

**EVALUACIÓN *in vitro* DE *Lactobacillus lactis* Y *Lactobacillus casei* SOBRE
EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus agalactiae Y *Escherichia coli*, COMOPRINCIPALES AGENTES
CAUSANTES DE MASTITIS SUBCLINICA EN VACAS HOLSTEIN**



MANUEL HERNANDO GUZMÁN INSUASTY
M.V. Esp.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
SAN JUAN DE PASTO
2015

**EVALUACIÓN *in vitro* DE *Lactobacillus lactis* Y *Lactobacillus casei* SOBRE
EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus agalactiae Y *Escherichia coli*, COMOPRINCIPALES AGENTES
CAUSANTES DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS HOLSTEIN**

MANUEL HERNANDO GUZMÁN INSUASTY

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al Título de Magister
en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción Animal**

**Director de trabajo:
HENRY JURADO GÁMEZ
Zoot. Esp. M.Sc Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
SAN JUAN DE PASTO
2015**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo Primero del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

**HECTOR FABIO VALENCIA, M.V.Z. Esp.
Jurado Delegado**

**JAVIER ANDRÉS MARTINEZ BENAVIDES, Zoot. M.Sc.
Jurado**

**CATALINA ESTHER AVENDAÑO Microb. Esp. Ph. D.
Jurado**

**HENRY JURADO GÁMEZ. Zoot. Esp. M.Sc Ph.D
Asesor**

San Juan de Pasto, Junio de 2015

AGRADECIMIENTOS

Henry Jurado Gámez, Zootecnista, Esp., M. Sc., Ph.D.

Héctor Fabio Valencia, Médico Veterinario. Esp.

Javier Andrés Martínez, Zootecnista. M.Sc.

Catalina Avendaño, Microbióloga. Esp. Ph.D.

Al personal de laboratorios de Ciencias Pecuarias, Medicina Veterinaria, Especializados y Microbiología como principales colaboradores en el proceso.

Los resultados preliminares de los ensayos que se obtuvieron en el presente trabajo de grado de Maestría se han presentado en los siguientes congresos y publicaciones:

Guzmán-Insuasty MH, Jurado-Gámez HA. Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus casei* sobre el control de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* agentes causantes de mastitis subclínica. En: XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Memorias. Palacio de convenciones de la Habana, Cuba. Celebrado del 6 al 9 de octubre de 2014.

Guzmán-Insuasty MH, Jurado-Gámez HA. Determinación del efecto probiótico de *Lactobacillus lactis* sobre el control de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* como principales agentes causantes de mastitis subclínica en vacas Holstein. En: IV Seminario Internacional de Ciencias Pecuarias. Memorias. San Juan de Pasto, Colombia. Celebrado del 12 al 14 mayo de 2015.

Guzmán-Insuasty MH, Jurado-Gámez HA. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Rev. Med. Vet. Zoot. Aceptado para publicación.

Guzmán-Insuasty MH, Jurado-Gámez HA, Jarrín-Jarrín V. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Rev. Med. Vet. Zoot. Aceptado para publicación.

La revista pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Bogotá. Esta revista es indexada en la categoría A2 de Colciencias.

El presente trabajo hace parte de los proyectos ejecutados por el grupo FISE-PROBIOTEC de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño, categorizado B por Colciencias.

DEDICATORIA

A Dios ser supremo por darme vida para culminar este proyecto
Mis padres y familiares por su apoyo incondicional

RESUMEN

Se evaluó el efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Para ello, se usaron cepas lácticas y patógenas de casa comercial y se aisló cepas patógenas en la Vereda La Victoria, Corregimiento de Catambuco al suroccidente del municipio de Pasto, Nariño, Colombia. Se determinó el efecto de los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina sobre todas las cepas (patógenas y lácticas). Se evaluó la inhibición producida por *L. casei* y *L. lactis* y sus sobrenadantes sobre las bacterias patógenas. Se determinaron condiciones gastrointestinales *in vitro* de crecimiento de las bacterias lácticas a tres niveles de pH (2.5, 4.5 y 7), tres concentraciones de sales biliares (0.5, 1 y 2%), dos de bilis bovina (1 y 1.2%), y dos temperaturas (38 y 45°C). Igualmente se realizó la cinética de crecimiento, reducción del pH, consumo de azúcar total, consumo de proteína y porcentaje de ácido láctico durante la cinética de fermentación. Mediante HPLC se evaluaron los péptidos y los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de las cepas lácticas.

L. casei mostró susceptibilidad a la Ciprofloxacina y Ampicilina, *L. lactis* a Ciprofloxacina, Gentamicina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina. Mientras que *S. aureus* mostró susceptibilidad y resistencia a todos los antibióticos para la cepa comercial y aislada respectivamente, el mismo comportamiento se presentó con *S. epidermidis*. Las cepas de *S. agalactiae* y *E. coli* aisladas y comerciales mostraron susceptibilidad a los antibióticos. *L. casei* mostró un efecto de inhibición de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. agalactiae*, pero no fue efectiva con *E. coli*, igual comportamiento se observó con el uso del sobrenadante de la bacteria láctica. Por otro lado *L. lactis* y su sobrenadante inhibieron a todas las cepas patógenas. Aunque se debe tener en cuenta que en ambas cepas, las bacterias aisladas presentaron menores halos de inhibición. En *L. casei* se encontró

crecimiento de 1×10^{10} y 5.1×10^7 UFC/ml para 1 y 1.2 % de bilis bovina; 2.3×10^7 , 1×10^9 y 3×10^8 UFC/ml para 0.5, 1 y 2 % de sales biliares, 1.1×10^{11} , 2.0×10^{10} y 1.0×10^{10} UFC/ml para pH de 2.5, 4.5 y 7, mientras que para *L. lactis*, 0 y 5×10^9 UFC/ml a 1 y 1.2% de bilis bovina; con sales biliares se encontró crecimiento únicamente a 0.5% (5×10^8 UFC/ml); 1.4×10^{12} , 6.4×10^{11} y 7.5×10^{11} para pH 2, 4.5 y 7 y 2.8×10^{12} y 3.1×10^{12} UFC/ml para 38 y 45°C. La fase exponencial se encontró a 16:48 horas con un crecimiento de 3×10^{10} UFC/ml para *L. casei* y 14:48 h y 2×10^{11} UFC/ml para *L. lactis*. Las variables pH, azúcar, acidez y proteína para *L. casei* durante la fase exponencial fueron de 4.94, 0.88 mg/l, 2.89 mg/l y 1.9 mg/l, respectivamente, y para *L. lactis* 4.29, 2.18 mg/l, 0.62% y 0.279 mg/l respectivamente. La prueba de HPLC para péptidos mostró la presencia de una cadena VAL-TIR-VAL en el sobrenadante de las cepas lácticas y para ácidos orgánicos se encontró una producción de 83.46 y 82.9% de ácido láctico para *L. casei* y *L. lactis* respectivamente. De esta manera las cepas lácticas evaluadas mostraron buenas características probióticas que permitirían su aplicación en ensayos *in vivo* para el control de microorganismos causantes de mastitis subclínica en vacas lecheras en sistemas de producción de la región.

ABSTRACT

Effect of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus lactis* on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* was evaluated. To do this, lactic and pathogenic bacterias of commercial house strains were used and pathogenic strains was isolated in La Victoria, Catambuco Municipality of Pasto, Nariño, Colombia. The effect of Dicloxacillin, Cefepime, Cephalothin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Penicillin, Ampicillin and Trimethoprim sulfa antibiotics on all strains (pathogenic and lactic) was evaluated. Inhibition produced by *L. casei* and *L. lactis* and their supernatants on pathogenic bacteria was evaluated. Gastrointestinal *in vitro* growth conditions of lactic three pH levels (2.5, 4.5 and 7), three bile salt concentrations (0.5, 1 and 2%) was evaluated, two of bovine bile (1 and 1.2%), and two temperaturas (38 and 45°C). Similarly growth kinetics, reduced pH, total sugar intake, protein intake and percentage of lactic acid during fermentation kinetics was determined. HPLC peptides and organic acids present in the supernatant of the lactic strains were determined.

L. casei showed susceptibility to Ciprofloxacin and Ampicillin, *L. lactis* to Ciprofloxacin, Gentamicin, Penicillin, Ampicillin and Trimethoprim sulfa. While *S. aureus* showed susceptibility and resistance to all antibiotics for comercial and isolate respectively, the same behavior was presented with *S. epidermidis*. The strains of *S. agalactiae* and *E. Coli* isolated and trade showed susceptibility to antibiotics. *L. casei* showed an inhibitory effect of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. agalactiae*, but was not effective in *E. coli*, similar behavior was observe during the supernatant of lactic bacteria. Furthermore *L. lactis* supernatant inhibited and all pathogenic strains. While it should benoted that in both strains, isolated bacterias showed lower inhibition. In *L. casei* growth of 1×10^{10} and 5.1×10^7 CFU/ml to 1 and 1.2% bovine bile it was found; 2.3×10^7 , 1×10^9 and 3×10^8 CFU/ml for 0.5, 1 and 2% bile salts, 1.1×10^{11} , 2.0×10^{10} and 1.0×10^{10} CFU/ml for pH 2.5, 4.5 and 7, while for *L. lactis*, 0 and 5×10^9 CFU/ml to 1 and 1.2% bovine bile; with bile salts

growth was found only 0.5% (5×10^8 CFU/ml); 1.4×10^{12} , 6.4×10^{11} and 7.5×10^{11} to pH 2, 4.5, 7 and 2.8×10^{12} and 3.1×10^{12} CFU/ml for 38 and 45 °C. The exponential phase was found to 16:48 hours with a growth of 3×10^{10} CFU/ml for *L. casei* and 14:48 h 2×10^{11} CFU/ml for *L. lactis*. Variables pH, sugar, acidity and protein to *L. casei* during the exponential phase were 4.94, 0.88 mg/l, 2.89mg/l and 1.9mg/l, respectively. For *L. lactis* 4.29, 2.18 mg/l, 0.62% and 0.279mg/l respectively. HPLC to test peptides showed the presence of a TIR-VAL-TIR chain in the supernatant of lactic acid and organic acids production strains 83.46 and 82.9% lactic acid to *L. casei* and *L. lactis* respectively. Thus, lactic probiotic strains tested showed good characteristics that allow its application *in vivo* tests for control of microorganisms that cause subclinical mastitis in dairy cows in region's productive systems.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. LECHE BOVINA	21
2.2 MASTITIS	22
2.2.1 Etiología.....	24
2.2.2 Principales microorganismos implicados en mastitis.....	25
2.2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
2.1.2.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
2.2.2.4 <i>Escherichia coli</i>	27
2.3 BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS (BAL)	27
2.1.2 Los probióticos como alternativa al uso de antibióticos	29
2.1.3 <i>Lactobacillus lactis</i>	30
2.3.3 <i>Lactobacillus casei</i>	30
2.4 BACTERIOCINAS O BIOCINAS.....	31
2.4.1 Espectro antimicrobiano de las biocinas	32
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
3.1 LOCALIZACIÓN ZONA DE ESTUDIO.....	34
3.2 CEPAS.....	34
3.2.1 Reconstitución, siembra y cultivos de bacterias lácticas y patógenas comerciales.....	34
3.2.2 Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas provenientes de vacas con mastitis subclínica.....	36
3.3 EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LAS BACTERIAS EVALUADAS.	37
3.4 EFECTO DE INHIBICIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SUS SOBRENADANTES SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS.....	38
3.5 PRUEBAS DE SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL	39
3.5.1 Bilis bovina y Sales biliares.	39

