



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MICROORGANISMOS
BENÉFICOS DE MONTAÑA COMO PROBIÓTICO EN BOVINOS
DE LECHE”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médico
Veterinario

Autor:
Zapata Tapia Víctor Aníbal

Tutor:
Mvz. Valencia Bustamante Byron Andrés, Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Víctor Aníbal Zapata Tapia con cédula de ciudadanía No. 1725913260, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Efecto de la suplementación de microorganismos benéficos de montaña como probiótico en bovinos de leche”, siendo el Médico Veterinario y Zootecnista Mvz. Byron Andrés Valencia Bustamante, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 29 de agosto del 2022

Víctor Aníbal Zapata Tapia

Estudiante

CC: 1725923260

MVZ. Byron Valencia Bustamante, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 1719622647

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **ZAPATA TAPIA VICTOR ANIBAL** identificado con cédula de ciudadanía **1725923260** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Efecto De La Suplementación De Microorganismos Benéficos De Montaña En Bovinos De Leche”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Abril 2018- agosto 2018

Finalización de la carrera: Abril 2022 – agosto 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 03 de junio del 2022

Tutor: MVZ. Byron Andrés Valencia Bustamante, Mg.

Tema: “Efecto de la suplementación de microorganismos benéficos de montaña como probiótico en bovinos de leche”

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 29 días del mes de agosto del 2022.

Zapata Tapia Víctor Aníbal

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, Ph.D.

EL CEDENTE

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICROORGANISMOS BENÉFICOS DE MONTAÑA COMO PROBIOTICO EN BOVINOS DE LECHE”, de Zapata Tapia Víctor Aníbal, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 29 de agosto del 2022

MVZ. Byron Andrés Valencia Bustamante, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 1719622647

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Zapata Tapia Víctor Aníbal, con el título de Proyecto de Investigación: **“EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON MICROORGANISMOS BENÉFICOS DE MONTAÑA COMO PROBIOTICO EN BOVINOS DE LECHE”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 29 de agosto del 2022

Lector 1 (Presidente)

Dr. Cristian Arcos Álvarez, Mg.

CC: 180367563-4

Lector 2

MVZ. Gabriel Molina Causapaz, Mtr.

CC: 172254727-8

Lector 3

MVZ. Cristian Beltrán Romero, Mg.

CC: 050194294-0

AGRADECIMIENTO

A Dios por acompañarme en este arduo camino brindándome salud para cumplir los retos y aproximarme más a una de las metas de mi vida.

A mis papás quienes con su esfuerzo y apoyo me permitieron estudiar en esta emblemática institución y así lograr superar nuevos retos como el que estoy culminando.

A todas las personas que estimo porque me brindaron su apoyo y cariño, ya que se convirtieron en cada uno de los motivos para recordar que rendirse no es la solución si no una cobardía.

Al MVZ. Byron Andrés Valencia, por compartir generosamente todos sus conocimientos y experiencias, para el buen desarrollo de este proyecto.

Víctor Aníbal Zapata Tapia

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a todas esas personas que me brindaron su cariño demostrándome símbolo de respeto y amor

A mi papá por ser ese gran ejemplo y pilar que con su esfuerzo y apoyo me permitió estudiar y poder aprender las bases de mi conocimiento y así encaminarme a un futuro llegar a ser un médico veterinario.

A mi mamá quien fue mi guía en mis estudios y en mi formación como persona, enseñándome valores de respeto y responsabilidad.

A mi hermana quien con su cariño y ayuda hizo que supere los obstáculos que se presentaron a lo largo de este tiempo. Gracias por apoyarme en todos los momentos difíciles de mi vida.

A mi abuelitos que con su amor y aspiraciones me animan a seguir luchando por los retos que se me presentan día a día, en especial a mi abuelito Mario Tapia y a mi abuelita Carmen Jácome, grandes trabajadores del campo, quienes impulsaron en mí el gusto y admiración de ser un profesional en el ámbito pecuario.

Víctor Aníbal Zapata Tapia

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE MICROORGANISMOS BENEFICOS DE MONTAÑA COMO PROBIÓTICO EN BOVINOS DE LECHE”.

AUTOR: Zapata Tapia Víctor Anibal

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en la Quinta Mi Carmencita ubicado en Aloasí provincia de Pichincha. La investigación se centra en la revisión y el análisis de la información bibliográfica y los resultados de laboratorio sobre los microorganismos eficientes de montaña y su aplicación para la salud del ganado bovino dedicado a la producción lechera, control de microorganismos patógenos y beneficio nutricional de las vacas, donde se enuncian microorganismos que promueven una mejor digestión ruminal de bovinos, favorecen la nutrición, el crecimiento y desarrollo de los animales, mejor calidad en los estándares de producción, menos presencia de enfermedades del tracto digestivo por microorganismos patógenos y permiten una mayor facilidad de descomposición de materia fecal conjunto a obtener mejores , dentro de la metodología utilizada, se realizó una revisión y recopilación de artículos científicos relacionados con el tema, en los repositorios Scopus, Elsevier, que permitieron el análisis del uso y aplicación de los microorganismo eficientes, eficaces y de montaña, concluyendo que son beneficiosos para las animales, ayudando a la regulación de pH ruminal, mejor nutrición, absorción de nutrientes, control de microrganismos patógenos, solubilizando nutrientes para la nutrición de las vacas lecheras, y sobretodo devolviendo la vida microbiológica del suelo..

Palabras clave: Core, microbioma, secuenciación, caracterización.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF BENEFICIAL MOUNTAIN MICROORGANISMS AS A PROBIOTIC IN DAIRY COWS”

AUTHOR: Zapata Tapia Víctor Aníbal

ABSTRACT

The current research was carried into Quinta Mi Carmencita, located into Aloasi Pichincha province. The research focuses onto bibliographic information review and analysis, and laboratory results about the efficient mountain microorganisms and their application for the cattle health dedicated to dairy production pathogenic microorganisms control and cows nutritional benefit, where are enunciated microorganisms, which promote bovines better ruminal digestion, favor nutrition, growth and animals development, better quality into production standards, digestive tract diseases, less presence by pathogenic microorganisms and they allow stool substance decomposition greater ease to get better, within the used methodology it was made a review and compilation of related scientific articles with the topic in the Scopus, Elsevier repositories that allowed the efficient, effective and mountain microorganisms use and application analysis, concluding, what they are beneficial for the animals, by helping to the ruminal pH regulation, better nutrition, nutrient absorption, pathogenic microorganisms control, by solubilizing nutrients for the dairy cows nutrition, and above all, returning the soil microbiological life

Key words: Core, microbiome, sequencing, characterization

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	x
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSIFICACION DEL PROYECTO	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
4. PROBLEMÁTICA	3
5. OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos específicos	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACION A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	4
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	5
7.1. Microorganismos eficaces, eficientes o benéficos	5
7.1.1. Origen de Microorganismos Eficientes	5
7.1.2. Formación y Composición de Microorganismos Eficientes	6
7.1.3. Caracterización del medio biótico	6
7.1.4. Principales fuentes de Microorganismos Eficientes	8
7.2. Microorganismos de montaña (MM).	9

7.2.1.	Funciones de los microorganismos de montaña	9
7.2.2.	Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos eficientes	9
7.2.3.	Modo de acción de los microorganismos eficientes	10
7.3.	Biomasa	12
7.3.1.	Microbioma	13
7.3.2.	Microbiota animal	13
7.3.2.1.	Microbiota ruminal	14
7.4.	Biotecnología y Genómica Microbiana	14
7.4.1.	Secuenciación masiva	14
7.5.	Secuenciación de ARNr 16s e ITS	16
7.5.1.	Ventajas del análisis ITS y 16S rRNA basado en NGS	16
8.	PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	17
9.	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	17
9.1.	Ubicación geográfica	17
9.2.	Diseño experimental	18
9.3.	Tipo de Investigación	18
9.3.1.	Observacional	18
9.3.2.	Instrumentos para la investigación	18
9.4.	Factores de la metodología	19
9.5.	Procedimiento	19
9.5.1.	Captura de microorganismo de montaña	19
9.5.3.	Obtención de la sustancia madre	19
9.5.4.	Propagación de MM	20
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	20
11.	IMPACTOS (TECNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONOMICOS)	26
12.	CONCLUSIONES	27
13.	RECOMENDACIONES	27

14.	BIBLIOGRAFIA	28
15.	ANEXOS	32

1. INFORMACIÓN GENERAL

Los **antecedentes** de este proyecto se dieron por lo expuesto en el artículo 21 del Reglamento de Trabajo de Titulación de Posgrados de la Universidad Técnica de Cotopaxi, corresponde a la línea de investigación: Sanidad Animal

Título del Proyecto: Efecto de la suplementación con microorganismos benéficos de montaña como probiótico en bovinos de leche

Fecha de inicio: Abril 2022

Fecha de finalización: Septiembre 2022

Lugar de ejecución: Provincia de Pichincha, Cantón Mejía, Parroquia Aloasí, Barrio Umbría, Unidad de Producción Agropecuaria Quinta Mi Carmencita.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Equipo de Trabajo:

Víctor Aníbal Zapata Tapia

Mvz. Byron Andrés Valencia Bustamante, Mg.

Área de Conocimiento: Agricultura - Veterinaria

SUB ÁREA

62 Agricultura, Silvicultura y Pesca, producción agropecuaria, agronomía, ganadería, horticultura y jardinería, silvicultura y técnicas forestales, parques naturales, flora y fauna, pesca, ciencia y tecnología pesqueras.

64 Veterinaria, Auxiliar de Veterinaria

Línea de investigación: Salud Animal.

