08
		2	>300	>300	277	3,E+08
		3	>300	>300	255	3,E+08
	R3	1	>300	>300	246	2,E+08
		2	>300	>300	234	2,E+08
		3	>300	>300	245	2,E+08
9	R1	1	>300	>300	244	2,E+08
		2	>300	>300	256	3,E+08
		3	>300	>300	260	3,E+08
	R2	1	>300	>300	210	2,E+08
		2	>300	>300	265	3,E+08
		3	>300	>300	250	3,E+08
	R3	1	>300	>300	230	2,E+08
		2	>300	>300	249	2,E+08
		3	>300	>300	252	3,E+08
12	R1	1			195	2,E+08
		2			167	2,E+08
		3			150	2,E+08
	R2	1			160	2,E+08
		2			145	1,E+08
		3			150	2,E+08
	R3	1			146	1,E+08
		2			139	1,E+08
		3			160	2,E+08

ANEXO D. Análisis estadístico anova de la impregnación por aspersión

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Concentración celular	24,056	1	24,056	4985,922	,000
	Resistencia_JG	20,931	1	20,931	3602,412	,000
	Durabilidad	11,504	1	11,504	83,127	,000
	Flotabilidad	,222	1	,222	1,231	,284
Intersección	Concentración celular	930,198	1	930,198	192798,309	,000
	Resistencia_JG	472,124	1	472,124	81256,509	,000
	Durabilidad	169693,902	1	169693,902	1226198,149	,000
	Flotabilidad	179200,889	1	179200,889	992497,231	,000
Presión	Concentración celular	24,056	1	24,056	4985,922	,00000000000000000002156
	Resistencia_JG	20,931	1	20,931	3602,412	,000000000000000000028759
	Durabilidad	11,504	1	11,504	83,127	,000000097768547094857600
	Flotabilidad	,222	1	,222	1,231	,283654224180778000000000
Error	Concentración celular	,077	16	,005		
	Resistencia_JG	,093	16	,006		
	Durabilidad	2,214	16	,138		
	Flotabilidad	2,889	16	,181		
Total	Concentración celular	954,331	18			
	Resistencia_JG	493,148	18			
	Durabilidad	169707,621	18			
	Flotabilidad	179204,000	18			
Total corregida	Concentración celular	24,133	17			
	Resistencia_JG	21,024	17			
	Durabilidad	13,718	17			
	Flotabilidad	3,111	17			

ANEXO E. Estadísticos descriptivos anova primer diseño experimental

Donde el tratamiento uno (1) es la impregnación por aspersión a presión atmosférica sobre el alimento extruido, el tratamiento dos (2) es la impregnación por aspersión a presión de vacío sobre el alimento extruido.

E1.1 TABLAS DE ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA.

E1.1.1 Tabla unidades formadoras de colonia.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: UFC/g

Tratamiento	Media	Desviación típica	N
1,00	6,033	,0652	9
2,00	8,345	,0734	9
Total	7,189	1,191	18

E1.1.2 tabla resistencia a simulación de jugos gástricos.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Resistencia a jugos gástricos

Tratamiento	Media	Desviación típica	N
1,00	4,043	,074	9
2,00	6,200	,078	9
Total	5,121	1,112	18

E1.1.3 Tabla durabilidad.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Durabilidad

Tratamiento	Media	Desviación típica	N
1,00	96,296	,273	9
2,00	97,894	,449	9
Total	97,095	,898	18

E1.1.4 Tabla flotabilidad.

Estadísticos descriptivos
Variable dependiente: Flotabilidad

Tratamiento	Media	Desviación típica	N
1,00	99,889	,333	9
2,00	99,666	,500	9
Total	99,778	,428	18

E1.1.5 Tabla prueba de los efectos inter sujetos.