3.5.2	Prueba de catalasa y gas.	39
3.5.1	Prueba de pH.	39
3.5.4	Prueba de temperatura.	39
3.5.5	Cinética de crecimiento de las cepas lácticas.	40
3.6	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN EL SOBRENADANTE.	42
3.6.1	Péptidos por HPLC.	42
3.6.2	Ácidos orgánicos por HPLC.	42
3.7	HIPÓTESIS.	42
3.7.1	Hipótesis Nula.	42
3.7.2	Hipótesis Alterna.	43
3.8.	DISEÑO EXPERIMENTAL.	43
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
4.1	AISLAMIENTO DE CEPAS.	45
4.2	ANTIBIOGRAMA.	46
4.2.1	Cepas patógenas.	47
4.2.2	Cepas lácticas.	50
4.3	PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU SOBRENADANTES EN CEPAS PATÓGENAS.	50
4.3.1	Efecto de inhibición de las bacterias lácticas sobre los microorganismos patógenos.	50
4.3.1.1	Inhibición de <i>Lactobacillus casei</i> sobre las bacterias patógenas.	50
4.3.1.2	Inhibición de <i>Lactobacillus lactis</i> sobre las bacterias patógenas.	52
4.3.1.3	Efecto de inhibición del sobrenadante de <i>Lactobacillus casei</i> sobre las bacterias patógenas.	54
4.3.1.4	Efecto de inhibición del sobrenadante de <i>Lactobacillus lactis</i> sobre las bacterias patógenas.	58
4.4	PRUEBAS GASTROINTESTINALES.	61
4.4.1	Prueba de Sales biliares y Bilis bovina. Los resultados obtenidos para estas variables se pueden observar en la tabla 2.	61
4.4.2	Pruebas de catalasa y gas.	62

4.4.3 Pruebas de pH. Los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas 3 y 4 para <i>L. casei</i> y <i>L. lactis</i> respectivamente.	63
4.4.4 Prueba de temperatura sobre las bacterias lácticas. En la tabla 5 se observa los valores de crecimiento de las bacterias lácticas evaluadas a dos niveles de temperatura.....	65
4.5 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.	66
4.5.1 Evaluación del crecimiento de las bacterias lácticas en el medio MRS.	66
4.5.2 Evolución del pH durante la cinética de fermentación en medio MRS.	67
4.5.3 Incremento de la acidez durante la cinética de fermentación en medio MRS.	69
4.5.4 Consumo de azúcar durante la cinética de fermentación en medio MRS....	70
4.5.5 Consumo de proteína durante la cinética de fermentación en medio MRS.	71
4.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN EL SOBRENADANTE DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.	71
4.6.1 Análisis de péptidos en el sobrenadante de <i>Lactobacillus casei</i>	71
4.6.2 Análisis de ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus lactis</i>	75
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES.....	78
BIBLIOGRAFÍA.....	79
ANEXOS	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos.	46
Tabla 2. Crecimiento de las cepas lácticas a diferentes niveles de bilis bovina y sales biliares.	61
Tabla 3. Prueba de pH para <i>L. casei</i>	63
Tabla 4. Valores de crecimiento de <i>Lactobacillus lactis</i> evaluado a diferentes niveles de pH.	64
Tabla 5. Crecimiento de <i>Lactobacillus lactis</i> y <i>Lactobacillus casei</i> evaluados a dos temperaturas.	65
Tabla 6. Resultados análisis de péptidos para las bacterias lácticas a 214 nm.	72
Tabla 7. Péptidos patrón.	74
Tabla 9. HPLC para ácidos orgánicos usando el sobrenadante de <i>Lactobacillus casei</i>	75
Tabla 10. Resultados de HPLC para ácidos orgánicos en sobrenadante de <i>Lactobacillus lactis</i>	75
Tabla 11. Resumen de la cinética de fermentación en medio MRS.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía microscópica de las bacterias lácticas y las bacterias patógenas.	45
Figura 2. Antibiograma de las cepas.	47
Figura 3. Halos de inhibición de <i>L. casei</i> sobre las bacterias patógenas expresados en mm.	50
Figura 4. Halos de inhibición de <i>Lactobacillus lactis</i> y <i>Lactobacillus casei</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 5. Halos de inhibición en mm de <i>L. lactis</i> sobre las bacterias patógenas. .	53
Figura 6. Halos de inhibición de <i>Lactobacillus lactis</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Figura 7. Halos de inhibición medidos en mm del sobrenadante de <i>L. casei</i> sobre las bacterias patógenas aisladas.	55
Figura 8. Halos de inhibición de sobrenadante de <i>Lactobacillus casei</i>	55
Figura 9. Inhibición del sobrenadante de <i>L. casei</i> sobre las bacterias patógenas de referencia.	57
Figura 10. Halos de inhibición del sobrenadante de <i>L. lactis</i> sobre las bacterias patógenas aisladas.	58
Figura 11. Halos de inhibición del sobrenadante de <i>Lactobacillus lactis</i>	59
Figura 12. Halos de inhibición del sobrenadante de <i>L. lactis</i> sobre las bacterias patógenas de referencia.	60
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> y <i>L. casei</i> en medio MRS.	66
Figura 14. Reducción del pH durante la cinética de fermentación y crecimiento microbiano de <i>L. lactis</i> y <i>L. casei</i> en medio MRS.	67
Figura 15. Aumento de la acidez durante la cinética de fermentación de <i>L. lactis</i> y <i>L. casei</i> en el medio MRS.	69
Figura 16. Consumo de azúcar de <i>L. lactis</i> y <i>L. casei</i> en medio MRS durante la cinética de fermentación.	70
Figura 17. Consumo de proteína durante la cinética de fermentación de las bacterias lácticas.	71
Figura 18. Cromatograma de <i>L. casei</i> a 214 nm y estándar de calibración.	73
Figura 19. Cromatograma de <i>L. lactis</i> a 214 nm y estándar de calibración.	73
Figura 20. Cromatograma de péptidos patrón.	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™.....	95
Anexo B. Método de Dubois	96
Anexo C. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona).....	98
Anexo D. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de las dos cepas	100

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una infección intramamaria que afecta al ganado lechero, su impacto sobre la industria láctea es importante, ya que disminuye la producción en un 4 a 30%, afecta la calidad de la leche e incrementa los costos de producción por tratamiento de la enfermedad y desecho prematuro de animales (Bedolla y Ponce de León, 2008). Esta patología ha constituido uno de los retos sanitarios más difíciles de controlar en los sistemas ganaderos, su tratamiento se ha realizado generalmente con antibióticos, generando mayores implicaciones económicas por los sobrecostos de tratamiento y la pérdida de leche como consecuencia del tiempo de retiro (Calderón y Rodríguez, 2008).

Para la mastitis subclínica se reportan más de 100 microorganismos causantes, la mayoría de las infecciones son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas; aunque se puede presentar por heridas y con menor frecuencia por alergias y neoplasia (Bedolla y Ponce de León, 2008; Pastor-Guisar y Bedolla-Cedeño, 2008). Las principales bacterias implicadas en la enfermedad son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, también son importantes *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* (Osteras et al. 2006).

S. aureus es un coco Gram-positivo y es el microorganismo causante de mastitis subclínica más frecuente en ganado lechero, genera una infección intra-mamaria, por lo cual puede contaminar el tanque de leche y constituirse en riesgo para el consumidor (Bergonier et al. 2014). La cepa es problemática debido a su resistencia a los tratamientos antibióticos y su repetición crónica.

S. epidermidis un coco Gram-positivo, se encuentra presente en el medio ambiente, es una agente causante de mastitis, aunque en menor medida que el anterior, sin embargo, es difícil de erradicar dato su permanencia en el ambiente.

E. coli es una bacteria Gram-negativa no esporulada presente en el tracto gastrointestinal, se encuentra en gran abundancia con el estiércol, siendo su principal fuente de contaminación (Roldán *et al.* 2011).

Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse al medio, por lo cual en muchos casos generan resistencia a los agentes antimicrobianos, como desinfectantes, antibióticos, etc. Este proceso se agudiza por el uso indiscriminado de este tipo de productos; es así como en los últimos años, especies como *S. aureus* han presentado alta resistencia a este tipo de productos, que trae como consecuencia un difícil manejo de los microorganismos a nivel de campo (Rotem *et al.* 2012).

Con el fin de evitar estos inconvenientes, se busca una alternativa para el control de la mastitis subclínica mediante pruebas *in vitro* que determinen características probióticas de las cepas lácticas. Los resultados permitirán identificar los microorganismos que sean importantes en el control de bacterias patógenas causantes de mastitis subclínica y sugerir su evaluación en condiciones *in vivo*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* sobre el control de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, como principales agentes causantes de mastitis subclínica en vacas Holstein.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* en el medio comercial MRS para definir la fase máxima de crecimiento.
- Determinar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* y su sobrenadante, sobre las bacterias de referencia ATCC y las aisladas, principales agentes causantes de mastitis subclínica.
- Comparar el efecto inhibitorio del sobrenadante de las bacterias ácido lácticas (BAL), frente al efecto causado por los antibióticos normalmente utilizados en el tratamiento de mastitis subclínica.
- Identificar molecularmente por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), los principales péptidos de los sobrenadantes de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LECHE BOVINA

La leche, producto de la secreción de la glándula mamaria de hembras bovinas, constituye uno de los alimentos más completos dentro de la dieta humana, debido a su alto contenido de vitaminas y minerales (Quintero, 2011). A nivel mundial, entre 2000 y 2012 la producción de leche líquida presentó una tasa de crecimiento anual de 1.8%, llegando a 578 millones de toneladas. Los mayores productores están en la Unión Europea, Estados Unidos, Rusia, Brasil y Nueva Zelanda que concentran 75% de la producción mundial (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, 2013).

De acuerdo con la FAO durante el 2014 el consumo per cápita de leche a nivel mundial presentó los siguientes estratos:

- Alto en los países de América del Norte, Argentina, Armenia, Australia, Costa Rica, Europa, Israel, Kirguistán y Pakistán, con valores superiores a 150 kilogramos por año.
- Medio en los países de la India, Japón, Kenia, México, Mongolia, Nueva Zelandia, República Islámica de Irán, África septentrional y meridional, la mayoría del Oriente Próximo y la mayor parte de América Latina y el Caribe, con valores entre 30 a 150 kg por año.

- Bajo en los países de China, Etiopía, la mayoría de África central y la mayor parte de Asia oriental y sudoriental, con valores menores a 30 kilogramos por año.

Colombia es el cuarto productor de leche en América Latina con un volumen aproximado de 6500 millones de litros anuales, superado por Brasil, México y Argentina y una tasa de crecimiento promedio anual de 3.5% (Ministerio de agricultura y desarrollo rural MADR, 2010; Proexport, 2011). Igualmente se reporta un consumo per cápita medio de 141 litros año (FAO 2014).

La producción total de leche en el departamento de Nariño es de 760000 litros por día y el promedio de producción de 6,9 litros/animal/día (ENA, 2012). Guachucal es el municipio con mayor producción de leche en el departamento con 101938 litros/día, lo cual corresponde al 13.4% de leche producida en el departamento. La Ex provincia de Obando representada por los municipios de: Aldana, Contadero, Córdoba, Cuaspud, Cumbal, Funes, Guachucal, Gualmatan, Ipiales, Iles, Potosí, Puerres y Pupiales; y los 27 resguardos indígenas de los pastos, producen 438364 litros/día, el cual representa el 57.69% de la producción (Alcaldía de Guachucal, 2013).

El consumo de leche en el departamento de Nariño según SAGAN en 2014 es de 70 litros de leche al año, siendo la mitad del total nacional reportado por FEDEGAN en 2013.

2.2 MASTITIS

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria y de sus tejidos secretores, reduce la producción de leche, alterando su composición y sabor, además eleva la carga bacteriana normal (Gasque, 2008). Se produce por diferentes causas:

infección microbiana intramamaria (bacteria patógena), lesiones en la glándula (herida), y con menor frecuencia por alergia y neoplasias (Pastor-Guisar y Bedolla-Cedeño, 2008).

Es una enfermedad altamente prevalente en el ganado bovino productor de leche, que ocasiona pérdidas económicas importantes a todos los productores y la industria lechera mundial, porque disminuye el rendimiento de la leche, aumenta el número de tratamientos clínicos e incrementa el desecho temprano de vacas en etapa productiva (Persson *et al.* 2011; Olde Riekerink *et al.* 2008). Por lo que se ha reconocido como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros (Ruíz *et al.* 2011). El cuadro clínico que presenta la enfermedad varía desde casos imperceptibles, donde se necesita de pruebas diagnósticas para su detección (mastitis subclínica), hasta inflamaciones agudas con toxemia y muerte del animal (mastitis clínica) (Castillo *et al.* 2009).