Sub líneas de investigación de la Carrera: Producción Animal y Nutrición, Microbiología, Parasitología, Inmunología y Sanidad animal

2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

El incremento de obtener alimentos de origen animal como productos orgánicos por parte de la población ecuatoriana demanda producciones lecheras con uso responsable de fármacos, empleo de bienestar animal y control medio-ambiental seguro, con el fin de contribuir a la seguridad alimentaria. La problemática ambiental viene a ser muy tomada en cuenta actualmente por el hecho de contaminación con agentes infecciosos y el uso indiscriminado de fármacos lo que conlleva a resistencias a los antimicrobianos.

La producción bovina lechera es una de las más grandes que se encuentra en el país, demanda cada vez más tener una sostenibilidad y sustentabilidad ambiental, económica y social. Esta representa una de las fuentes económicas para las comunidades indígenas y rurales. La situación actual del país busca tener un comercio justo y que comprenda costo-beneficio representativo para el productor, evitando muchos costos de producción en nutrición y manejo sanitario.

En este sentido, los microorganismos de montaña (MM) han empezado a ser unos puntos de estudio para ser utilizados dentro de estrategias de manejo ganadero sostenible como una opción viable para mejorar la calidad de vida del bovino y lograr mejores estándares de producción. El uso de MM es una alternativa que se está implementando en la alimentación animal, donde muchos de los casos se los emplea sin previos estudios pertinentes para lograr un éxito profundo en el empleo de MM como un posible probiótico.

Bajo este contexto se plantea el estudio de la los diferentes microorganismos benéficos de montaña su identificación, categorización y el efecto de suplementar MM en la alimentación de vacas lecheras, y con esto mejorar la calidad de aprovechamiento de las dietas implementadas a vacas lecheras así como la buena administración de probióticos caseros en la producciones bovinas lecheras para contribuir a la demanda de productos de origen orgánico.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

DIRECTOS

- Grandes, Medianos y pequeños productores de leche.
- Postulante: Víctor Zapata

INDIRECTOS

Consumidores de los productos y derivados de leche

4. PROBLEMÁTICA

Los problemas económicos presentados en el país ha sido una problemáticas más importantes en el país debido a que los costos obtenidos para producir un litro de leche han subido y en cuanto al precio de venta del mismo es muy fluctuante afectando principalmente a pequeños y mediano productores. Por lo cual los ganaderos optan por disminuir el uso de concentrados y aumentar la utilización de conservados de forraje y desechos de alimentos procesados o industrializados por el costo más económico.

El sustento económico de la mayoría de los productores o pequeños ganaderos del barrio Umbría está dado por la producción lechera ya que alrededor de un 60 a 70% de ella ese dedicada para este tipo de producción. Estos productores tienen en cuenta que el bienestar, nutrición y salud del animal está estrechamente relacionado con la producción lechera de las vacas y su calidad láctea por lo cual se busca una alimentación y un mejor aprovechamiento.

Actualmente en el país tenemos una gran problemática el cual es el uso excesivo de antibióticos y estos como promotores de crecimiento que conlleva a la resistencia a los antimicrobianos, combinado con la contaminación con desechos infecciosos y estiércol que son depositados en efluentes de agua y el suelo sin un debido manejo y tratamiento el cual podría ser aprovechado de mejor manera.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el efecto de la suplementación con microorganismos benéficos de montaña como probiótico en bovinos de leche

Objetivos específicos

- Determinar MM mediante secuenciación masiva.
- Identificar la comunidad *core* bacteriana y fungí.
- Valorar la importancia de las especies encontradas

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACION A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1: Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados

Objetivo	Actividad	Resultado	Medios de verificación
Determinar MM mediante secuenciación masiva	Colecta de muestras cultivadas de MM	Listados de todas las core	Cuadros presencia de cores
Identificar la comunidad <i>core</i> bacteriana y fungí	Proceso de Secuenciones 16S y ITS	Derivación de las taxonomías	Abundancias relativas
Valorar la importancia de las especies encontradas	Información impartida por el laboratorio y revisión bibliográfica	Listados por muestras y familias	Datos obtenidos

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Microorganismos eficaces, eficientes o benéficos

Los microorganismos eficientes o ME (del inglés Efficient Microorganism) consisten en productos formulados líquidos que contienen más de 80 especies de microorganismos, algunas especies son aeróbicas, anaeróbicas e incluso especies fotosintéticas cuyo logro principal es que pueden coexistir como comunidades microbianas e incluso pueden completarse¹.

Los microorganismos eficaces o benéficos, conocidos como EM son una mezcla de microorganismos obtenidos de ecosistemas naturales, seleccionados por sus diferentes efectos positivos y su compatibilidad en cultivos mixtos. El EM es una mezcla de diferentes tipos de microorganismos benéficos que ayudan a mantener un equilibrio natural microbiológico en su entorno. Éstos son promotores de la fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos. Este inóculo bacteriano acelera la descomposición de compuestos orgánicos, subproductos de actividades pecuarias, agrícolas, domesticas e industriales, evitando la pudrición de éstos, previniendo los malos olores y gases tóxicos².

Al actuar los microorganismos de sobre el material orgánico, éstos secretan aminoácidos, vitaminas, enzimas, azúcares, antibióticos y sustancias bioactivas, que son favorables para plantas y animales. Estos compuestos tienen efectos antioxidantes que pueden prevenir la acción de oxidación de la materia y de los cuerpos vivientes. Por medio de la fermentación de forrajes y concentrados, los microorganismos benéficos contenidos en él, ayudan a mejorar la disponibilidad de nutrientes de los materiales, haciendo más eficiente la nutrición de los animales³.

7.1.1. Origen de Microorganismos Eficientes

Los (MM) surgen desde la década de los años 60, aunque los mayores avances comienzan con los estudios del profesor de horticultura Teruo Higa, de la Facultad de Agricultura de la Universidad de Ryukyus en Okinawa aproximadamente en 1970. Este investigador se motivó por la búsqueda de alternativas naturales en la producción agrícola, debido a que había sufrido efectos tóxicos de plaguicidas químicos en sus primeros años de ejercitar su profesión, los (MM) son, hongos, bacterias, micorrizas, levaduras y otros organismos benéficos, los cuales viven y se encuentran en el suelo de montañas, bosques, parras de bambú, lugares sombreados y sitios donde en los últimos 3 años no se han utilizado agroquímicos².

7.1.2. Formación y Composición de Microorganismos Eficientes

Los microorganismos eficientes (EM), es una mezcla de varios microorganismos benéficos, tanto aeróbicos como anaeróbicos. Entre estos se encuentran bacterias ácido láctico y fotosintético, levaduras, hongos como los actinomicetos y hongos fermentadores. Estos microorganismos existen en gran cantidad en la naturaleza y son usados para el procesamiento de alimentos y de comida animal fermentada. Son totalmente seguros para los seres humanos y animales⁴.

Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas* spp)

Son un grupo de microorganismos que sintetizan sustancias útiles (aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares), a partir de las secreciones de las raíces y la materia orgánica, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas. Son consideradas el eje central de la actividad del EM, pues dan sostén a otros microorganismos, también coexisten con *Azotobacter* y *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico⁵.

Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp)

Originan ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fotosintéticas y levaduras. Los *Lactobacillus* promueven la fermentación y desdoblamiento de lignina y celulosa, permitiendo una más rápida descomposición de los materiales vegetales. También, tienen la habilidad de suprimir microorganismos causantes de enfermedades, como los hongos del género *Fusarium*, que debilitan las plantas, exponiéndolas al ataque de otras enfermedades y plagas¹.

Levaduras (*Saccharomyces* spp)

Sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el crecimiento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares (secretados por las bacterias fotosintéticas), así como de materia orgánica. Los elementos producidos por las levaduras (hormonas y enzimas), promueven la división activa de células, siendo también, sustratos útiles para las bacterias ácido lácticas y los actinomicetos⁶.

7.1.3. Caracterización del medio biótico

- **Bosque decido de tierras bajas**

Se ubica entre las formaciones de matorrales secos de tierras bajas y los bosques semidecíduos o húmedos tropicales, en una franja altitudinal entre los 50 y 200 m.s.n.m. La precipitación anual fluctúa entre 800 a 1200 mm y la estación seca es de siete meses. La

vegetación se caracteriza por perder las hojas durante una parte del año. Los árboles más comunes son de la familia Bombacaceae, tienen troncos abombados y copa ancha⁷.

La vegetación en el estrato medio incluye varias especies de cactus y de plantas espinosas del orden Fabales. Se localiza entre las provincias de Manabí en el Parque Nacional Machalilla y en la base del Cerro Montecristi, en la provincia del Guayas en Cerro Blanco y las bases de los cerros Masvale, Cimalón, Perequetre, Mate y Pancho Diablo en la Reserva Ecológica Manglares-Churute⁸.

- **Bosque húmedo**

Son bosques con alto endemismo (aproximadamente 10 %), los árboles alcanzan más de 30 m de alto, con una gran concentración de epífitas y un sotobosque arbustivo y herbáceo abundante en las familias Araceae, Heliconiaceae, Cyclanthaceae, Piperaceae, Orchidaceae y Gesneriaceae. Se ubica en el occidente de las provincias de Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar y Azuay-Guayas, entre 300 y 1.300 m.s.n.m. El Bosque húmedo Pie-montano crece donde la estacionalidad del clima no es lo suficientemente fuerte como para producir una estación seca. La vegetación siempre verde puede desarrollarse aún si la precipitación se encuentra por debajo de los 100mm mensuales⁹.

- **Bosque Montano**

Este bosque siempre-verde se encuentra entre 1300 y 3600 m en las estribaciones orientales de los Andes. La estructura de la vegetación es similar a la del Bosque Montano Occidental. Por bajo los 2900 m los árboles están cubiertos de musgo y las plantas epífitas como las orquídeas, helechos y bromelias son abundantes y alcanzan su mayor diversidad. Por sobre los 2900 m de elevación el suelo del bosque está cubierto de musgos y árboles con troncos de formas irregulares que se ramifican desde la base¹⁰.