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Concentración celular	24,056	1	24,056	4985,922	,000
	Resistencia_JG	20,931	1	20,931	3602,412	,000
	Durabilidad	11,504	1	11,504	83,127	,000
	Flotabilidad	,222	1	,222	1,231	,284
Intersección	Concentración celular	930,198	1	930,198	192798,309	,000
	Resistencia_JG	472,124	1	472,124	81256,509	,000
	Durabilidad	169693,902	1	169693,902	1226198,149	,000
	Flotabilidad	179200,889	1	179200,889	992497,231	,000
Presión	Concentración celular	24,056	1	24,056	4985,922	,000000000000000000002156
	Resistencia_JG	20,931	1	20,931	3602,412	,0000000000000000000028759
	Durabilidad	11,504	1	11,504	83,127	,000000097768547094857600
	Flotabilidad	,222	1	,222	1,231	,283654224180778000000000
Error	Concentración celular	,077	16	,005		
	Resistencia_JG	,093	16	,006		
	Durabilidad	2,214	16	,138		
	Flotabilidad	2,889	16	,181		
Total	Concentración celular	954,331	18			
	Resistencia_JG	493,148	18			
	Durabilidad	169707,621	18			
	Flotabilidad	179204,000	18			
Total corregida	Concentración celular	24,133	17			
	Resistencia_JG	21,024	17			
	Durabilidad	13,718	17			
	Flotabilidad	3,111	17			

ANEXO F. Estadísticos descriptivos anova segundo diseño experimental

Donde el tratamiento uno (1) es la temperatura de almacenamiento de 15°C, y el tratamiento dos (2) es la temperatura de almacenamiento de 25 °C, sobre el alimento extruido e impregnado al vacío con el microorganismo probiótico.

Además el tiempo uno (1) equivale al día cero, el tiempo dos (2) equivale al día 15 y el tiempo tres (3) equivale al día 30.

F1.1 TABLAS DE ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA.

F1.1.1 Tabla unidades formadoras de colonia.(UFC/g)

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
Dia1T15	8,193	,187	6
Dia1T25	8,191	,195	6
Dia15T15	8,363	,087	6
Dia15T25	8,209	,073	6
Dia30T15	7,119	,104	6
Dia30T25	7,125	,057	6

F1.1.2 Tabla digestibilidad (UFC/g)

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
Dia1T15	7,194	,065	6
Dia1T25	7,163	,108	6
Dia15T15	7,310	,034	6
Dia15T25	7,195	,048	6
Dia30T15	6,052	,042	6
Dia30T25	6,068	,011	6

F1.1.3 Tabla flotabilidad.

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
Dia1T15	94,890	1,054	9
Dia1T25	100,000	,000	9
Dia15T15	94,890	1,054	9
Dia15T25	100,000	,000	9
Dia30T15	99,330	2,000	9
Dia30T25	100,000	,000	9

F1.1.4 Tabla durabilidad.

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
Dia1T15	98,040	,138	3
Dia1T25	98,280	,108	3
Dia15T15	98,040	,138	3
Dia15T25	98,280	,108	3
Dia30T15	97,830	,713	3
Dia30T25	97,360	,317	3

F1.2 TABLAS DE CONTRASTES MULTIVARIADOS PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA

F1.2.1 Tabla unidades formadoras de colonia

Contrastes multivariados^c

Efecto	Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada ^b	
Tiempo	Traza de Pillai	1,000	15420,520 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	30841,039	1,000
	Lambda de Wilks	,000	15420,520 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	30841,039	1,000
	Traza de Hotelling	7710,260	15420,520 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	30841,039	1,000
	Raíz mayor de Roy	7710,260	15420,520 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	30841,039	1,000
Temperatura	Traza de Pillai	,191	1,184 ^a	1,000	5,000	,326	,191	1,184	,145
	Lambda de Wilks	,809	1,184 ^a	1,000	5,000	,326	,191	1,184	,145
	Traza de Hotelling	,237	1,184 ^a	1,000	5,000	,326	,191	1,184	,145
	Raíz mayor de Roy	,237	1,184 ^a	1,000	5,000	,326	,191	1,184	,145
Tiempo * Temperatura	Traza de Pillai	,775	6,876 ^a	2,000	4,000	,051	,775	13,752	,597
	Lambda de Wilks	,225	6,876 ^a	2,000	4,000	,051	,775	13,752	,597
	Traza de Hotelling	3,438	6,876 ^a	2,000	4,000	,051	,775	13,752	,597
	Raíz mayor de Roy	3,438	6,876 ^a	2,000	4,000	,051	,775	13,752	,597