La forma de evitar el contagio y propagación de la enfermedad está relacionada con la calidad del ordeño y el control periódico, que pueden ser factores determinantes en la rentabilidad del sistema productivo. Sin embargo, la mastitis sigue siendo, económicamente, uno de los problemas más importantes hoy en día. Además la infección se puede diseminar en la leche y afectar el producto crudo obtenido (Halasa *et al.* 2007). Los microorganismos pueden contaminar la leche cruda a través de: 1) infecciones de la ubre o conducto del pezón, 2) exterior de la ubre y ambiente, 3) manejo de la leche y equipo de almacenamiento. Estos factores se potencializan dependiendo de otras características como la edad, la etapa de lactancia, la estación del año, variaciones en la temperatura ambiental y cambios en las condiciones climáticas diarias (Fernández *et al.* 2009).

La mastitis subclínica es importante dado que su imperceptibilidad hace más difícil su identificación en los hatos lecheros, lo cual permite que la enfermedad permanezca durante tiempos prolongados en el hato, aumentando el riesgo de

diseminación en el medio, ya sea a través del personal encargado del ordeño o los utensilios e instrumentos que se encuentran en contacto con la ubre de animales infectados (Castillo *et al.* 2009). De esta manera los efectos en la producción no se evidencian de forma inmediata sino que se manifiestan cuando el nivel de infección en el hato ya se encuentra en un nivel crítico (Li *et al.* 2009).

2.2.1 Etiología

Se han reportado más de 100 microorganismos causantes de infección intramamaria. La mayoría de las infecciones, incluidas las de importancia económica, son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas. Las últimas son esencialmente coliformes (Bedolla y Ponce de León, 2008). Estos microorganismos se han dividido en patógenos contagiosos y ambientales teniendo en cuenta su asociación epidemiológica y proclividad a causar infecciones oportunistas, persistentes o transeúntes (Pinzón-Trujillo *et al.* 2009). Dependiendo asimismo, de su reservorio primario y el ambiente en el cuarto de la glándula mamaria infectada (Bradley y Green, 2001).

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* (Ruíz *et al.* 2011; Trujillo *et al.* 2011). Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, a través del contacto con animales o cuartos de ubre infectados (Anaya-López *et al.* 2006; Relova-Vento *et al.* 2008), y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso del ordeño (Zecconi *et al.* 2006; Calvinho y Tirante, 2005; Tambekar y Buhutada, 2009).

Los patógenos contagiosos de la mastitis como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son infecciosos a nivel individual y a nivel de población, se han controlado en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo

que utilizan la desinfección de los pezones después del ordeño, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias (Contreras *et al.* 2007; Akabanda *et al.* 2013; Asaf *et al.* 2014).

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos, son transmitidos entre los ordeños por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), Gram-positivos (*Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus spp.*) (Denamiel *et al.* 2013; Sunagar *et al.* 2013).

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis, ya que son más difíciles de controlar por su circulación ambiental (Charaya *et al.* 2014; Gómez-Quispe *et al.* 2015).

2.2.2 Principales microorganismos implicados en mastitis

2.2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos que miden entre 0.5 y 1.5 micras de diámetro y que en ocasiones se pueden agrupar en racimos irregulares, en parejas, tetradas o cadenas cortas. El nombre actual se debe a Ogston, que deriva del griego staphylé que significa racimo de uvas. Son microorganismos no móviles, no formadores de esporas y generalmente sin cápsula con reacción catalasa negativa (Hal *et al.* 2012). Esta especie es el principal agente patógeno productor de mastitis en muchos países, representando el 80% de las infecciones

intramamarias (Morosini *et al.* 2011). Su tratamiento se realiza mediante antibióticos por lo cual ha llevado a la aparición de cepas resistentes a este tipo de productos (Quiroz-Enríquez *et al.* 2013).

2.2.2.2 *Streptococcus agalactiae*

También se lo denomina estreptococo β -hemolítico del grupo B (EGB), es un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. El EGB puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas. El EGB presenta antígeno polisacárido común que le caracteriza como perteneciente al grupo B de Lancefield, antígenos polisacáridos específicos y antígenos proteicos, que permiten su clasificación en serotipos (Person *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2010).

2.1.2.4 *Staphylococcus epidermidis*

Los estafilococos se caracterizan por ser cocos Gram positivos, catalasa positivos y el diamino ácido en el peptidoglicano es la L-lisina. En relación con la estructura, a nivel de la pared celular, a diferencia de *S. aureus*, los puentes de pentaglicina del peptidoglicano no están presentes y se sustituyen algunas moléculas de glicina por L-serina (Contreras *et al.* 2007).

En cuanto a características microbiológicas se pueden destacar como cocos Gram (+), de aproximadamente 1 μm de diámetro, que se agrupan en racimos, sus colonias son circulares, prominentes, brillantes, 1-2 mm, pigmentos (blanco-amarillo dorado), son inmóviles, no son esporulados y no tienen cápsula, salvo excepciones. Sus características fisiológicas se destacan por anaerobiosis

facultativa, gran resistencia, soporta condiciones ambientales más adversas que los estreptococos y el neumococo y no son exigentes para su desarrollo (Lüthje y Schwarz, 2006)

2.2.2.4 *Escherichia coli*

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* y está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales (Roesch *et al.* 2007; Gutiérrez-Ramírez y Acosta-Otálvaro, 2008).

2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) comprenden un número elevado de bacterias Gram-positivas cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos (Cueto-Vigil *et al.* 2010; Adebayo-Tayo y Onilude 2008). El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen cocos de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Este grupo de bacterias probablemente sea el más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas (Ramírez-Ramírez *et al.* 2011; Victoria-León *et al.* 2006).

Las BAL se clasifican teniendo en cuenta diversos criterios entre los que se encuentran su morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido y su habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sal (Vallejo *et al.* 2009). De acuerdo con el modo de fermentación se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas; las primeras se caracterizan por tener la enzima aldolasa y producir ácido láctico como producto final de la fermentación, las segundas convierten hexosas o pentosas en diferentes productos como ácido láctico, acetato, etanol y CO² (Manzanares *et al.* 2006).

La importancia de las BAL radica en su capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, permitiendo la conservación de los productos que contiene la bacteria (Reis *et al.* 2012). Las BAL disponen de varios mecanismos que controlan el crecimiento de otras bacterias entre los que se encuentran la reducción del pH a causa de la acumulación de ácidos orgánicos, la producción de bacteriocinas que evitan el crecimiento microbial, la producción de sustancias antagonistas como diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído y compuestos no proteicos de bajo peso molecular, y buena adhesión a la mucosa intestinal que le permiten competir por espacio con otros microorganismos (Alfaro-Sanabria, 2007; Vásquez *et al.*, 2009). Las BAL se caracterizan por ser ácido tolerantes, con crecimientos por debajo de los 3.2 de pH, sin embargo la mayoría crece entre valores de 4 y 4.5, esto les ha permitido sobrevivir en medios donde otras bacterias no resistirían (Ramírez-Ramírez *et al.* 2011).

Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes (Nath-Mohanty *et al.* 2015).

2.1.2 Los probióticos como alternativa al uso de antibióticos

Durante el siglo XX la guerra en contra de las enfermedades producidas por agentes bacterianos encontró un aliado fuerte en los productos antibióticos. Según Cancho *et al.*(2000)son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que reducen el crecimiento de otros microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos; este tipo de sustancias actualmente son usadas como terapéuticos y/o profilácticos o como promotores de crecimiento, aunque este último ya se encuentra prohibido por la mayoría de naciones. Sin embargo, Ortiz (2010) señala que: “En los últimos tiempos se ha planteado un duro debate, para que se disminuya el uso de antibióticos y promotores del crecimiento en la producción animal, debido a que el uso continuo de dosis sub-terapéuticas de antibióticos promotores del crecimiento, puede estar asociado al desarrollo de microorganismos resistentes a estas drogas”.

Las bacterias, por su capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos (Ahmad y Ahmad *et al.* 2015). Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias, que realiza modificación en el punto donde actúa el antibiótico (Rafik *et al.* 2015). A parte de la anterior, la resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico ya que se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (Rotem *et al.* 2012). Esta resistencia puede ser transmisible de una bacteria a otra. Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción (Buodobichet *et al.* 2008).

2.1.3 *Lactobacillus lactis*

Lactobacillus lactis es una bacteria ácido láctica que posee el estatus de (GRAS) generalmente reconocida como segura. Es usualmente utilizada en lechería y en la industria de alimentos fermentados desde hace muchas décadas (Norren *et al.*, 2011; Dal Bello *et al.* 2012). Generalmente se encuentra en la leche y productos lácteos (Rajaram *et al.*, 2010; Campos *et al.* 2006). Se caracteriza por producir nisina, la cual tiene efecto antimicrobiano. Su aislamiento permitirá utilizarlo en la conservación de alimentos que tienen compromiso con bacterias patógenas responsables de las ETA (Zarate, 2011; Ramírez-Peinado, 2013).

2.3.3 *Lactobacillus casei*

Es una bacteria ácido láctica que se encuentran de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, así como en el intestino, la boca del ser humano y el ambiente (Punochei *et al.*, 2014). El nombre de *L. casei* se usó por primera vez en 1919 y se relaciona con queso: casei y caseína (proteína de la leche), proviene de la palabra caseus que significa queso (Roldán *et al.* 2011). El mismo autor menciona que son bacterias Gram positivas con forma de bastón que pueden fermentar una mayor variedad de carbohidratos en comparación con la mayoría de *Lactobacillus* encontrados en las leches fermentadas.

El grupo *Lactobacillus casei* consta de diversas especies de bacterias mesofílicas ácido lácticas, anaerobias facultativas y homo o heterofermentativas. Su metabolismo proporciona cualidades organolépticas a diversas leches fermentadas, quesos y más recientemente a las nuevas leches fermentadas (Cabello-Aceves 2007). Su habilidad para sobrevivir en cantidades adecuadas al tránsito a lo largo del tracto intestinal, además de tener un efecto fisiológico asociado con sus beneficios potenciales sobre la salud, hacen del *Lactobacillus*

casei un buen probiótico (Gaones *al.*, citado por Rúaless y Vallejo, 2007; Suet *al.*, 2010).

2.4 BACTERIOCINAS O BIOCINAS

Durante su evolución, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación que les permiten tener éxito en la competencia por nutrientes y espacio en su hábitat. Estos mecanismos incluyen desde el mejoramiento de los sistemas de quimio taxis hasta la adquisición de sistemas de defensa como la producción de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (De Busto y Leroy, 2007; Batdorj *et al.* 2006). Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos y se ha observado que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariotas (López *et al.*, 2008; Beristain-Bauza *et al.* 2012).

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina (Sankar *et al.* 2012). La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vásquez *et al.*, 2009). Son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas (Parada *et al.* 2007). Estas moléculas han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos (Sousa *et al.* 2007).

2.4.1 Espectro antimicrobiano de las biocinas

Estos péptidos antimicrobianos tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y bacterias causantes del deterioro de los alimentos (Amórtegui-Díaz, 2012). El espectro de actividad de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas se limita a bacterias Gram positivas y no se conoce la inhibición de microorganismos Gram negativos (Castro *et al.* 2009). Sin embargo, el uso de agentes químicos como ácidos orgánicos, EDTA y otros agentes quelantes o condiciones ambientales adversas como nivel de pH, congelamiento o presión hidrostática que ocasionen daños a la estructura celular, pueden sensibilizar a microorganismos Gram negativos tales como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas* (Moyes *et al.* 2014). La susceptibilidad de las bacterias gram negativas a las bacteriocinas es entonces mucho más limitada. Para obtener actividad frente a bacterias Gram negativas se requiere una mayor purificación de la bacteriocina (Petzl *et al.* 2008). Dentro del grupo de bacterias Gram positivas sensibles a las bacteriocinas se incluye varios patógenos de origen alimentario como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Guzmán *et al.* 2009).

Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Neha *et al.* 2012). Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales (Cáceres y Gotteland, 2010). y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente ha surgido un interés sobre su aprovechamiento en la producción de organismos acuáticos (Cajarville *et al.* 2011).

La acción de las bacteriocinas está determinada por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente, se considera también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria (Menad *et al.* 2014).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana, por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva, localizada en uno de sus extremos; después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica (Parcenar *et al.* 2011). De este modo, se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Muy probablemente debido a vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula) (Contreras *et al.* 2007).