- **Paramo**

Es la región natural que alcanza las elevaciones más altas. Su límite altitudinal inferior varía entre 3000 y 3600 m. Ecuador es el país con la mayor área de páramo seguido por Colombia, Venezuela y Perú. La vegetación se caracteriza por ser corta y dominada por hierbas que forman agregaciones densas. Las plantas están adaptadas a bajas temperaturas y poca disponibilidad de agua. También puede haber parches de bosque o arbustos. En las elevaciones más altas, la vegetación forma agregaciones dispersas rodeadas de áreas con suelo expuesto y sin plantas. Debido a la ocurrencia de heladas frecuentes, la agricultura es limitada

lo cual ha disminuido la destrucción antropogénica del hábitat. La mayor amenaza para el páramo es la presencia de ganado y la siembra de pino. El ganado tiene efectos negativos directos en el suelo y las plantas e indirectos debido a la práctica de la quema periódica para favorecer el pastoreo. El páramo es importante como fuente de agua para zonas urbanas. En Quito y Bogotá, el 90% del agua potable proviene del páramo. Hay mucha variación en la estructura de la vegetación del páramo con extremos notables como el páramo de frailejones de las provincias de Carchi e Imbabura hasta los páramos secos de la Reserva Chimborazo¹⁰.

7.1.4. Principales fuentes de Microorganismos Eficientes

Se establece que hay al menos cinco grandes fuentes de microorganismos benéficos utilizables en agricultura entre ellos se encuentran:

Mantillos. La fuente primaria de microorganismos benéficos agrícolas se encuentra en el litter, mantillo o tierra de capote o primera película de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de las selvas y bosques o de algunos agrosistemas poliestratificados, es decir, bajo sombrío de árboles. Esta primera capa de tierra es a la vez efecto y residencia de los microorganismos que, vehiculizados en el humus, convierten los residuos de vegetación y fauna en tierra fértil. Numerosas culturas antiguas han utilizado el mantillo como abono natural¹¹.

Compost. Diversas escuelas alternativas se aproximan al humus a través de diversos mecanismos, particularmente los compost y muy especialmente los lumbricompost; en estos últimos las excretas de las lombrices son resultado del complejo microbial digestivo¹¹.

Caldos microbiales. Se trata de la multiplicación por vía líquida de microorganismos benéficos, de los cuales los cuatro grupos más cultivados son: bacterias fotosintetizadoras, llamadas algas unicelulares, levaduras, lactobacilos, actinomicetos¹².

Micorrizas. Tienen un papel importante en el comportamiento del árbol, por aumentar la capacidad de absorción de los elementos nutritivos, al producir nuevas ramificaciones absorbentes y aumentar el área de contacto de la raíz con el suelo.

La función principal de las micorrizas es ayudar a que los nutrientes del suelo sean absorbidos fácilmente por las plantas ya cambio las plantas le suministran carbohidratos esenciales en la vida del hongo¹¹.

Entomopatógenos. Son microorganismos que causan enfermedades en artrópodos (insectos, ácaros, arácnidos, etc.) y por los mismos son útiles en controles biológicos¹¹.

7.2. Microorganismos de montaña (MM).

Los microorganismos de montaña son un grupo de organismos beneficiosos los cuales contienen aproximadamente 80 especies de microorganismos pertenecientes básicamente a cuatro géneros principales: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación¹³.

7.2.1. Funciones de los microorganismos de montaña

Los microorganismos de montaña MM cumplen las siguientes funciones naturalmente:

- Tienen la capacidad de degradar la materia orgánica incrementando la disponibilidad de los nutrientes del suelo.
- Ayudan a controlar los microorganismos patógenos que se encuentran en el suelo.
- Solubilizan fuentes de nutrientes poco solubles.
- Supresión de agentes Fito patógenos
- Aceleran la germinación de las semillas.
- Fijación del nitrógeno en el suelo, entre otras¹¹.

7.2.2. Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos eficientes

Hoy en día las aplicaciones biotecnológicas de microorganismos eficientes son diversas e innovadoras ya que tienen como aporte no solo económico y energético sino ambiental. Dentro de los campos en donde se aplica biotecnológicamente los microorganismos está la producción de biocombustible, la agricultura, ganadería, industria e incluso en la salud humana facilitando una coexistencia más armónica entre los microorganismos y la humanidad⁷.

- En la agricultura

Los microorganismos eficientes se han utilizado para enriquecer el suelo y producir cultivos de calidad, sanos, con un mayor rendimiento, con menos enfermedades o plagas sin el uso de productos químicos agrícolas.

Los bio-fertilizantes o abonos biológicos están basados en microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Se trata de microorganismos del suelo, generalmente hongos y bacterias, que se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima. Estos microorganismos pueden facilitar de manera directa

o indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes tales como: el nitrógeno, el fósforo y el agua, además de producir sustancias denominadas fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal¹.

- En la ganadería

Se ha utilizado para disminuir malos olores, reducir plagas de insectos y enfermedades, así como para aumentar la fecundidad de la inseminación artificial, y mejorar la calidad de la carne, lácteos y huevos⁷.

- En la conservación del ambiente

Limpiar aguas contaminadas en estanques, lagos, presas y costas, incluyendo en la limpieza de derrames de petróleo, en el tratamiento de aguas residuales, y en la transformación de residuos orgánicos en abonos de calidad. Los beneficios en el tratamiento de agua son:

- Promueve significativamente la reducción olores del sistema.
- Ayuda a neutralizar la producción de gases nocivos como amoníaco, sulfhídrico y metilmeccarptano.
- Reduce el lodo sedimentado.
- Reduce la presencia de microorganismos patógenos, coliformes, bacterias nocivas, hormonas y sulfatos reductores.
- Mejora significativamente la calidad del agua, reduciendo la DBO a DQO, la turbidez, los suspensos y, equilibra el pH y el oxígeno disuelto¹⁴.

7.2.3. Modo de acción de los microorganismos eficientes

Las diferentes especies de microorganismos (bacterias fotosintéticas y acidolácticas y levaduras) tienen sus funciones respectivas. Sin embargo, las bacterias fotosintéticas son consideradas el eje central de la actividad de estos microorganismos. Las bacterias fotosintéticas dan sostén a las actividades de los demás microorganismos, sin embargo, las bacterias fotosintéticas también utilizan sustancias producidas por otros microorganismos. Este fenómeno se conoce como “Coexistencia y Coprosperidad”¹⁴.

7.2.4. Aplicaciones en la Producción Animal

La tecnología EM en la producción animal se puede utilizar en la cría de animales, manejo de excretas e instalaciones, incrementando las variables productivas y maximizando la eficiencia de los sistemas¹⁵.

7.2.4.1. Instalaciones de Alojamiento

El objetivo de aplicar EM en las instalaciones de alojamiento de los animales, es el de reducir la acción de microorganismos perjudiciales que causan putrefacción.

- Reduce de malos olores (amoníaco), y poblaciones de insectos plaga, como consecuencia del proceso de fermentación de las excretas in situ.
- Disminuye el consumo de agua de lavado, implementando el manejo de camas secas para colectar excretas y orina, reduciendo la frecuencia de utilización de agua.
- En el mantenimiento de las instalaciones, aminora la oxidación y formación de herrumbre.
- Reduce el requerimiento y utilización de desinfectantes, y los costos de producción y mantenimiento⁹.

7.2.4.2. Sanidad y Salud Animal

- Reduce la incidencia de enfermedades y estrés en el animal por el mejoramiento de las líneas celulares de defensa a causa de los antioxidantes generados por los EM, incidiendo en la disminución del requerimiento de medicamentos (vitaminas, antibióticos y agentes hormonales).
- Aumenta la conversión de alimento y ganancia de peso, al enriquecer los microorganismos ruminales⁶.

7.2.4.3. Manejo de Desechos Animales

- Reduce de malos olores provenientes de estiércol y orina.
- Ayuda al aprovechamiento eficiente de los desechos animales como subproductos enriquecidos y seguros, eliminando microorganismos patógenos y semillas de malezas.
- Mejora calidad del Bokashi, asegurando una buena fermentación, evitando que las bacterias del ácido butírico actúen sobre la materia orgánica, provocando putrefacción y malos olores.
- Aumenta la rapidez de la elaboración del abono, llevando el proceso de 15 a 20 días, ya que en el abono tipo Bokashi, no se necesita que el material este totalmente descompuesto para ser usado.
- Reincorporación de las aguas residuales como aguas de riego⁷.

7.2.4.4. Mantenimiento y Mejoramiento de Praderas

- Aumenta la producción de pastos y forrajes por la síntesis de sustancias bioactivas y nutritivas generadas, influyendo directamente la mejora de su calidad nutricional¹⁰.

7.2.4.5. Alimentación Animal

El uso del EM en la alimentación animal puede darse en el agua de bebida y sobre los suplementos alimenticios.

- En el agua de bebida, la adición de EM mejora la micro flora intestinal de los animales, reduciendo la incidencia de enfermedades, fortificando el sistema inmunológico^{12,16}.
- Mejora la calidad del heno, promoviendo la palatabilidad. En el ensilaje, incrementa el aporte de aminoácidos, sintetizados por los EM, aprovechables por los animales, ayudando a poblar el rumen con microorganismos zimógenos. Las sustancias producto de la fermentación mejoran el balance de la micro flora intestinal, la condición física y aumentan el consumo de alimento por parte de los animales¹³.

7.2.4.6. Mejoramiento de la Calidad de los Productos Animales

- Mejora la calidad de leche, por el aumento de ácido butírico, proveniente del proceso de fermentación bacteriana ruminal, que incrementa los sólidos totales y grasas en la leche.
- Mejora la calidad de la carne, disminuyendo el colesterol y el porcentaje de grasa.
- Mejora la calidad del huevo, disminuye el colesterol, homogeniza su tamaño y aumenta el contenido de carotenos.
- Aumenta la vida útil de los alimentos fermentados por la presencia de agentes antioxidantes⁸.