a. Estadístico exacto

b. Calculado con alfa = ,05

c. Diseño: Intersección

Diseño intra-sujetos: Tiempo + Temperatura + Tiempo * Temperatura

F1.2.2 Tabla digestibilidad

Contrastes multivariados^c

Efecto		Valor	F	GI de la hipótesis	GI del error	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada ^b
Tiempo	Traza de Pillai	1,000	4044,171 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	8088,342	1,000
	Lambda de Wilks	,000	4044,171 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	8088,342	1,000
	Traza de Hotelling	2022,086	4044,171 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	8088,342	1,000
	Raíz mayor de Roy	2022,086	4044,171 ^a	2,000	4,000	,000	1,000	8088,342	1,000
Temperatura	Traza de Pillai	,343	2,610 ^a	1,000	5,000	,167	,343	2,610	,261
	Lambda de Wilks	,657	2,610 ^a	1,000	5,000	,167	,343	2,610	,261
	Traza de Hotelling	,522	2,610 ^a	1,000	5,000	,167	,343	2,610	,261
	Raíz mayor de Roy	,522	2,610 ^a	1,000	5,000	,167	,343	2,610	,261
Tiempo * Temperatura	Traza de Pillai	,841	10,603 ^a	2,000	4,000	,025	,841	21,207	,778
	Lambda de Wilks	,159	10,603 ^a	2,000	4,000	,025	,841	21,207	,778
	Traza de Hotelling	5,302	10,603 ^a	2,000	4,000	,025	,841	21,207	,778
	Raíz mayor de Roy	5,302	10,603 ^a	2,000	4,000	,025	,841	21,207	,778

a. Estadístico exacto

b. Calculado con alfa = ,05

c. Diseño: Intersección

Diseño intra-sujetos: Tiempo + Temperatura + Tiempo * Temperatura

F1.2.3 Tabla flotabilidad

Contrastes multivariados^c

Efecto		Valor	F	GI de la hipótesis	GI del error	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada ^b
Tiempo	Traza de Pillai	,808	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Lambda de Wilks	,192	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Traza de Hotelling	4,211	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Raíz mayor de Roy	4,211	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
Temperatura	Traza de Pillai	,943	131,562 ^a	1,000	8,000	,000	,943	131,562	1,000
	Lambda de Wilks	,057	131,562 ^a	1,000	8,000	,000	,943	131,562	1,000
	Traza de Hotelling	16,445	131,562 ^a	1,000	8,000	,000	,943	131,562	1,000
	Raíz mayor de Roy	16,445	131,562 ^a	1,000	8,000	,000	,943	131,562	1,000
Tiempo * Temperatura	Traza de Pillai	,808	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Lambda de Wilks	,192	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Traza de Hotelling	4,211	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999
	Raíz mayor de Roy	4,211	33,684 ^a	1,000	8,000	,000	,808	33,684	,999

a. Estadístico exacto

b. Calculado con alfa = ,05

c. Diseño: Intersección

Diseño intra-sujetos: Tiempo + Temperatura + Tiempo * Temperatura

F1.2.4 Tabla durabilidad

Contrastes multivariados^c

Efecto		Valor	F	GI de la hipótesis	GI del error	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada ^b
Tiempo	Traza de Pillai	,588	2,858 ^a	1,000	2,000	,233	,588	2,858	,174
	Lambda de Wilks	,412	2,858 ^a	1,000	2,000	,233	,588	2,858	,174
	Traza de Hotelling	1,429	2,858 ^a	1,000	2,000	,233	,588	2,858	,174
	Raíz mayor de Roy	1,429	2,858 ^a	1,000	2,000	,233	,588	2,858	,174
Temperatura	Traza de Pillai	,004	,007 ^a	1,000	2,000	,939	,004	,007	,050
	Lambda de Wilks	,996	,007 ^a	1,000	2,000	,939	,004	,007	,050
	Traza de Hotelling	,004	,007 ^a	1,000	2,000	,939	,004	,007	,050
	Raíz mayor de Roy	,004	,007 ^a	1,000	2,000	,939	,004	,007	,050
Tiempo * Temperatura	Traza de Pillai	,688	4,401 ^a	1,000	2,000	,171	,688	4,401	,233
	Lambda de Wilks	,312	4,401 ^a	1,000	2,000	,171	,688	4,401	,233
	Traza de Hotelling	2,201	4,401 ^a	1,000	2,000	,171	,688	4,401	,233
	Raíz mayor de Roy	2,201	4,401 ^a	1,000	2,000	,171	,688	4,401	,233