El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: a) bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas; y c) bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-Positivas (Sanabria *et al.* 2008).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 LOCALIZACIÓN ZONA DE ESTUDIO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de microbiología del Grupo de Investigación FISE-PROBIOTEC, adscrito al departamento de Producción y Procesamiento Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño, el cual se encuentra ubicado en el municipio de Pasto, departamento de Nariño, con una temperatura promedio de 14°C, a una altura de 2540 msnm, precipitación anual promedio de 1084 mm y humedad relativa del 76% (IDEAM 2014).

3.2 CEPAS

Se usaron cepas lácticas *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 y *Lactobacillus casei* ATCC 11456 para la evaluación probiótica; se obtuvieron cepas patógenas comerciales de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 y *Escherichia coli* ATCC 25922y se aisló las mismas cepas patógenas en la región de Pasto (Nariño).

3.2.1 Reconstitución, siembra y cultivos de bacterias lácticas y patógenas comerciales.

La reconstitución se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Microbiologics® 2008) y medio específico para cada bacteria (anexo A).

Las bacterias lácticas fueron conservadas mediante repique cada 5 días en cajas de petri con agar MRS (medio sólido) y cada 8 días en tubos con caldo MRS (medio líquido). Para todas las cepas patógenas se usó como medio líquido caldo

BHI, sin embargo, para su conservación en medio sólido se necesitó agar manitol para ambos *Staphylococcus*, agar base sangre para *Streptococcus* y agar McConkey para *Escherichia coli*. Todos los preservados fueron incubados a 37°C y 24 horas, y llevados a refrigeración (4°C) hasta su utilización.

Los inóculos de las bacterias lácticas se obtuvieron en un Erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS estéril y se depositaron en una alícuota de la bacteria conservada; enseguida se incubaron por un periodo de 24 horas a 35°C, al terminar el periodo de incubación, se tomaron 4 ml del incubado y se depositaron en otros 40 ml de caldo MRS comercial y se colocaron a incubación en las condiciones mencionadas anteriormente. Para ajustar el inóculo se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Crueger y Crueger (1993). El porcentaje de inóculo debe ser ajustado a 10% V/V para iniciar la fermentación. Para ello, se prepararon 90 ml de caldo MRS estéril, se añadió 10 ml de inóculo probiótico con la aplicación de la regla. Después de este tiempo, se estimó el número de bacterias por ml de caldo MRS, se tomó 1 ml y se realizó lectura directa en el espectrofotómetro a 625 nm, cuando se encontró una población superior a la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta la propuesta de Guerrero (1999) mostrada en Jurado-Gómez 2014.

Es el valor de X_1

$$M_1 \text{-----} M_2$$

$$M_2 \text{-----} X_1$$

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Es entonces V_2 ;

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2

$$V_1 \text{-----} V_2$$

$$V_3 \text{-----} X_2$$

$$X_2 = \frac{V_3 * V_2}{V_1}$$

El valor de X_2 es la cantidad que debe ser añadida a 100 ml para ajustar la población de 1.50×10^8 UFC/ml.

M_1 = Población o densidad de las células que se deben ajustar.

M_2 = 0.125 densidad óptica equivalente al estándar de Mac Farland $1.50 \cdot 10^8$ UFC/ml. Densidad utilizada para la primera fermentación.

V_1 = 1 ml del volumen total de inóculo (10/90).

X_1 = la cantidad que contiene M_2 .

V_2 = lo que se añadió a 1 ml para ajustar a 1.50×10^8 UFC/ml.

V_3 = 100 cantidad total ml de inóculo.

X_2 = cantidad de caldo MRS estéril comercial que se añade a V_3 para la población con el fin de ajustar el valor de M_2 .

3.2.2 Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas provenientes de vacas con mastitis subclínica

La toma de muestras se realizó de la siguiente manera:

- En el momento del ordeño se realizó la prueba de CMT (California Mastitis Test). Los animales que presentaron un grado de mastitis subclínica 1o

2 fueron seleccionados y se tomó una muestra del cuarto más afectado, la muestra fue llevada al laboratorio de la universidad de Nariño para el correspondiente aislamiento y verificación.

- Se tomó las muestras necesarias, que permitieron encontrar y aislar todas las bacterias patógenas para el estudio (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*) (Bouman, 2012).

3.3 EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LAS BACTERIAS EVALUADAS.

Se efectuó prueba de sensibilidad a los antibióticos sobre las bacterias (patógenas y láctica) con la técnica de Kirby Bauer (1966). Los antibióticos evaluados fueron: Gentamicina CN 10 µg, Penicilina P 10 IU, Ciprofloxacina CIP 5 µg, Dicloxacilina DCX 1 µg, Cefepime FEP 30 µg, Cefalotina KF 30 µg, Trimetropin Sulfa 25 µg y Ampicilina AM 10 µg. Se tomó una muestra de las cepas y se transfirieron a un tubo con 1 ml de agua destilada (1 tubo por cepa), se incubó a 35°C hasta obtener la turbidez ópticamente comparable del estándar de 0.5 MacFarland, una densidad óptica de 0.125 equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml, luego de ajustado los inóculos, los microorganismo fueron transferidos en cajas de Petri con agar Müeller Hilton, sobre el medio se colocó los discos de antibiótico con el uso de una pinza estéril, usando una caja por antibiótico evaluado; las cajas fueron incubadas por 18 horas a 35°C para posteriormente medir el diámetro de halo producido alrededor de los discos.

3.4 EFECTO DE INHIBICIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SUS SOBRENADANTES SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS.

La prueba de inhibición *in vitro* se llevó a cabo mediante una adaptación del método de Tagg y McGiven (1971), agar de discos con *L. casei* y *L. lactis*. Los discos se impregnaron en cantidades de 25, 50 y 100 μ l de la bacteria láctica y se colocaron en cajas de Petri con agar Mueller Hinton previamente cultivadas con las bacterias patógenas; las cajas de petri se incubaron a 32°C durante 18 h, después de este tiempo, se realizó la lectura de los halos formados, teniendo en cuenta la distancia desde el borde del disco de agar con la bacteria láctica hasta el final del halo de inhibición de las bacterias patógenas. El tamaño crítico de halo para determinar si hay inhibición se consideró igual o superior a 2 mm (Estrada *et al.* 2005).

Para el ensayo de inhibición en sobrenadante, se sembró cada una de las bacterias lácticas de acuerdo con Crueger y Crueger (1993) y se ajustaron a patrón 1 en la escala de Mac Farland (concentración 3.0×10^8), enseguida se tomó 1.5 ml de muestra de cada bacteria láctica a 4°C y se centrifugó a 1000 rpm por 15 min y el sobrenadante obtenido se filtró en membrana de 0.20 micras. La evaluación se realizó mediante dos métodos de difusión: discos y cilindros de plástico. Para el primero se tomaron discos de papel de filtro pre-esterilizado (15 min a 121°C y 15 PSI), de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 50, 75 y 100 μ l del sobrenadante con la ayuda de una micro pipeta en cámara de flujo laminar tipo II, enseguida se colocaron en la superficie de agar Müeller Hilton previamente inoculado con las bacterias patógenas (en forma separada) y se incubaron a 35°C por 18 h. En el método con cilindros se utilizó puntas de pipetas estériles cortadas a partir de 8 mm de diámetro, estas fueron colocados en cajas de Petri con agar Müeller Hilton, que previamente fue inoculado con las bacterias patógenas, dentro se deposito las mismas cantidades usadas en el método del disco y se incubaron en las mismas condiciones. La inhibición se determinó por el

halo producido alrededor del disco y el cilindro; se midió la distancia de los discos finales y el borde de halo, se tuvo en cuenta un halo de 2mm como indicio de susceptibilidad (Estrada *et al.*, 2005).

3.5 PRUEBAS DE SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL

3.5.1 Bilis bovina y Sales biliares. Se evaluó el crecimiento de *L. casei* y *L. lactis* a concentraciones de 0.5, 1 y 2% de sales biliares bovinas y concentraciones de 1 y 1.2% de bilis bovina. Primero se cultivaron las bacterias en caldo MRS por 24 horas; de este cultivo se tomaron muestras y se depositaron en tubos con MRS y las diferentes concentraciones a evaluar, enseguida se tomó muestras para cultivar en agar MRS con azul de anilina y se cultivaron a 32°C por 48 horas, al final se realizó recuento de bacterias de cada muestra, se tuvo en cuenta valores iguales o superiores a 10^9 UFC/ml como conteos viables de la bacteria (Cai *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1998).

3.5.2 Prueba de catalasa y gas. Se determinó actividad de catalasa y producción de gas utilizando las metodologías de Dahlet *al.*, (1989) y Cai *et al.*, (1999), respectivamente.

3.5.1 Prueba de pH. Se determinó si la cepa láctica es viable a diferentes niveles de pH, para ello se midió el crecimiento a pH 2.5, 4.5 y 7; se evaluó por un periodo de 3 horas, con toma de información cada hora. Para ello, se usó medio MRS comercial y el pH fue ajustado con ácido tartárico, las condiciones de incubación fueron de 32°C y 48 horas.

3.5.4 Prueba de temperatura. Se determinó la viabilidad de *L. casei* y *L. lactis* a dos temperaturas (38 y 45°C), el tiempo de evaluación se llevó hasta la fase exponencial encontrada en la cinética de fermentación en el medio MRS (16 h 48 min). Se usó el procedimiento descrito por Crueger y Crueger (1993), ajustando el inóculo a 0.125 en escala de McFarland y se incubó hasta las 16 h

48 min, luego se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-12} con agua peptonada y se sembró en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución 10^{-8} hasta 10^{-12} a 37°C y 48 horas, determinando el recuento de UFC/ml.

3.5.5 Cinética de crecimiento de las cepas lácticas. Se usó dos medios de cultivo para evaluar los parámetros cinéticos de *L. casei* y *L. lactis*: el primer medio fue MRS comercial y el segundo Pro; este último fue propuesto por Brizuela (2005) y está compuesto por 10 g/l de azúcar blanco, 8 g/l de extracto de carne y 4 g/l de extracto de levadura (Jurado-Gómez 2010).

Para la cinética de crecimiento se tomó un Erlenmeyer por cada medio, se adicionó 60 ml de inóculo de la bacteria láctica y 540 ml de medio, se llevaron a incubación en incubadora shaker con agitación constante a 32°C y 100 rpm, no se controló el pH debido a las características de la cepa, que resiste niveles bajos. Se evaluó la cepa durante 24 horas, realizando mediciones cada 2 h 24 min. En cada medición se determinó conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), pH, azúcar total, acidez y proteína.

El conteo de microorganismos viables en placa se determinó mediante la disolución de 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0.1%, se realizó diluciones decimales que fueron transferidas a cajas de Petri, que contenían medio MRS con azul de anilina (0.1 ml) para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 32°C y se observaron entre 24 y 48 horas. Se tuvo en cuenta únicamente las cajas de Petri con conteos entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener UFC/ml (Lanara, 1981).

Para determinar el pH se tomó una muestra del medio y se midió con pHmetro digital (JENCO® VisionPlus).

El método de Dubois (1956) fue usado para determinar el azúcar total, se prepararon diferentes concentraciones de glucosa para crear una curva patrón mediante los valores obtenidos de las muestras observadas a una densidad óptica de 625 nm. Los valores se graficaron contra la concentración en mg/l, finalmente se obtuvo los valores de la línea recta (Anexo B).

La acidez fue determinado mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) (Negri, 2005). La biomasa se determinó por los métodos de Crueger y Crueger (1993) y Rodríguez *et al.*, 2003, para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

$$v_{\max} = \frac{dLnX}{dt}$$

y el tiempo de duplicación celular (t_d), se estableció teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{Ln2}{v_{\max}}$$

La proteína se determinó con el método de Lowry y Col (1951), con modificación de Malara y Charra (1972), se obtuvo una curva patrón a partir de seroalbúmina bovina, luego se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm. La concentración fue graficada contra los valores para obtener la ecuación de la línea recta.

3.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN EL SOBRENADANTE.