7.3. Biomas

Un bioma (del griego «bios», vida), también llamado paisaje bioclimático o áreas bióticas es una determinada parte del planeta que comparte el clima, flora y fauna. Un bioma es el conjunto de ecosistemas característicos de una zona biogeográfica que está definido a partir de su vegetación y de las especies animales que predominan. Es la expresión de las condiciones ecológicas del lugar en el plano regional o continental: el clima y el suelo

determinarán las condiciones ecológicas a las que responderán las comunidades de plantas y animales del bioma en cuestión⁴.

7.3.1. Microbioma

El término microbioma es más amplio y hace referencia a todo el hábitat, incluyendo estas comunidades microbianas, sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que los rodean en cada una de las localizaciones. El microbioma es considerado como un “órgano” imprescindible para la vida y con clara influencia en la salud y la enfermedad. Estas comunidades microbianas tienen un comportamiento simbiótico y mutualista con las células humanas manteniendo un importante diálogo con nuestro sistema inmune¹⁷.

Varias funciones esenciales conferidas por el microbioma, como la transformación de componentes de alimentos no digeribles en metabolitos absorbibles, la síntesis de vitaminas esenciales, la eliminación de compuestos tóxicos, el fortalecimiento de la barrera intestinal o la regulación del sistema inmune, demuestran su importancia. Además, presenta particularidades y características propias inherentes en cada individuo, pudiendo variar en función del sustrato genético, la dieta, la exposición temprana, la geografía y la interacción con el medio ambiente¹⁸.

Dado que la gran parte de los microorganismos que forman parte del microbioma no son cultivables en los medios tradicionales, los avances tecnológicos, incluyendo las técnicas de secuenciación masiva o las herramientas de análisis masivo de datos han supuesto una revolución en el conocimiento de la microbiota. Estudios recientes sugieren que, más que la composición microbiana, la importancia del microbioma radica en su funcionalidad dado que diferentes especies microbianas pueden llevar a cabo funciones metabólicas equivalentes y una misma especie, diferentes funciones¹⁹

7.3.2. Microbiota animal

Si bien en ocasiones se usan indistintamente los términos microbiota y microbioma, el término microbiota hace referencia al conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que residen en los cuerpos de los animales. La microbiota es un ecosistema complejo que para trabajar eficientemente y de forma armónica precisa que los microorganismos se comuniquen unos con otros y con el intestino. Si, por ejemplo, un solo microorganismo decide colonizar un nicho intestinal o si solo uno decide atacar la fibra, la

acción tendrá menos oportunidad de éxito que una acción organizada y combinada de los microbios, trabajando juntos para llevar a cabo un objetivo común³.

7.3.2.1. Microbiota ruminal

La microbiota simbiote ruminal ha conferido a los rumiantes la ventaja evolutiva de poder aprovechar la fibra vegetal a través de su metabolismo fermentativo. La fermentación de la fibra en el rumen provee de fuentes de energía mientras que la biomasa microbiana aporta la principal fuente de proteínas¹⁷.

La cantidad de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, y cuando estos dos parámetros se mantienen, las variaciones derivan de factores específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta¹⁸.

7.4. Biotecnología y Genómica Microbiana

En los últimos años, el constante desarrollo y la continua mejora de los métodos de secuenciación del ADN ha permitido que la obtención de la secuencia de genoma completo sea accesible en la rutina de los Servicios de Microbiología Clínica, introduciendo así un nuevo paradigma en el diagnóstico microbiológico¹².

7.4.1. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva engloba toda una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías, estrategias y aproximaciones, cuya característica común es su habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo a un precio asequible y en un tiempo relativamente corto²⁰. Los secuenciadores masivos o de segunda generación difieren en muchos aspectos con los secuenciadores tipo Sanger. Una de las principales diferencias es la realización simultánea de millones de reacciones de secuenciación de fragmentos muy cortos que pueden asignarse a cada una de las muestras que se analizan simultáneamente gracias a la preparación previa de unas librerías etiquetadas (multiplexado) que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional¹⁹.

Proceso de secuenciación masiva puede dividirse en tres pasos:

Preparación de librerías

La preparación de librerías consiste básicamente en fragmentar y marcar de forma inequívoca las diferentes muestras de ADN cuya secuencia quiere conocerse¹⁴. Actualmente, existen

diferentes estrategias de fragmentación del ADN (física, enzimática o química) cuyo objetivo final es la obtención de una mezcla de fragmentos de un tamaño homogéneo, estando el tamaño deseado determinado por la tecnología de secuenciación empleada²¹. Una vez fragmentado el ADN genómico se procede al marcaje para lo cual se añaden unos identificadores únicos que no sólo permiten identificar la muestra a la que pertenecen, sino que además permiten la posterior fijación de los mismos a la superficie bidimensional donde tendrá lugar la reacción de secuenciación²².

Inmovilización sobre una superficie bidimensional y amplificación in vitro de la librería.

Una vez preparadas las librerías, éstas se fijan a una superficie bidimensional donde son amplificadas in vitro existiendo también en este punto diferentes estrategias. De todas ellas, la más sencilla es la utilizada por los secuenciadores de Illumina y denominada amplificación puente (bridge amplification)²³. En esta estrategia los cebadores necesarios para el inicio de la reacción de amplificación se encuentran inmovilizados sobre una superficie bidimensional; al ser estos cebadores complementarios a una parte de los identificadores incorporados en la preparación de librerías, las muestras quedan inmovilizadas y en disposición de iniciarse la amplificación clonal en paralelo de todas las muestras. Otras estrategias alternativas incluyen la amplificación en emulsión o la amplificación en nanobolas (rolling-circle amplification).

Secuenciación y captación de señal²⁴.

Una vez amplificados los fragmentos de ADN, se produce la reacción de secuenciación para la cual también se han desarrollado diferentes estrategias. Una de estas estrategias es la pirosecuenciación, cuya base es la utilización de nucleótidos cuya incorporación a la hebra complementaria en síntesis conlleva la liberación de pirofosfatos que, en última instancia, generan luz que puede detectarse permitiendo así elucidar la secuencia de nucleótidos²⁵.

Otra estrategia ampliamente utilizada es la denominada secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis). En esta aproximación la reacción de síntesis consiste en la incorporación secuencial y reversible de nucleótidos marcados con fluoróforos distintos que impiden además la adición posterior de más nucleótidos; de esta forma, en cada paso se produce la adición de un único nucleótido a cada uno de los fragmentos en síntesis cuya señal fluorescente es captada y traducida a nucleótidos²⁶.

Finalmente, otra aproximación ampliamente utilizada es la denominada secuenciación mediante ligación (SBL; sequencing by ligation) que no utiliza ADN polimerasas y cuya base reside en la utilización de una mezcla de sondas marcadas con fluoróforos que se unen

mediante ligasas específicas. Por tanto, es importante conocer la estrategia química de secuenciación en que se basa el secuenciador ya que determina en gran medida sus características y prestaciones²⁷.

7.5. Secuenciación de ARNr 16S e ITS

La secuenciación de ARN ribosómico (ARNr) con espaciador transcrito interno (ITS) y 16S son métodos comunes de secuenciación de amplicones que se utilizan para identificar y comparar bacterias u hongos presentes en una muestra determinada. La secuenciación de próxima generación (NGS) basada en ITS y la secuenciación del gen 16S rRNA son métodos bien establecidos para comparar la filogenia y la taxonomía de muestras de microbiomas complejos o entornos que son difíciles o imposibles de estudiar²⁸.

El gen del ARNr 16S procariótico tiene una longitud aproximada de 1500 pb, con nueve regiones variables intercaladas entre regiones conservadas. Las regiones variables del gen 16S rRNA se utilizan con frecuencia para la clasificación filogenética de géneros o especies en diversas poblaciones microbianas. La región ITS1 del cistron de ARNr es un marcador de ADN de uso común para identificar especies de hongos en muestras metagenómicas²⁹.

7.5.1. Ventajas del análisis ITS y 16S rRNA basado en NGS

Un beneficio clave de los métodos NGS de ARN ribosómico 16S e ITS es que proporcionan una técnica rentable para identificar cepas que pueden no encontrarse con los métodos tradicionales. A diferencia de la secuenciación capilar o los enfoques basados en PCR, la secuenciación de próxima generación es un método sin cultivo que permite el análisis de toda la comunidad microbiana dentro de una muestra³⁰.

16S rRNA NGS permite a los microbiólogos lograr una sensibilidad a nivel de género para estudios metagenómicos de poblaciones bacterianas. El análisis ITS con NGS permite la identificación rápida de hongos para ayudar a avanzar en nuestra comprensión del microbioma. Además, NGS ofrece la capacidad de combinar múltiples muestras en una ejecución de secuenciación³¹.

8. PREGUNTAS CIENTIFICAS O HIPOTESIS

HI: La suplementación de microorganismos de montaña si tiene un efecto benéfico en la producción lechera.