a. Estadístico exacto

b. Calculado con alfa = ,05

c. Diseño: Intersección

Diseño intra-sujetos: Tiempo + Temperatura + Tiempo * Temperatura

F1.3 TABLA DE COMPARACION POR PARES PARA LAS DIFERENTES VARIABLES DE RESPUESTA.

F1.3.1 Tabla variable tiempo (Unidades formadoras de colonia)

Comparaciones por pares

Medida:UFC

(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,094	,045	,266	-,252	,064
	3	1,070*	,031	,000	,959	1,181
2	1	,094	,045	,266	-,064	,252
	3	1,164*	,015	,000	1,111	1,217
3	1	-1,070*	,031	,000	-1,181	-,959
	2	-1,164*	,015	,000	-1,217	-1,111

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

F1.3.2 Tabla temperatura vs tiempo (Unidades formadoras de colonia)

Comparaciones por pares

Medida:UFC

Temperatura	(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^a	
						Límite inferior	Límite superior
1	1	2	-,170	,081	,264	-,455	,114
		3	1,074*	,068	,000	,835	1,313
	2	1	,170	,081	,264	-,114	,455
		3	1,244*	,029	,000	1,141	1,348
	3	1	-1,074*	,068	,000	-1,313	-,835
		2	-1,244*	,029	,000	-1,348	-1,141
2	1	2	-,018	,081	1,000	-,304	,268
		3	1,066*	,069	,000	,824	1,308
	2	1	,018	,081	1,000	-,268	,304
		3	1,084*	,019	,000	1,016	1,152
	3	1	-1,066*	,069	,000	-1,308	-,824
		2	-1,084*	,019	,000	-1,152	-1,016

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

F1.3.3 Tabla tiempo vs temperatura (Unidades formadoras de colonia)

Comparaciones por pares

Medida:UFC

Tiempo	(I)Temperatura	(J)Temperatura	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^a	
						Límite inferior	Límite superior
1	1	2	,002	,128	,985	-,327	,332
	2	1	-,002	,128	,985	-,332	,327
2	1	2	,155 [*]	,025	,002	,090	,219
	2	1	-,155 [*]	,025	,002	-,219	-,090
3	1	2	-,005	,029	,862	-,079	,069
	2	1	,005	,029	,862	-,069	,079

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

F1.3.4 Tabla variable tiempo (digestibilidad).

Comparaciones por pares

Medida:Digestibilidad

(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,074	,023	,066	-,154	,006
	3	1,118 [*]	,025	,000	1,029	1,208
2	1	,074	,023	,066	-,006	,154
	3	1,192 [*]	,012	,000	1,150	1,234
3	1	-1,118 [*]	,025	,000	-1,208	-1,029
	2	-1,192 [*]	,012	,000	-1,234	-1,150

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.
*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

F1.3.5 Tabla temperatura vs tiempo (digestibilidad)

Comparaciones por pares

Medida: Digestibilidad

Temperatura	(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^a	
						Límite inferior	Límite superior
1	1	2	-,116 [*]	,021	,008	-,190	-,042
		3	1,142 [*]	,033	,000	1,026	1,258
	2	1	,116 [*]	,021	,008	,042	,190
		3	1,258 [*]	,017	,000	1,198	1,318
	3	1	-1,142 [*]	,033	,000	-1,258	-1,026
		2	-1,258 [*]	,017	,000	-1,318	-1,198
2	1	2	-,032	,047	1,000	-,199	,136
		3	1,095 [*]	,044	,000	,941	1,249
	2	1	,032	,047	1,000	-,136	,199
		3	1,127 [*]	,018	,000	1,063	1,190
	3	1	-1,095 [*]	,044	,000	-1,249	-,941
		2	-1,127 [*]	,018	,000	-1,190	-1,063

Basadas en las medias marginales estimadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.