3.6.1 Péptidos por HPLC. Se tomó una muestra de sobrenadante de *L. casei* y otra de *L. lactis* y se determinó el contenido de péptidos de cada uno, mediante espectrofotometría de alta densidad (HPLC), se usó una alícuota de 25 ml de sobrenadante, la cual fue centrifugada a 18000 rpm, por 30 minutos y 4 °C; luego se filtro 2 ml en jeringa de filtrar (0.25 micras) y finalmente fue llevado a lectura en el espectrofotómetro a 650 nm y se obtuvo los resultados.

3.6.2 Ácidos orgánicos por HPLC. Para determinar la producción de ácidos orgánicos se tomó caldo de crecimiento y se centrifugó a 8500 rpm, enseguida se filtró en membrana de 0.25 µm y se determinó la producción mediante HPLC de la siguiente manera, solvente de fase móvil, ácido sulfúrico a pH 1.5; presión 800-900 PSI; volumen inyectado: 20 L; temperatura del horno: 65°C; columna BIORAD aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H+ (copolímero de estireno y bisulfato dedivinilbenzeno), (Brizuela, 2003).

3.7 HIPÓTESIS

3.7.1 Hipótesis Nula

Las BAL (*Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei*) no ejercerán efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, como principales microorganismos causantes de mastitis subclínica en vacas Holstein.

3.7.2 Hipótesis Alternativa

Las BAL (*Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei*) ejercerán efecto inhibitorio sobre al menos una de las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, como principales microorganismos causantes de mastitis subclínica en vacas Holstein.

3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar la evaluación estadística se usó el paquete SAS 9.1 (2004). El análisis de la cinética de fermentación de los medios MRS y PRO se realizó a través de un diseño de medidas repetidas en el tiempo, con el uso del procedimiento PROC MIXED, con el siguiente modelo matemático.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_k + (A*B)_{ik} + \varepsilon_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

y_{ijk} : observación ijk

μ : media general

A_i : efecto de tratamiento

B_k : efecto del tiempo

$(A*B)_{ik}$: efecto de interacción entre los tratamientos i y el tiempo k

ε_{ij} : error aleatorio y covarianza entre medidas repetidas

ε_{ijk} : error aleatorio

Se determinó la correlación entre los métodos del sobrenadante con el procedimiento PROC CORR y se estableció ecuaciones de regresión lineal simple de las variables pH, ácido láctico, consumo de proteína y consumo de azúcar como variables independientes y el crecimiento (LN UFC/ml) como variable independiente en el medio MRS, teniendo en cuenta únicamente los datos de

crecimiento desde el inicio hasta la fase exponencial con el procedimiento PROC REG. El modelo matemático de la regresión fue el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + e$$

donde:

y: variable a evaluar

β_0 : Intercepto.

$\beta_1 x$: Pendiente.

e: error.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO DE CEPAS

Se logró identificar las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en las muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y aislarlas para su posterior uso (Figura 1).

Figura 1. Fotografía microscópica de las bacterias lácticas y las bacterias patógenas.

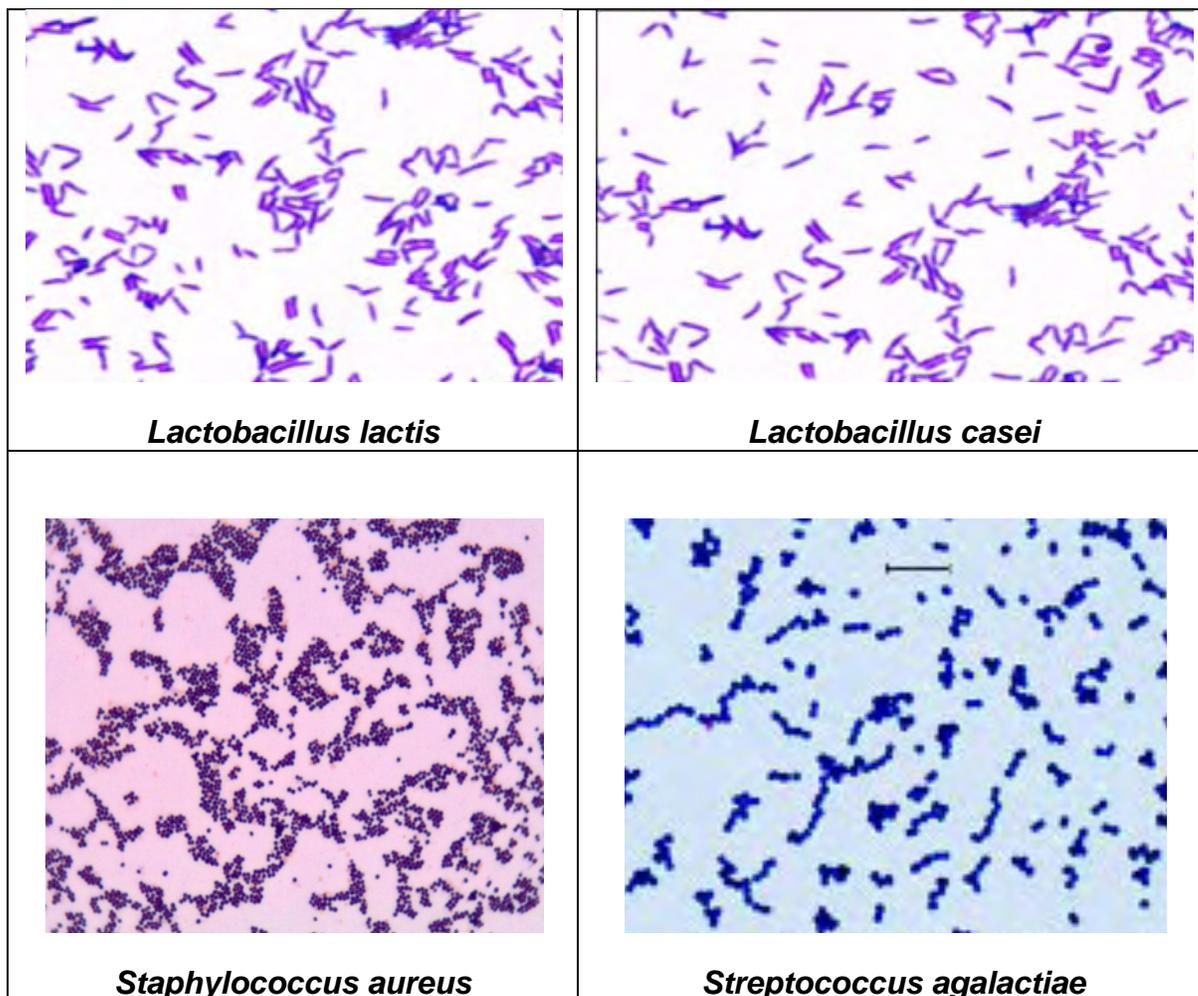
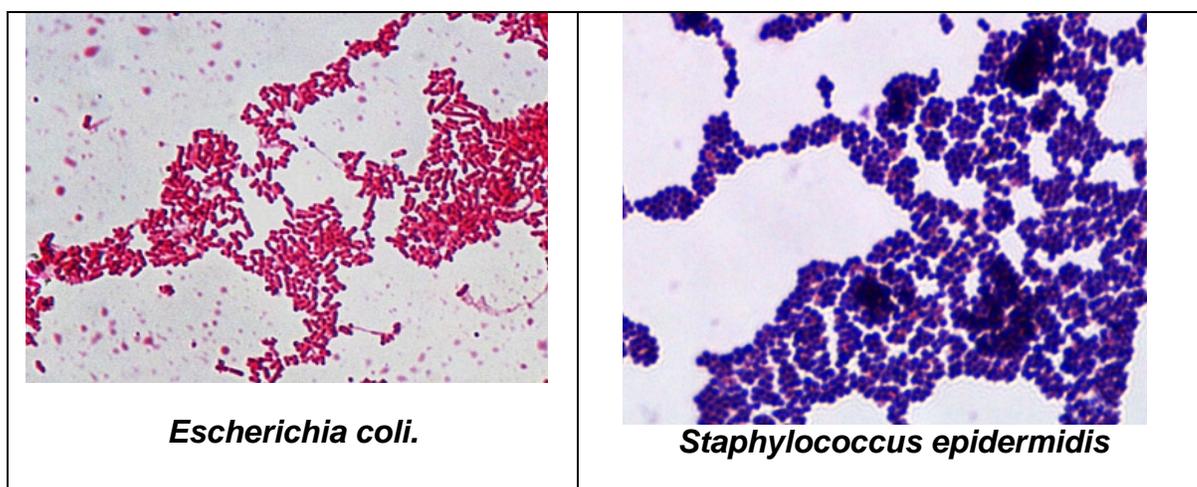


Figura. 1. Continuación



4.2 ANTIBIOGRAMA

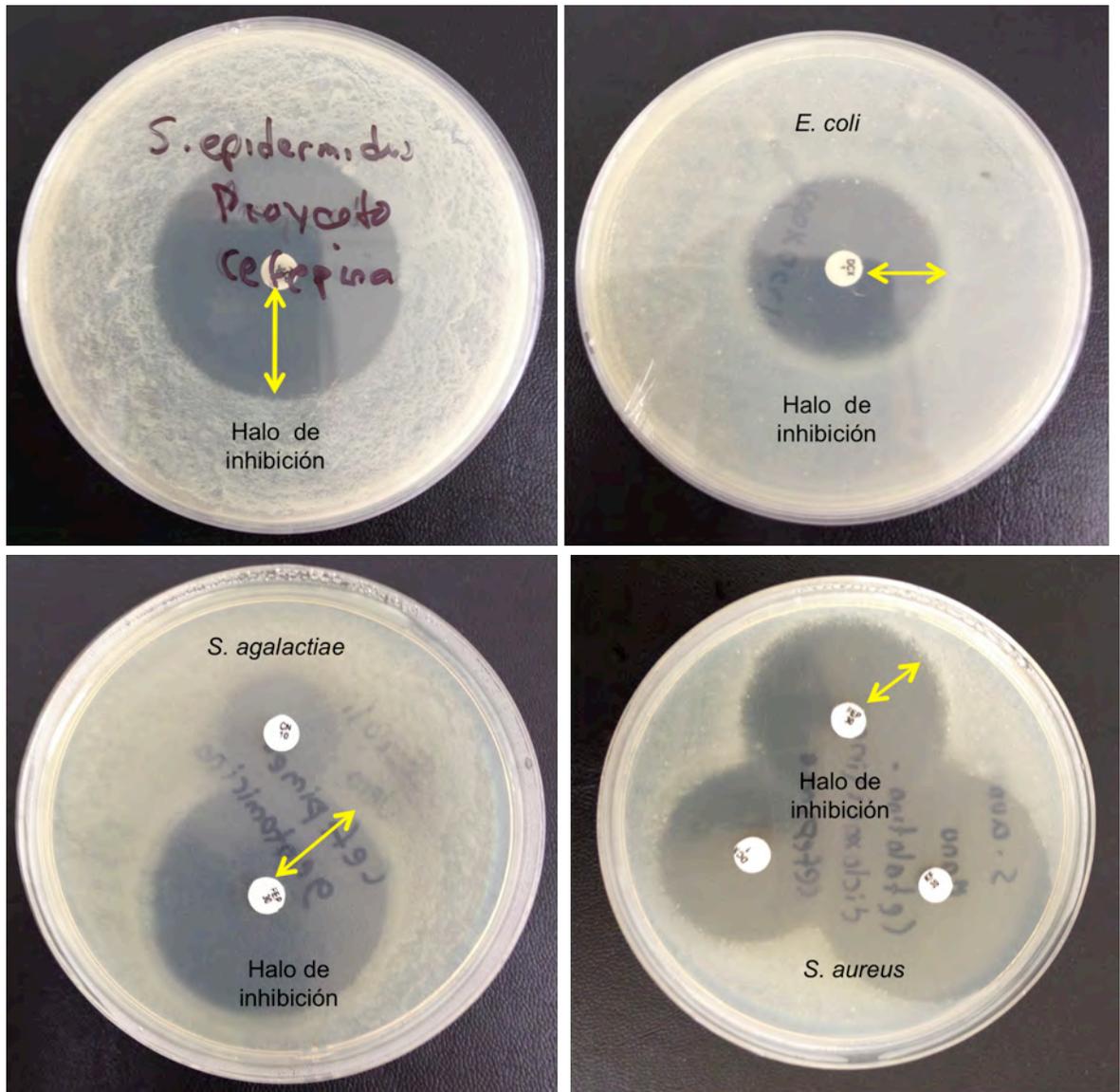
Los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antibióticos se puede observar en la tabla 1 y figura 2.