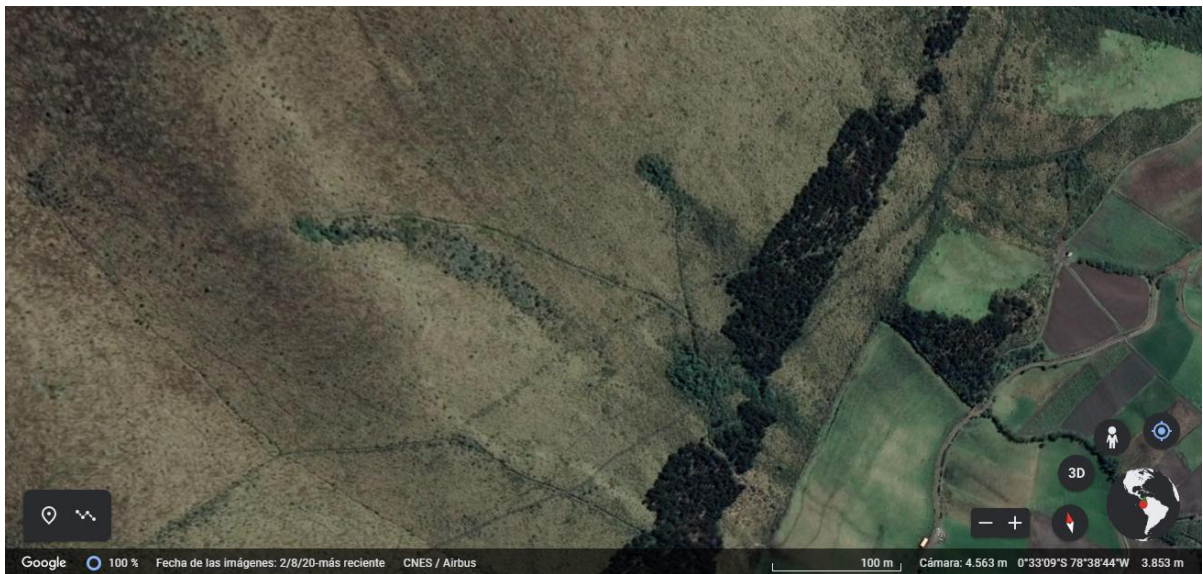
HO: La suplementación de microorganismos de montaña no tiene un efecto benéfico representativo en la producción lechera.

9. METODOLOGIAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Ubicación geográfica

El proyecto se realizó en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, Parroquia Aloasí, Barrio Umbría.

Figura 1. Mapa de ubicación captura de MM, Reserva Ecológica los Ilinizas, barrio Umbría, sector Cumbiteo Alto



Fuente: Google Earth Ecuador

Figura 2. Mapa de ubicación UNIDAD PRODUCTIVA AGROPECUARIA QUINTA “MI CARMENCITA”



Fuente: Google Earth Ecuador

9.2. Diseño experimental

Se realizó secuenciación de genómica microbiana para identificar las diferentes *cores* bacterianas y fúngicas, utilizando el software BaseSpace Sequence Hub para el ITS y 16S Metagenómica ³².

9.3. Tipo de Investigación

9.3.1. Observacional

Este tipo de investigación se basó en la obtención de *cores* bacterianas y fúngicas con la captura de microorganismos de montaña haciendo una distribución en bloques completamente al azar y observar su abundancia. En este trabajo el factor de estudio fue las tres sustancias madres obtenidas de diferentes puntos, para ser administrado a 6 vacas lecheras, el proceso se evaluó de acuerdo a la presencia o no de mastitis (células somáticas) y H de la leche.

9.3.2. Instrumentos para la investigación

Para el proceso de la elaboración práctica del proyecto se recaudaron datos investigativos como secuenciación genómica microbiana, tablas y cuadros de interpretación, comparación de *cores*, microbiotas ruminales, y parámetros zootécnicos para comparar los datos que se van obteniendo durante el desarrollo del mismo.

9.4. Factores de la metodología

Se realizó una investigación, en la cual, se analizó la presencia y abundancia de los microorganismo de montaña y su efecto en la producción lechera. Las muestras se obtuvieron siguiendo un protocolo y los resultados se obtuvieron mediante el laboratorio Biosequence-Illumina.

Los factores que se consideraron son los siguientes:

- El suelo
- Las precipitaciones
- Altura sobre el nivel del suelo
- Altura sobre el nivel del mar
- Humedad

9.5. Procedimiento

9.5.1. Captura de microorganismo de montaña

- 1) Colocación de 4 onzas de arroz cocinado con sal, 2 cucharadas de melaza, 2 cucharadas de caldo de carne en un tarro plástico y tapar la boca con un pedazo de tela nylon y asegurarlo bien.
- 2) Se eligió los sitios de captura, se procedió a enterrar los tarros o tarrinas en las áreas elegidas, dejando el borde de las mismas a 10 centímetros de profundidad.
- 3) Se colocó materia orgánica en proceso de descomposición recogida en los sectores circundantes, sobre el nylon que tapa la boca del tarro.
- 4) Identificación del sitio donde se enterró 50 tarrinas colocando una señal o baliza.

9.5.2. Cosecha de MM

- 5) Después de 2 semanas desenterró la tarrina y saque el arroz que estará impregnado de MICROORGANISMOS (EMAs).
- 6) Mezclado en un balde el arroz de todas las tarrinas cosechadas, por cada muestra de cosecha nombradas S1, S2, S3 de acuerdo al sector.

9.5.3. Obtención de la sustancia madre

- 7) Se agregó 3 litros de agua limpia cocinada pero fresca a la cosecha de arroz con microorganismos, de 1 litro de melaza y proceda a batir o licuar la mezcla por el espacio de 5 a 10 minutos.
- 8) Filtrado de la mezcla para eliminar la parte gruesa de la mezcla.

9.5.4. Propagación de MM

- 9) En un tanque plástico para cada Muestra, se colocó 4 litros de la solución madre, 1 litro de leche, 1 litro de melaza, un litro de yogurt simple o natural, 2 kilos de torta de soya y agua fresca, limpia y sin cloro.
- 10) Se cerró el tanque y se dejó fermentar entre 8 a 12 días. Se abrió la tapa periódicamente para facilitar la salida de gas de fermentación.
- 11) Concluido el periodo de fermentación, se pasó toda la materia por una cernidora separando el material grueso del líquido.
- 12) El líquido se procedió a ser envasado en envases oscuros para ser almacenados y poder ser utilizados.

9.5.5. Procedimiento de Secuenciación Meta genómica del PCR

- 13) Se envió muestras al laboratorio de cada uno de los envases nombrados como S1, S2 y S3, para ser secuenciados los ARNr 16S e ITS.

9.5.6. Administración de MM a las vacas 1, 2 y 3

- 14) Se administró la solución de MM S1 a la vaca 1, S2 a la vaca 2 y S3 a la vaca 3 a ración de 1ml en el alimento balanceado por cada ordeño.
- 15) La duración se mantuvo por 10 días para evaluar los parámetros

10. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se logró caracterizar todas las cepas aisladas y purificadas de las muestras de leche de manatíes, diferenciando si correspondían a cepas bacterianas o fúngicas y haciendo descripción de su morfología tanto macroscópica como microscópica. Sin embargo, no todas las cepas lograron ser identificadas por medio de secuenciación por el método de secuenciación. A pesar de este impedimento podemos resaltar algunos de los resultados más significativos y que contribuyen a la identificación y caracterización de algunas cepas con potencial probiótico.

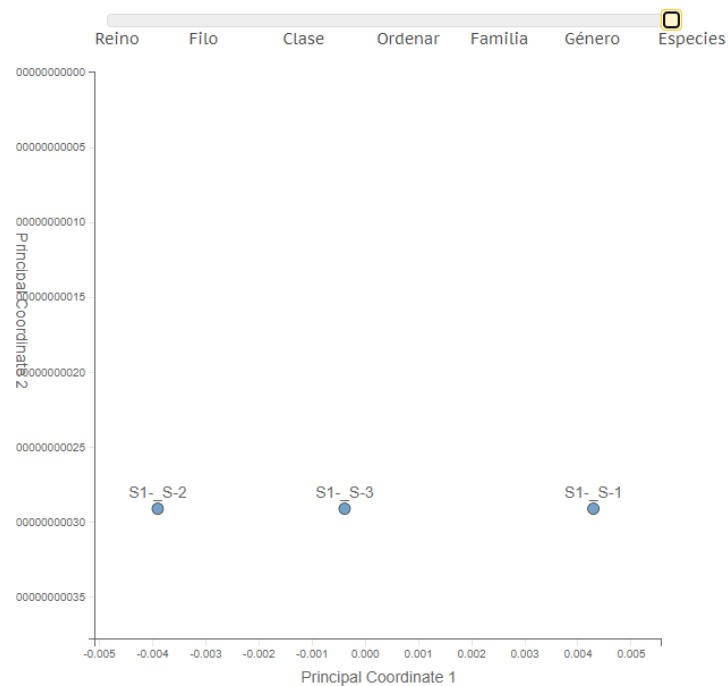
Comunidad Bacteria secuenciación por 16S

Uno de los resultados más significativos para este estudio es la identificación de la especie *Lactobacillus casei*, (un solo aislamiento) puesto que se ha estudiado ampliamente su potencial probiótico tanto en humanos (Isolauri et al. 1991) como en animales (Yadav et al. 2007) y es ampliamente conocida por los beneficios que tiene esta en el sistema inmune

innato de sus hospederos (Parra et al. 2004). Por otra parte, aunque el género *Streptococcus* ha sido objeto de varias investigaciones que resaltan su potencial probiótico (Laleman et al. 2015), fue *Streptococcus dysgalactiae* una de las especies más frecuentes en las bacterias identificadas (cinco aislamientos); esta especie es reconocida por generar infecciones comúnmente relacionadas con la mastitis en mamíferos como las vacas (Calvinho et al. 1998).