Tabla 1. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos.

	DCX	FEP	KF	CIP	CN	P	Trim-Sulf	AM
Cepas de referencia								
<i>L. casei</i>	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>L. lactis</i>	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	-	-	R	S	S
<i>S. agalactiae</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>E. coli</i>	-	S	S	S	S	-	S	-
Cepas Aisladas								
<i>Staph. aureus</i>	R	R	R	-	-	R	-	-
<i>Staph. epidermidis</i>	R	R	S	-	-	R	S	S
<i>S. agalactiae</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>E. coli</i>	-	S	S	S	R	-	S	-

R: resistente; S: sensible; DCX: Dicloxacilina; FEP: Cefepima; KF:Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CN: Gentamicina; P: Penicilina; Trim-Sulf: Trimetropim Sulfa; AM: Ampicilina. **CLSI**, Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; **EUCAST**, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2012.

Figura 2. Antibiograma de las cepas.



4.2.1 Cepas patógenas.

Se encontró diferencias entre las cepas patógenas aisladas y referencia (tabla 1). La cepa que mayor discrepancia tuvo fue *S. aureus* aislada, ya que presentó resistencia a todos los antibióticos a los que fue evaluada, mientras que la cepa de

referencia mostró sensibilidad; le sigue *S. epidermidis* que difirió en resistencia a Dicloxacilina y Cefepima en comparación a la cepa de referencia; luego *E. Coli* con diferencia únicamente en resistencia a la Gentamicina; sin embargo, *S. agalactiae* no presentó diferencia entre cepas (aislada y referencia) y fueron sensibles a los antibióticos evaluados.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas aisladas presentan mayor resistencia a los antibióticos evaluados, este efecto puede deberse a un mal manejo de las enfermedades producidas por estos microorganismos a nivel de campo. El departamento de Nariño se caracteriza por tener un bajo grado de adopción de buenas prácticas de ordeño, que minimicen los riesgos de tener mastitis subclínica en los hatos lecheros (Benavidez *et al.* 2010; Solarte-Portilla *et al.* 2006). Junto a lo anterior, el mal manejo de este tipo de infecciones por parte del productor, como la administración de antibióticos de forma indiscriminada, sin tener una evaluación adecuada del agente etiológico, agrava los problemas de resistencia de estas cepas (Tafur *et al.* 2008).

Es interesante observar la información obtenida en la cepa de *S. aureus* aislada, la cual presenta resistencia a los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina y Penicilina, estos resultados están en congruencia con los reportes de otros autores, quienes afirman que *S. aureus* es el microorganismo que presenta el mayor problema a la industria lechera mundial, mostrando pérdidas económicas importantes para el sector (López-Meza *et al.* 2006; Pereyra *et al.* 2014).

La presencia de *S. aureus* está altamente correlacionada con un elevado recuento de células totales, factor que determina la calidad microbiológica de la leche y afecta el pago por calidad (Giannechini *et al.* 2014; Resolución 000017 2012), además el problema se observa con mayor complejidad si se tiene en cuenta que *S. aureus* es el principal agente etiológico de mastitis en humanos (65-90%) y por consiguiente un problema de salud pública que puede afectar a un producto

alimenticio como la leche (Sanabria, Araya y Arbo 2008; Beltrán-Vaquero *et al.* 2015; Moon *et al.* 2007).

El mismo proceso se puede inferir de las cepas de *S. epidermidis*, este microorganismo tiene una capacidad de infección diferente al anterior, ya que es medioambiental y por ello permanece en el medio, los reportes sobre el microorganismo son escasos, sin embargo, se puede observar que es el segundo agente infeccioso después de *S. aureus*, lo cual se confirma en la presente investigación.

La sensibilidad en *S. agalactiae* y *E. coli* demuestra que estos microorganismos tienen baja incidencia en la infección de mastitis subclínica en la zona. Además pueden ser tratados mediante los antibióticos usuales, teniendo en cuenta un correcto uso de los mismos. En investigaciones realizadas por Rodríguez-Martínez (2006) encontró que *S. agalactiae* fue el agente más importante en la producción de mastitis en hatos de la Sabana de Bogotá, resultados diferentes a los encontrados en la presente investigación, sin embargo, los resultados para *E. coli* fueron similares dado que se descartó la posibilidad de encontrar el microorganismo en el análisis.

A pesar que la resistencia es un fenómeno natural de los microorganismos, el proceso puede ser acelerado por diversos factores, entre los que se encuentran un inadecuado uso de los antibióticos en el control de enfermedades como la mastitis y residuos antibióticos en los alimentos (Martínez-Pacheco *et al.*, 2013). Las bacterias evitan el ataque de los antibióticos mediante complejos mecanismos de adaptación, entre los que se encuentran modificación enzimática del antibiótico, bombas de expulsión, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones del sitio de acción, que dificultan el manejo terapéutico de las enfermedades producidas por estos microorganismos (Tafure *et al.*, 2008). La resistencia se ha convertido en un problema para el productor, dado que las cepas

al ser más resistentes a los antibióticos, dificultan el control de enfermedades importantes para el adecuado desarrollo de la industria lechera (Bedolla y Ponce de León, 2008).

4.2.2 Cepas lácticas.

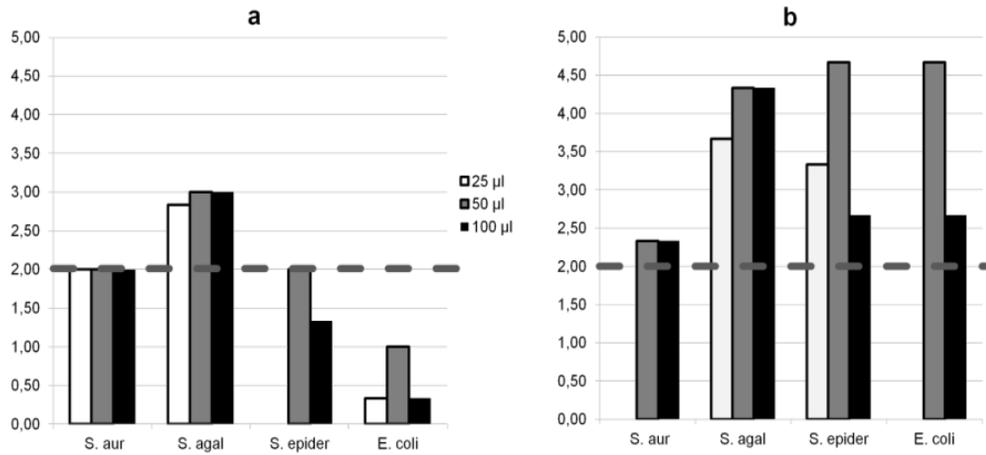
La cepa de *Lactobacillus case* presentó resistencia a seis de los ocho antibióticos evaluados y *Lactobacillus lactis* únicamente a tres, este factor es importante en la evaluación de cepas con características probióticas, debido a que la resistencia puede estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, los plásmidos o los transposones (López-Brea y Domingo, 2007). Las recomendaciones del grupo de trabajo de especialistas convocada por la FAO-OMS en 2002 indican que no se debe administrar este tipo de bacterias por vía oral, debido a la transmisión de genes de resistencia a otros microorganismos; sin embargo, se deber realizar otro tipos de pruebas para determinar que existen realmente estos genes en la cepas probióticas; pruebas que no se efectuaron en la presente investigación.

4.3 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU SOBRENADANTES EN CEPAS PATÓGENAS.

4.3.1 Efecto de inhibición de las bacterias lácticas sobre los microorganismos patógenos.

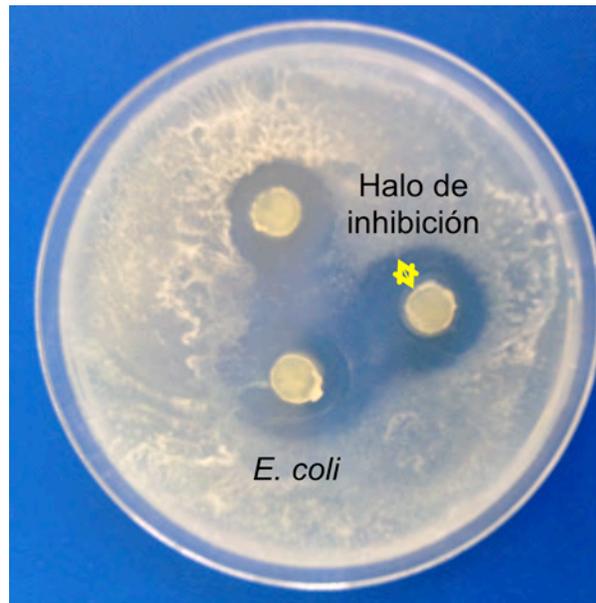
4.3.1.1 Inhibición de *Lactobacillus casei* sobre las bacterias patógenas. En la figura 3 y 4 se puede observar los resultados de la prueba de inhibición de la bacteria láctica sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* y *E. coli*.

Figura 3. Halos de inhibición de *L. casei* sobre las bacterias patógenas expresados en mm.



a: bacterias aisladas; b: bacterias de referencia. S. aur: *S. aureus*; S. agal: *S. agalactiae*; S. epider. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

Figura 4. Halos de inhibición de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* sobre *Escherichia coli*.



Los resultados mostraron que *Lactobacillus casei* inhibió a todas las cepas patógenas de referencia; pero de las cepas aisladas inhibió solo a *S. aureus* y *S. agalactiae* en todas las concentraciones (25, 50 y 100 µl). Además la cepa de *S.*

epidermidis aislada fue susceptible únicamente a una concentración de 50 µl, mientras que *E. Coli* aislada no fue inhibida.

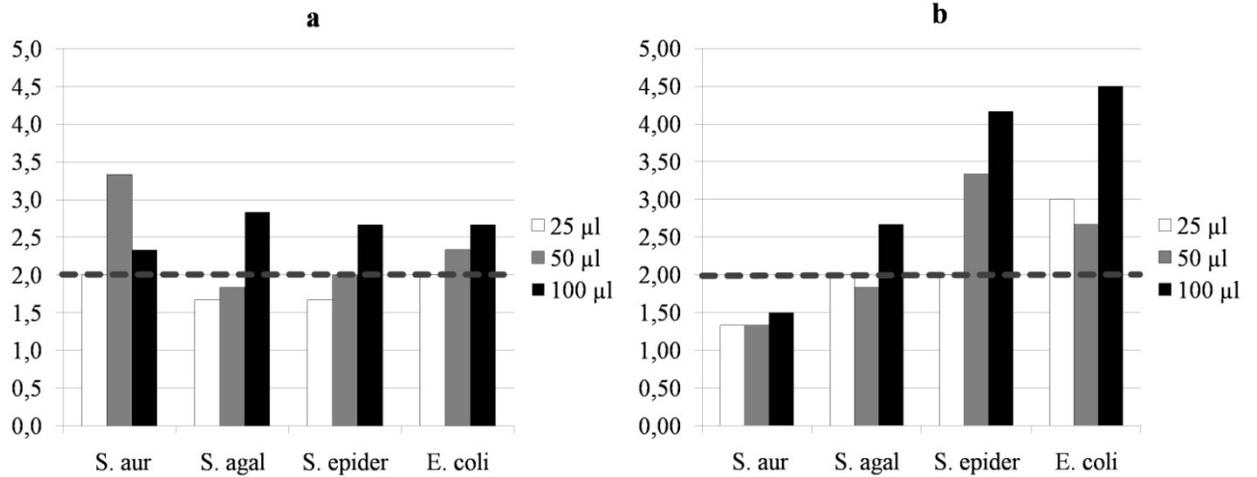
Lo anterior evidencia la resistencia de las bacterias aisladas a la bacteria láctica, de esta manera el control de *S. epidermidis* y *E. coli*, encontradas en la región, no fue efectivo por parte de *L. casei*. Sin embargo, Roldán *et al.* (2011) encontró efecto de inhibición de *L. casei* sobre *E. coli*, resultados diferentes a los hallados en esta investigación. En estudios realizados por Mohankumar y Murugalatha (2011) y Soleimani *et al.* (2010) se encontró que las cepas de lactobacillus fueron efectivas en el control de *S. aureus* y *S. agalactiae*, resultados similares a la presente investigación. La acción inhibitoria de las BAL se debe a diversos factores como la producción de biocina, ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno, reducción del pH y competición de espacio en el tracto gastrointestinal (Beshkova y Frengova, 2012; Mousavi *et al.* 2010; Wakil *et al.* 2014). Estos factores trabajan de varias maneras sobre los microorganismos, generando efectos como la alteración de la permeabilidad celular y el descenso del pH interno con alteración de funciones celulares fundamentales (Ghareeb *et al.* 2012; Madureira *et al.* 2013).

De esta manera se puede observar que *L. casei* puede ser tenida en cuenta en el control de microorganismos causantes de mastitis subclínica, que permita mejorar las condiciones sanitarias de los productores de leche y evite pérdidas económicas importantes para el sistema productivo.

4.3.1.2 Inhibición de *Lactobacillus lactis* sobre las bacterias patógenas.

Los datos encontrados se pueden observar en la figura 5 y 6.

Figura 5. Halos de inhibición en mm de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas.



a: bacterias aisladas; b: bacterias de referencia. S. aur: *S. aureus*; S. agal: *S. agalactiae*; S. epider: *S. epidermidis*. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

Figura 6. Halos de inhibición de *Lactobacillus lactis* sobre *Staphylococcus aureus*.



Se observó efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* sobre las bacterias aisladas de *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. agalactiae* en todas o algunas de las concentraciones. Sin embargo, la cepa de referencia de *S. aureus* fue resistente a

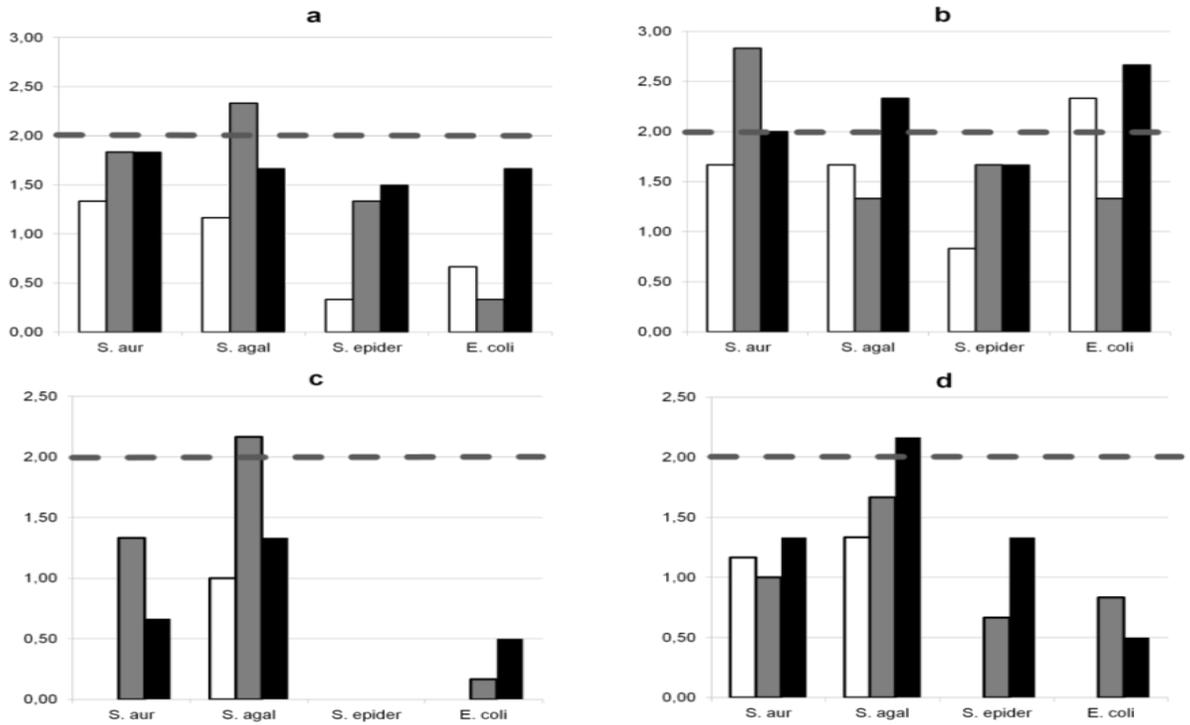
la bacteria láctica. De igual manera, se observa que la susceptibilidad aumenta a medida que la concentración de la bacteria ácido láctica se incrementa. Estudios realizados por Batdort *et al.* (2007) mostraron que *L. lactis* inhibe una gran cantidad de microorganismos patógenos, incluyendo los evaluados en la presente investigación.

La acción de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas se debe entre otras cosas a la producción de la biocina denominada nisina, esta biocina ha sido encontrada en los productos que contienen la cepa láctica y ha sido identificada de forma bioquímica y molecular (Khemariya *et al.* 2013). La biocina destruye la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, de manera que se ocasiona lisis de la bacteria y le ocasiona la muerte (García-Peña, 2012; Agudelo-Londoño, 2013). Al respecto Fernández (2005), menciona que las bacteriocinas producidas por bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos, efecto observado en la presente investigación. Sin embargo, se debe notar que los mayores halos de inhibición se producen sobre las cepas de referencia, por lo cual se infiere que las cepas aisladas presentan un cierto grado de resistencia a la bacteria láctica que pueden afectar los resultados cuando se evalúe en condiciones *in vivo* (Neha *et al.* 2012). Un caso particular se da en la cepa de referencia de *E. coli*, ya que presenta resistencia, a diferencia de la cepa aislada.

4.3.1.3 Efecto de inhibición del sobrenadante de *Lactobacillus casei* sobre las bacterias patógenas. Las figuras 7, 8 y 9 muestran los resultados encontrados en la presente investigación sobre el sobrenadante de *L. casei*.

- Bacterias patógenas aisladas.

Figura 7. Halos de inhibición medidos en mm del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas aisladas.



a: disco con filtro, b: disco sin filtro, c: cilindro con filtro, d: cilindro sin filtro; S. aur: *S. aureus*; S. agal: *S. agalactiae*; S. epider. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

Figura 8. Halos de inhibición de sobrenadante de *Lactobacillus casei*.



a: discos con sobrenadante; b: cilindros con sobrenadante.

La figura 7^a y 7^b muestran susceptibilidad de *S. aureus*, *S. agalactiae* y *E. coli* con el método de disco. Sin embargo, se observa que el sobrenadante sin filtrar fue más efectivo en inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas. Estos resultados posiblemente se deban a la presencia de bacterias de *L. casei* en el sobrenadante, ya que no se filtró. La presencia de la bacteria láctica puede generar un aumento de la producción de biocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos que incrementan la susceptibilidad de las bacterias patógenas (Goraya *et al.* 2013).

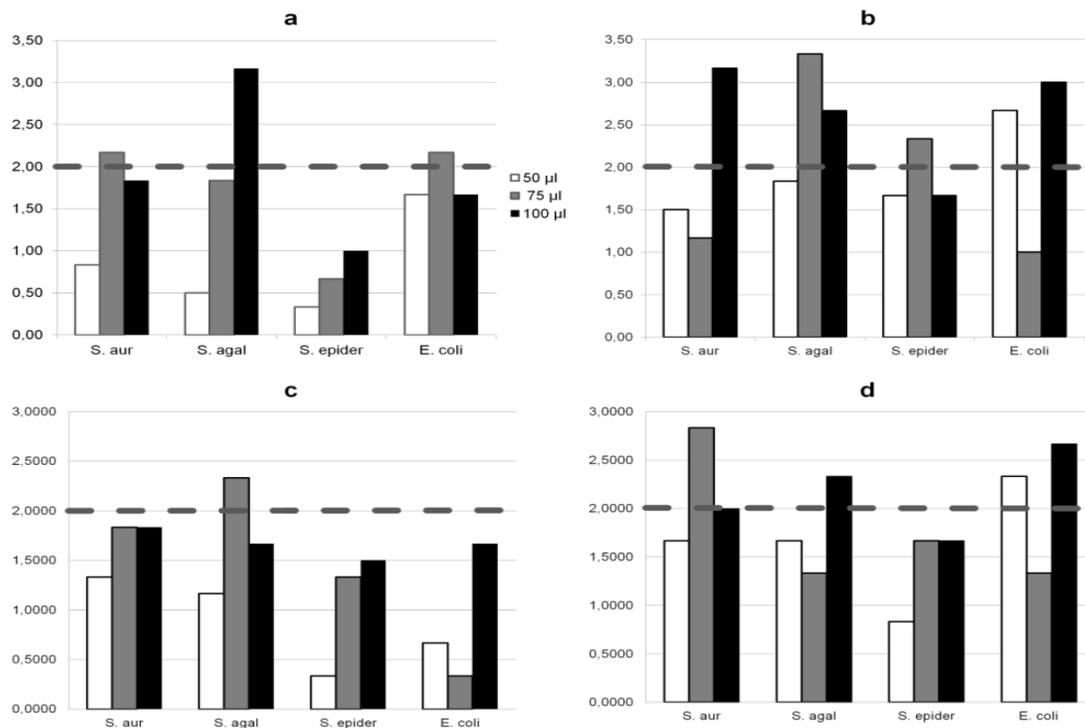
Por otra parte, el sobrenadante filtrado permite identificar el efecto de los compuestos suspendidos en el cultivo de la bacteria láctica, al momento de la obtención del sobrenadante, ya que sin bacterias en este, no habrá un incremento de estas sustancias por la producción de la bacteria. De esta manera, se puede determinar que los compuestos presentes en el sobrenadante no fueron efectivos en el control de *S. aureus* y *E. coli*. En pruebas realizadas por Tatsadjieu *et al.* (2009) se encontró que el sobrenadante posee diferentes compuestos antimicrobianos, estos pueden aumentar o disminuir su actividad dependiendo de factores externos como el pH, la temperatura y la presencia de sales biliares. De la misma manera Sourav y Arijit (2010) encontraron que las biocinas producidas por el género *Lactobacillus* tiene una acción bactericida más alta a un pH de 6, sin embargo, su efecto permanece en un rango de 2 a 10, aunque no en condiciones óptimas. Posiblemente alguno de los factores mencionados anteriormente hizo que el sobrenadante filtrado no presentara un medio adecuado para el efectivo funcionamiento de los compuestos antimicrobianos, ya que la prueba con la cepa láctica demostró inhibición de las bacterias.

Los resultados para la metodología del cilindro se pueden observar en la figura 7^c y 7^d, esta metodología es nueva y fue propuesta por Brizuela (2005), sin embargo, los resultados presentados en esta investigación indican que la metodología necesita mayor investigación para su estandarización debido a que el análisis de correlación con la metodología del disco muestra que no existe correlación entre

ambas metodologías (Corr: 0.1; $p=0.45$). Sin embargo se observó susceptibilidad de *S. agalactiae* filtrado y sin filtrar, los cuales mostraron un comportamiento parecido al disco.

- Bacterias patógenas de referencia.