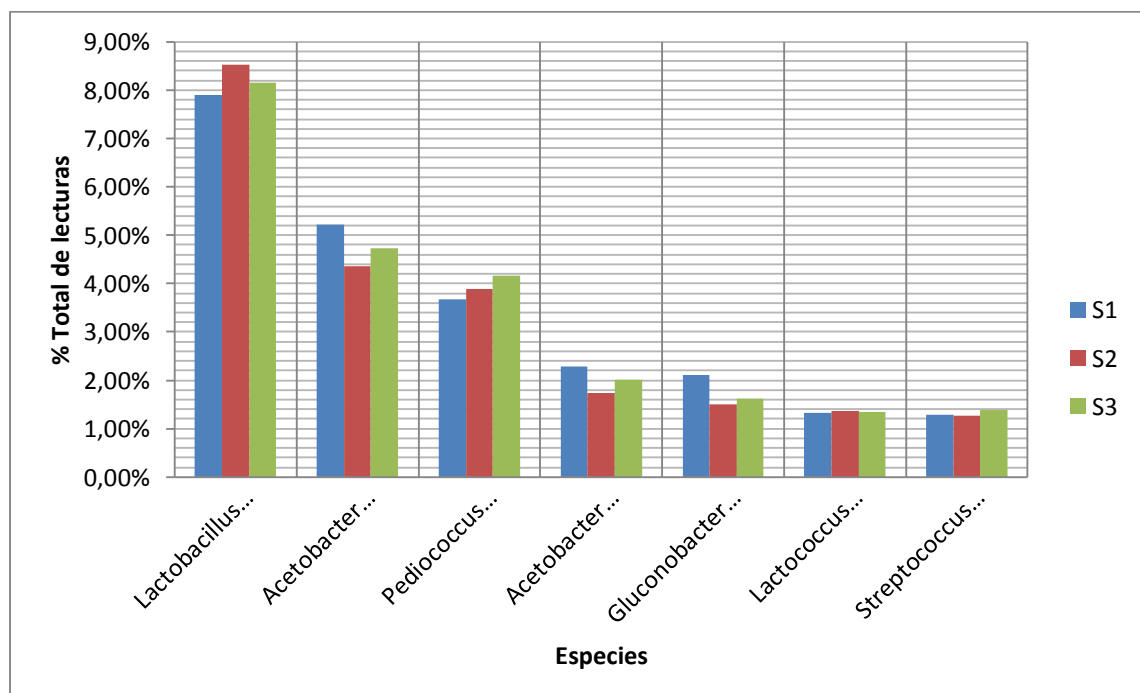
Número de muestra BACTERIA	de Identificación de la muestra	Número de lecturas	% de lecturas clasificadas al género	Especies de Shannon Diversidad	Número de especies Identificadas
S1	2205_64	137398	97.53 %	1.572	759
S2	2205_84	169330	97.99 %	1.456	552
S3	2205_85	168185	98.39 %	1.480	530

Los representantes de las familias Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Moraxellaceae, Microbacteriaceae, Pseudomonadaceae y Micrococcaceae fueron aisladas exclusivamente de los cultivos en aerobiosis. Por otro lado, los representantes de las familias Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Streptomycetacea Rhizobiaceae y Clostridiaceae.

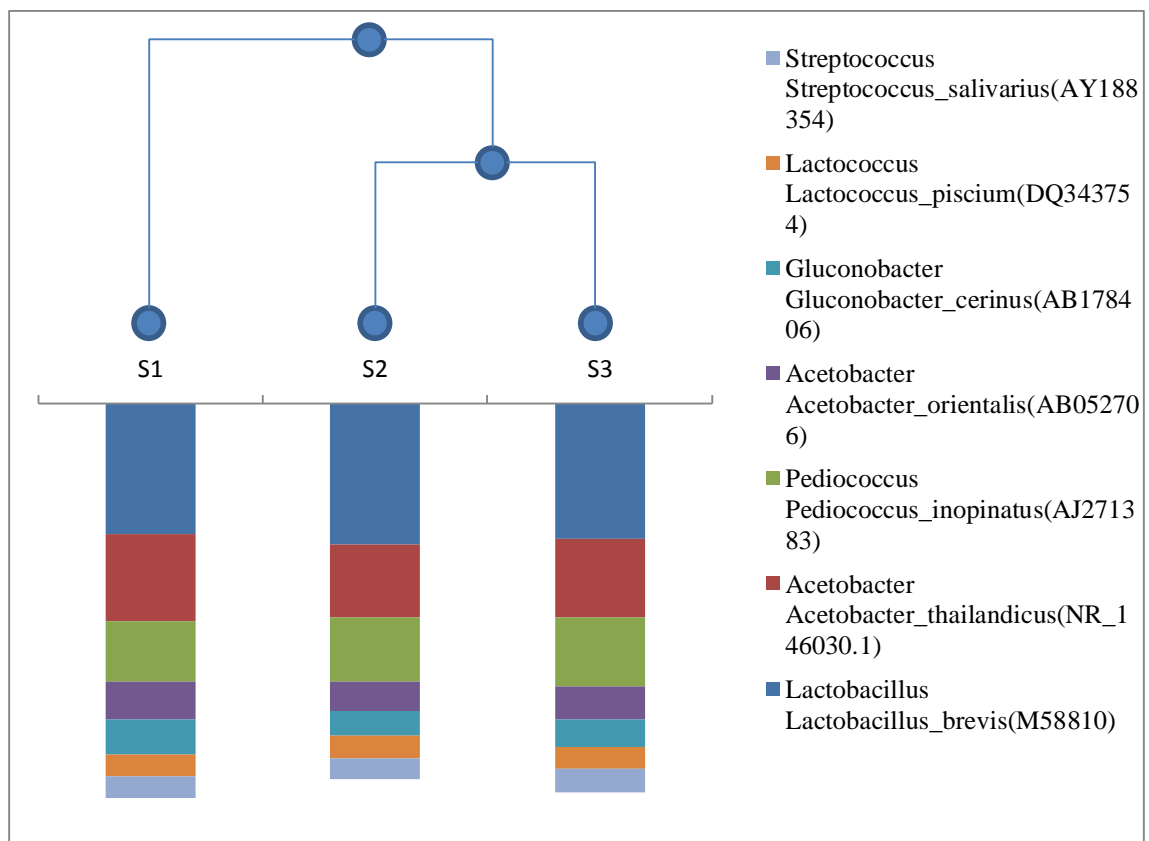


% Total de lecturas	S1	S2	S3
Lactobacillus Lactobacillus_brevis(M58810)	7,89%	8,53%	8,16%
Acetobacter Acetobacter_thailandicus(NR_146030.1)	5,21%	4,36%	4,73%
Pediococcus Pediococcus_inopinatus(AJ271383)	3,68%	3,89%	4,17%
Acetobacter Acetobacter_orientalis(AB052706)	2,29%	1,74%	2,01%
Gluconobacter Gluconobacter_cerinus(AB178406)	2,10%	1,50%	1,61%
Lactococcus Lactococcus_piscium(DQ343754)	1,32%	1,36%	1,34%
Streptococcus Streptococcus_salivarius(AY188354)	1,28%	1,27%	1,39%

Entre las especies y géneros identificados dentro de las muestras se resaltan algunos de importancia probiótica como la especie *Lactobacillus casei* (Parra et al. 2004, (Yadav et al. 2007), (Isolauri et al. 1991), y los géneros *Streptococcus* (Guarner et al. 2011), *Streptomyces* (de Lima Procópio et al. 2012), *Microbacterium*, *Clostridium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Zorriehzahra et al. 2016). Además de su potencial probiótico, varias especies de estos géneros se han aislado de leches de otros mamíferos como las vacas (Kazwala et al. 1998), (Abd-El-Malek & Gibson, 1948), (Wiedmann et al. 2000).



Por lo demás, algunas de las bacterias aisladas en este estudio no lograron ser identificadas hasta especie y al ser pertenecientes a géneros como *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* se encuentran en la dicotomía de tener un potencial probiótico o ser patógenas. Esto debido a que los géneros anteriormente mencionados tienen representantes comúnmente evaluados como probióticos o asociados a la producción de metabolitos secundarios beneficiosos para el hospedero, entre ellos *Streptomyces griseus* (de Lima Procópio et al. 2012) *Agrobacterium azotophilum* (Social & Campus), *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens* (Valverde & Ferraris, 2009), *Staphylococcus hominis* (Sung et al. 2010), *Micrococcus nihinomyaensis* (Osman et al. 2010), (Zorriehzahra et al. 2016); y también, representantes comúnmente asociados a enfermedades en animales, plantas o humanos como *Streptomyces scabies* (Loria et al. 1997), *Staphylococcus aureus* (Lowy, 1998), *Staphylococcus epidermidis* (Vuong & Otto, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Bodey et al. 1983), *Micrococcus luteus* (Dürst et al. 1991), *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner et al. 2001) (Binns y Thomashow, 1988), entre otros



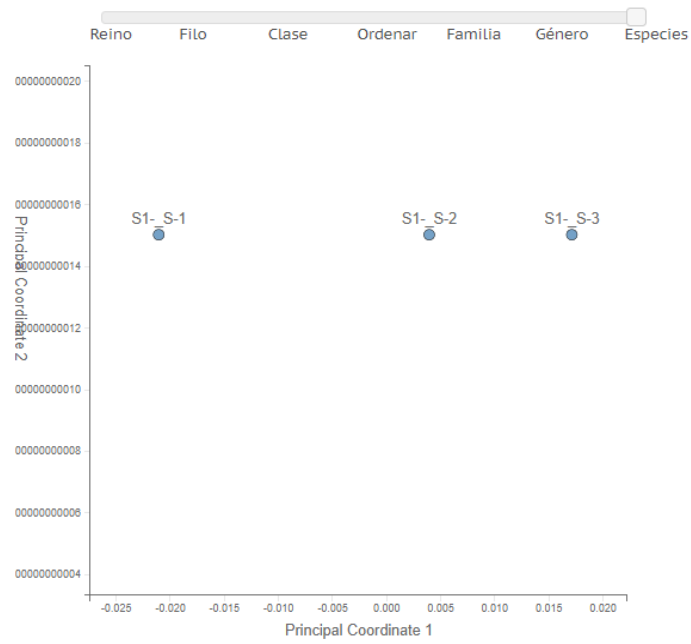
Por lo anterior, aquellas bacterias que pertenezcan a alguno de estos géneros deben ser previamente evaluadas para saber si pertenecen a una especie patógena o a una especie con potencial probiótico. Para esto es pertinente secuenciar otro gen diferente al gen de ARN ribosomal 16S, evaluar la patogenicidad por medio de genes que les confieran esta característica o realizar pruebas bioquímicas que permitan conocer la especie a la que corresponden.

Valor de importancia de las especies

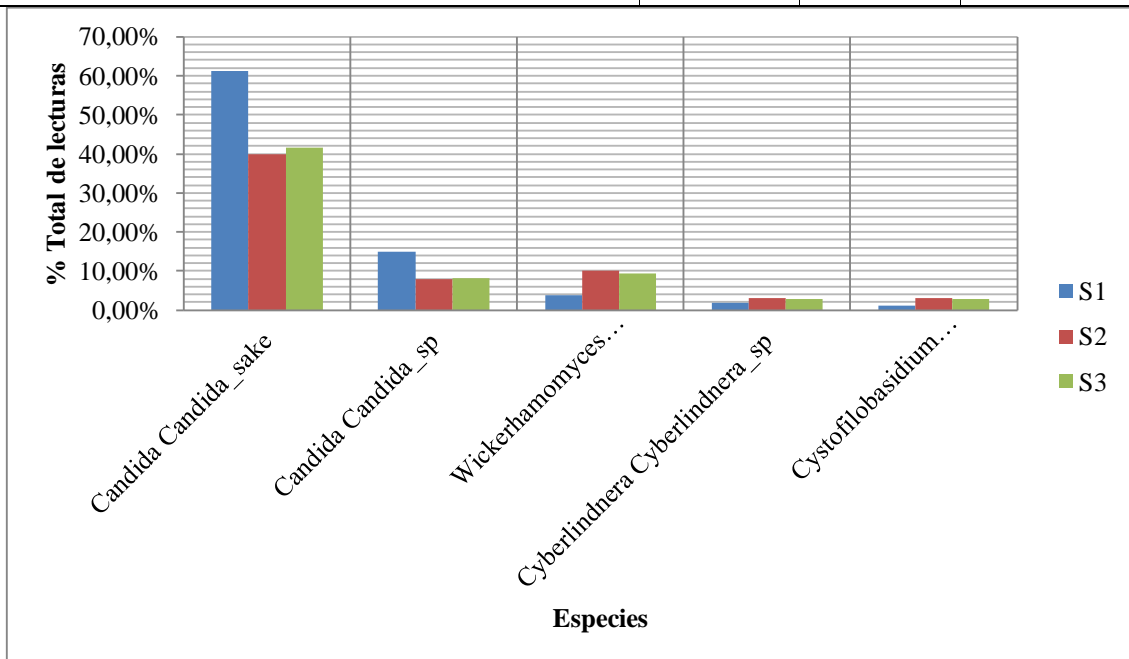
Entre los resultados esperados para este estudio se esperaban varias especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, debido a la presencia de estos en leche de varios mamíferos por sus características probióticas (Guarner, et al. 2011) y a la utilización de medios selectivos que favorecían el crecimiento de géneros como estos. Sin embargo, entre las bacterias que fueron identificadas mediante el método de secuenciación Sanger solo figuró una especie perteneciente a estos dos géneros. Este último se puede deber a un posible sesgo en los resultados, debido a la implementación del método de boiling para la extracción del ADN, empleado en este estudio.

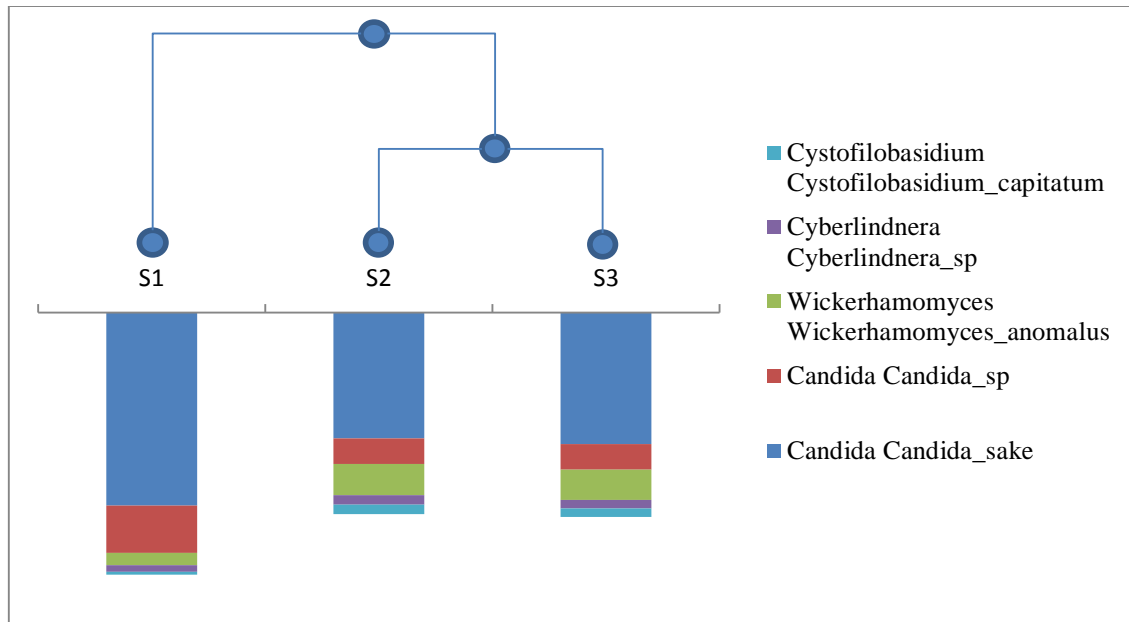
Comunidad Fungica secuenciacion por ITS

Número de muestra FUNGI	Identificación de la muestra	Número de lecturas	% de lecturas clasificadas al género	Especies de Shannon Diversidad	Número de especies Identificadas
S1	2205_70	366924	92.62 %	1.474	402
S2	2205_87	246568	91.50 %	2.285	369
S3	2205_86	280461	91.49 %	2.170	415



% Total de lecturas	S1	S2	S3
Candida Candida_sake	61,16%	39,93%	41,65%
Candida Candida_sp	15,05%	7,86%	8,21%
Wickerhamomyces Wickerhamomyces_anomalus	3,91%	10,11%	9,34%
Cyberlindnera Cyberlindnera_sp	1,94%	2,95%	2,77%
Cystofilobasidium Cystofilobasidium_capitatum	1,02%	2,95%	2,87%





Valor de importancia de las especies

El valor de importancia lo encabezaron las especies sobresalientes en los anteriores parámetros cuantitativos de la comunidad

11. IMPACTOS (TECNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONOMICOS)

Impacto Económico: Este ayudara a minimizar los gastos en uso de fármacos químicos, como bien es cierto el probiótico es un componente natural que da los microorganismo necesarios para promover una buena digestión y nutrición, para que esta no se afecte por agente patógenos invasivos.

Impacto Ambiental: Hacer uso del probiótico, no causa ningún tipo de daño tanto para el ambiente como para el suelo, el impacto que se genera es positivo, gracias a las concentraciones de MM benéficos que componen naturalmente el ambiente, se puede garantizar una recuperación del medio ambiente si se contamina con estos microorganismos.

Impacto Técnico: Se sabe que la tecnificación en unidades de producción agrícola es fundamental, el proporcionar una dieta con mejor aprovechamiento con estos probiótico, es uno de los factores más importantes para la obtención de producciones sostenibles, o eco amigables con productos orgánicos.

12. CONCLUSIONES

- En conclusión, muchas de las bacterias identificadas en este estudio tienen el potencial, según literatura científica, para ser evaluadas como posibles probióticos. Muchas de ellas, al ser pertenecientes a géneros cuyos representantes se han evaluado como probióticos y han resultado efectivos en animales o humanos. Las bacterias y hongos que no lograron ser identificados contaron con una caracterización microscópica y macroscópica que permite su posterior reactivación, para lograr ser identificadas y posteriormente evaluadas como posibles probióticos.
- La tecnología EM en la producción animal se puede utilizar en la cría de animales, manejo de excretas e instalaciones, incrementando las variables productivas y maximizando la eficiencia de los sistemas.
- La eficiencia de los microorganismos de montaña se basa desde su aprovechamiento, pero iniciando con estudios previos de cada una de *core* que derivan en las especies que podemos encontrar dentro de los probiótico.

13. RECOMENACIONES

- Seguir realizando más estudios ya que este es el primer paso de un proyecto que tiene muchas formas de investigación para poder llegar a un probiótico neto y en forma farmacéutico.
- La importancia de la investigación radica de acuerdo a los resultados obtenidos y se puede recomendar que trabajar con el uso de probiótico con mayor precisión de acuerdo a sus análisis

14. BIBLIOGRAFIA

1. Vallejos P. ANALISIS SOBRE LA EFICIENCIA DEL USO DE MICROORGANISMOS DE MONTAÑA PARA POTENCIAR LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS [Internet]. Vol. 1, Universidad técnica de cotopaxi. 2021. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
2. Londoño MA. Efecto de los microorganismos eficientes sobre la calidad del ensilaje de maíz y su utilización en lechería tropical. 2008.
3. Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, Bochicchio J, Krohn A, Caporaso JG, et al. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(24):7217–26.
4. Villalobos N, Ruiz J. Elaboración de microorganismos de montaña [Internet]. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2016. Available from: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/drocc-hoja-divulgativa-40-2016.pdf>
5. León D. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN CIENTÍFICA DE MICROORGANISMOS EFICIENTES DE MONTAÑA PARA POTENCIAR LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS [Internet]. Vol. 1, Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad. 2020. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
6. Cadena B. Evaluación de microorganismos de montaña y pro biótico comercial, en lechones de pre-cría en el cantón Babahoyo. Universidad Técnica De Babahoyo. 2019.
7. Morocho M, Mora M. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Cent Agrícola.* 2019;46(2):93–103.
8. Saavedra M, Id T, Id D cauch J, Id A figueroa G, Id G vieyra I, Id Q páramo M, et al. Microorganismos de montaña y ensilado de maíz como probióticos en la engorda de conejos. *Abanico Vet.* 2021;11:1–9.
9. Bueno LLoreda C, Lesmes Rodas N. Utilización de microorganismos eficientes en levante de novillas Brahman bajo pastoreo semi-intensivo suplementado en la región de Palmira, Valle del Cauca [Internet]. 2007. Available from: <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/183>

10. Moreno J, Velarde K. “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y USOS POTENCIALES DE MICROORGANISMOS DE TIERRA DE MONTAÑA Y SUBTRÓPICO DURANTE EL PERIODO 2016. 2016.
11. Umaña S, Rodríguez K, Rojas C. ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Rev Ciencias Ambient.* 2017;51(2):133.
12. Sánchez E. Evaluación de niveles de microorganismos de montaña en pollos broilers Babahoyo los Ríos. Vol. 1, Universidad Técnica De Babahoyo. 2020.
13. Centeno J. Microorganismos benéficos de montaña como bioestimulante y probiótico contribuyen al bienestar animal. [Internet]. 2012. Available from: <http://repositorio.una.edu.ni/1467/1/tnl02c397m.pdf>
14. Medina-Saavedra T, Dzul-Cauich J, Arroyo-Figueroa G, García-Vieyra I, Quiñones-Páramo M, Mexicano-Santoyo M. Mountain microorganisms and corn silage as probiotics in the fattening of rabbits. *Abanico Vet* [Internet]. 2021;11(December):1–9. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322021000100401&lang=es%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/av/v11/2448-6132-av-11-e401.pdf
15. Castillo Amador C, Urbina Zambrana U. Evaluación del uso de microorganismos de montaña como probióticos naturales líquidos y sólidos en pollos de engorde, finca Santa Rosa, Managua [Internet]. 2014. Available from: <http://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/3152>
16. López López G del S, Carballo Barquero RA. Efecto De La Suplementación Con Microorganismos Benéficos De Montaña En Pollos De Engorde Como Probiótico Natural, Finca Santa Rosa, Universidad Nacional Agraria. 2014.
17. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43(4):777–80.
18. Walters W, Hyde ER, Berg-lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, et al. Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems.* 2015;1(1):e0009-15.
19. Picazo F, Vilmi A, Aalto J, Soininen J, Casamayor EO, Liu Y, et al. Climate mediates

- continental scale patterns of stream microbial functional diversity. *Microbiome*. 2020;8(1):1–14.
20. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7537–41.
 21. Caillagua S, Sánchez J. “EVALUAR LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTENIDOS EN UN BIOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MEZCLAS FORRAJERAS EN UNA UNIDAD PRODUCTIVA AGROPECUARIA EN EL CANTÓN QUITO SECTOR CHILLOGALLO. Univ Técnica Cotopaxi [Internet]. 2020;1:70. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
 22. Mathews. bioquímica. PhD Proposal. 2015.
 23. Cruz D. Efecto de los Microorganismo de Montaña Activados (MMA) en la alimentación de vacas lecheras en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano [Internet]. 2021. Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7147>
 24. Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield JF. Short-Read Assembly of Full-Length 16S Amplicons Reveals Bacterial Diversity in Subsurface Sediments. *PLoS One*. 2013;8(2).
 25. Vanysacker L, Declerck SAJ, Hellemans B, De Meester L, Vankelecom I, Declerck P. Bacterial community analysis of activated sludge: An evaluation of four commonly used DNA extraction methods. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;88(1):299–307.
 26. Chukwuma OB, Rafatullah M, Tajarudine HA, Ismail N. A review on bacterial contribution to lignocellulose breakdown into useful bio-products. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(11).
 27. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Vol. 45, *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. p. 2761–4.
 28. Degnan PH, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME J*. 2012;6(1):183–94.

29. Shade A, Handelsman J. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol.* 2012;14(1):4–12.
30. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(PART 3):716–21.
31. Alvarez Encinas CM, Villalobos Villalobos G, Domínguez Viveros J, Corral Flores G, Alvarez Almora E, Castillo Rangel F. Animal performance and nutrient digestibility of feedlot steers fed a diet supplemented with a mixture of direct-fed microbials and digestive enzymes. *Rev Bras Zootec* [Internet]. 2018;47:7. Available from: <https://doi.org/10.1590/rbz4720170121>
32. Barzallo-Bravo LA, Carrera-Villacrés D, Vargas-Verdesoto RE, Ponce-Loaiza LK, Correoso M, Gavilanes-Quishpi AP. Bio-digestion and post-treatment of effluents by bio-fermentation, an opportunity for energy uses and generation of organic fertilizers from bovine manure. *Int J Recycl Org Waste Agric* [Internet]. 2019;8(4):431–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0275-5>

15. ANEXOS

Anexo N°1. Hoja de vida del Tutor Académico

I. DATOS INFORMATIVOS

Apellidos: VALENCIA BUSTAMANTE

Nombres: BYRON ANDRÉS

Lugar y fecha de nacimiento: Quito, 06 de abril de 1984.

Estado civil: Soltero con una hija

N° de cédula de ciudadanía: 1719622647

Dirección domiciliaria: Barrio “El Trigal”. Calle Juan Pablo II 314 y Calle “L” (Sector Universidad Tecnológica Equinoccial, Av. Mariscal Sucre).

Números telefónicos: (02) 4510921 / 0984140211

Correo electrónico: avalenciaregion2@gmail.com / byron.valencia2647@utc.edu.ec

Tipo de sangre: O Positivo

II. FORMACIÓN ACADÉMICA

A. POS GRADUACIÓN

Maestría en Producción Animal (ESPE). Fecha de registro: 20 de agosto del 2015.

B. EDUCACIÓN SUPERIOR:

Médico Veterinario Zootecnista; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

Universidad Central del Ecuador. Fecha de registro: 01 de abril del 2013

III. EXPERIENCIA LABORAL

- TRABAJO. Universidad Técnica de Cotopaxi. Docente-Gestión. Profesor de cátedras de medicina veterinaria y zootecnia. Entrada 01 de noviembre 2021 hasta la presente fecha.
- TRABAJO. Instituto Tecnológico Superior Superarse. Profesor de cátedras de producción animal y cuidado canino y prácticas preprofesionales. Entrada 02 de noviembre de 2020 hasta abril 2022
- TRABAJO. Universidad Técnica de Cotopaxi. Docente-Gestión. Profesor de cátedras de medicina veterinaria y zootecnia. Entrada 15 de octubre 2019 hasta marzo 2020.

- TRABAJO. Técnico del proyecto Nacional de Innovación Tecnológica Participativa y Productividad Agrícola PITPPA con apoyo en Ganadería. Lugar de intervención Nanegalito, Pacto y Gualea. MAG-Dirección Provincial de Pichincha. Entrada 01 de abril del 2015 hasta octubre 2019.
- TRABAJO. Técnico de Campo. Estrategia Hombro a Hombro. Sector Pifo y Nanegalito. MAGAP-Dirección Provincial de Pichincha. Entrada 01 de abril del 2015 hasta la presente fecha.
- TRABAJO. Inspector Pecuario en el Proceso Desconcentrado Pichincha “AGROCALIDAD” Del 01 de noviembre de 2013 al 03 de febrero de 2014.

V. TRABAJOS REALIZADOS

- Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el Título de Médico

Veterinario Zootecnista. “DETERMINACIÓN DE Salmonella spp. EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE QUITO”. Coautores: Juan Pablo Estrada Aguila y Byron Andrés Valencia Bustamante. Tutor: Dr. Richar Rodríguez H., Ph.D. Quito, julio, 2012.

VI. IDIOMAS

- Nivel intermedio del Idioma Inglés, aprobado en el Centro de Educación Continua de la Universidad Politécnica Nacional del Ecuador (2009).
- Suficiencia del Idioma Portugués. Instituto Brasileiro-Ecuatoriano de Cultura. 300 horas. Junio, 2013.

Anexo 2°. Hoja de vida del estudiante**Datos personales****Apellidos:** Zapata Tapia**Nombres:** Víctor Aníbal**Estado civil:** Soltero**Cedula de ciudadanía:** 1725923260**Lugar y fecha de nacimiento:** Quito, 12 Enero 2000**Dirección domiciliaria:** Aloasí-Barrio El Calvario Calle Eloy Alfaro**Teléfono convencional:** 022309556**Teléfono Celular:** 0980102875**Emil institucional:** victor.zapata3260@utc.edu.ec**Tipo de discapacidad:** Ninguna**Estudios realizados y títulos obtenidos nivel**

Nivel	Título obtenido	Institución educativa
Segundo	Bachiller Técnico Agropecuario	Colegio Técnico Particular Génova Germán
Tercer	Noveno nivel de Medicina Veterinaria	Universidad Técnica de Cotopaxi (Ecuador)

Experiencia Laboral**Empresa:** Animal Biogenetic**Área:** Pasantía, biotecnologías de la reproducción y servicios veterinarios.

Anexo 3°. Fotografías

Figura 3. Captura y colecta de Microorganismos de Montaña



Fuente: Víctor Zapata

Figura 4. Propagación de los microorganismos de montaña



Fuente: Víctor Zapata

Figura 5. Vacas lecheras en consumo de los microorganismos



Fuente: Víctor Zapata

Anexo N° 4. Aval de traducción

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE MICROORGANISMOS BENEFICOS DE MONTAÑA COMO PROBIÓTICO EN BOVINOS DE LECHE”** presentado por: **Zapata Tapia Víctor Aníbal**, egresado de la Carrera de: **Medicina Veterinaria**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, Octubre del 2022.

Atentamente,


 **CENTRO DE IDIOMAS**

Mg. Marco Paul Beltrán Semblantes
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC
CC: 0502666514