Figura 9. Inhibición del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas de referencia.



a: sensidisco con filtro, b: sensidisco sin filtro, c: cilindro con filtro, d: cilindro sin filtro; S. aur: *S. aureus*; S. agal: *S. agalactiae*; S. epider. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

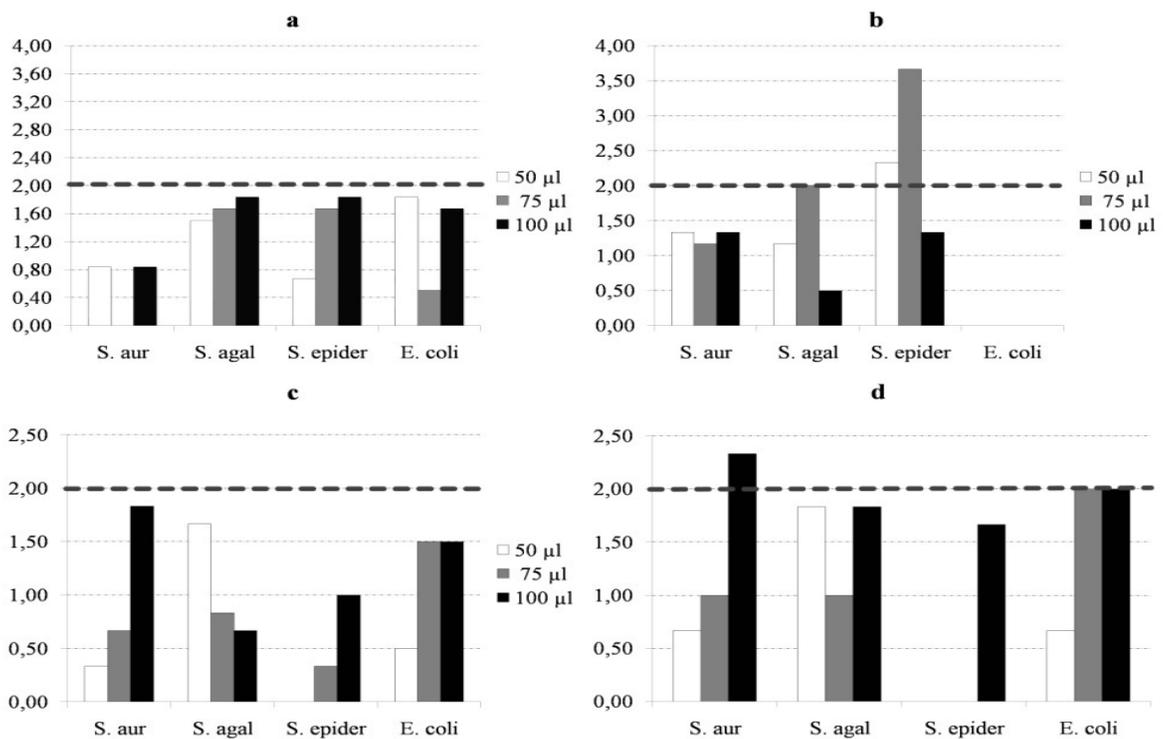
El método de disco (figuras 9^a y 9^b) muestra que todas las bacterias de referencia son susceptibles al sobrenadante de *L. casei*. La comparación entre bacterias

patógenas de referencia y bacterias aisladas muestra que el comportamiento es similar, a pesar de observarse algunas diferencias.

4.3.1.4 Efecto de inhibición del sobrenadante de *Lactobacillus lactis* sobre las bacterias patógenas. Los halos de inhibición producidos por el sobrenadante de la bacteria láctica sobre las bacterias patógenas se pueden observar en la figura 10, 11 y 12.

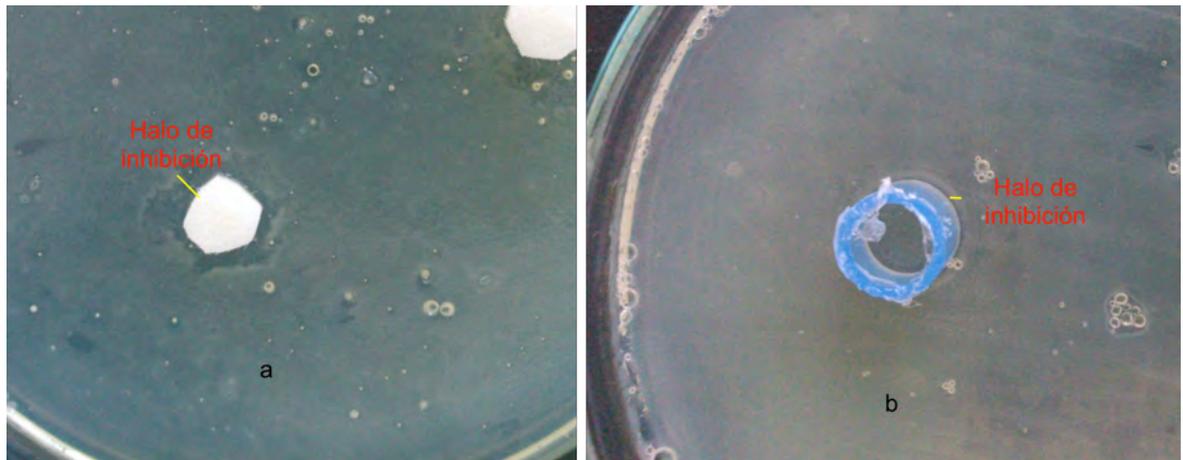
- **Bacterias patógenas aisladas.**

Figura 10. Halos de inhibición del sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas aisladas.



a: sensidisco con filtro, b: sensidisco sin filtro, c: cilindro con filtro, d: cilindro sin filtro; *S. aur*: *S. aureus*; *S. agal*: *S. agalactiae*; *S. epider*. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

Figura 11. Halos de inhibición del sobrenadante de *Lactobacillus lactis*.

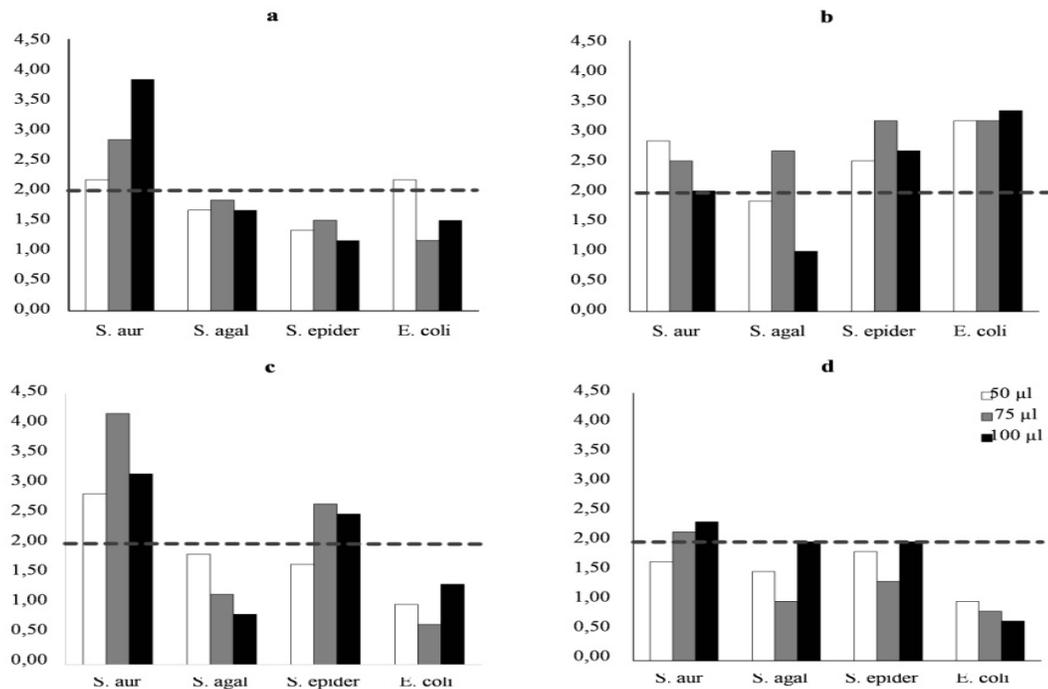


a: disco con sobrenadante; b: cilindro con sobrenadante.

El sobrenadante de *Lactobacillus lactis* filtrado no mostró antagonismo para las bacterias patógenas evaluadas, sin embargo cuando se usó sin filtrar se consiguió inhibir el crecimiento de *S. agalactiae* y *S. epidermidis*, las razones de este comportamiento fueron explicadas cuando se realizó el análisis del sobrenadante de *L. casei*. Sin embargo estudios realizados por Tatsadjieu *et al.* (2009) indicaron que el sobrenadante de las cepas de *L. lactis* muestran antagonismo microbiano sobre *S. entérica* y *E. coli*, resultado diferente a la presente investigación. Estos resultados pueden ser consecuencia de diferencias en los microorganismos evaluados, ya que para esta investigación las bacterias fueron aisladas en la región (Caballero-Cervantes, 2014). Las bacterias se adaptan a las condiciones de su medio, lo cual genera cambios en su forma de resistencia a los huéspedes con los que tienen que convivir, generando alteraciones favorables para su supervivencia (Morosini *et al.* 2011).

- Bacterias patógenas de referencia.

Figura 12. Halos de inhibición del sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas de referencia.



a: sensidisco con filtro, b: sensidisco sin filtro, c: cilindro con filtro, d: cilindro sin filtro; S. aur: *S. aureus*; S. agal: *S. agalactiae*; S. epider. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (2 mm) Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005).

Al realizar la comparación del efecto antagónico del sobrenadante de *L. lactis* entre las cepas patógenas aisladas y de referencia se puede observar discrepancia entre los resultados obtenidos, ya que las segundas presentan una mayor susceptibilidad a la cepa láctica, de esta manera *S. aureus* aislada es totalmente resistente al sobrenadante mientras que su homóloga de referencia no lo es; esta diferencia también se observa en las cepas de *E. coli*, reforzando la

idea de que las cepas de la región poseen resistencia a la bacteria láctica, sin embargo, no se puede argumentar de forma concluyente que estas diferencia se deba a procesos adaptativos de modificación de la estructura genética de las bacterias, debido a que, para ello, se debe realizar su identificación molecular, la cual no se realizó en el presente estudio.

4.4 PRUEBAS GASTROINTESTINALES.

4.4.1 Prueba de Sales biliares y Bilis bovina. Los resultados obtenidos para estas variables se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Crecimiento de las cepas lácticas a diferentes niveles de bilis bovina y sales biliares.

	Concentración	No. de colonias por dilución (UFC/mL)				
		10-jun	10-jul	10-ago	10-sep	10-oct
<i>Lactobacillus casei</i>						
Bilis bovina	1%	1.7 x10 ⁷	1.4 x10 ⁸	0	0	1 x10 ¹⁰
	1.20%	5.1 x10 ⁷	0	0	0	0
Sales biliares	0.50%	2.3 x10 ⁷	2 x10 ⁷	0	0	0
	1%	3.0 x10 ⁸	3.0 x10 ⁹	7 x10 ⁸	1 x10 ⁹	0
	2%	3.0 x10 ⁸	0	0	0	0
<i>Lactobacillus lactis</i>						
Bilis bovina	1%	0	0	0	0	0
	1.20%	0	5 x10 ⁷	7 x10 ⁸	5 x10 ⁹	0
Sales biliares	0.50%	0	0	5 x10 ⁸	0	2 x 10 ¹⁰
	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0

La tabla 2 muestra crecimientos de *L. casei* a las concentraciones de 1 y 1.2% de bilis bovina, mientras que *L. lactis* no crece a una concentración de 1%, sin embargo esta última crece bien a concentraciones de 1.2 % de bilis bovina. Por lo

anterior, se observa que las cepas lácticas presentan crecimientos adecuados, con valores iguales o superiores a 10^8 UFC/ml (Jurado-Gómez *et al.* 2013). El caso de *L. lactis* es especial debido a que creció a una mayor concentración, lo cual demuestra que puede crecer en concentraciones más elevadas que las encontradas en el tracto digestivo de los animales y humanos (Harpert 2008); a pesar de que no tuvo crecimiento a una concentración menor, el hecho de crecer en mayores concentraciones la habilita para recomendarla como agente probiótico. La falta de crecimiento a una concentración de 1% debe ser atribuida a factores que no fueron tenidos en cuenta en la presente investigación.

El crecimiento bajo diferentes niveles de sales biliares mostró que *L. casei* crece de forma adecuada, pero *L. lactis* no crece a concentraciones de 1 y 2 %, lo cual indica dificultad de la cepa para colonizar el tracto digestivo del organismo huésped. La evaluación de las cepas probióticas a condiciones gastrointestinales *in vitro* se debe a la determinación de su capacidad de atravesar el tracto digestivo y colonizar su zona posterior (FAO/OMS 2002). Si una cepa no puede crecer en medios alcalinos como los producidos por las sales biliares y la bilis, no sirve como probiótico, ya que no podrá actuar como barrera antagónica para otros microorganismos patógenos.

4.4.2 Pruebas de catalasa y gas.

Las pruebas de catalasa y gas fueron negativas para ambas bacterias lácticas, la primera prueba muestra una característica normal del género *Lactobacillus*, quienes no tiene la enzima catalasa que posee la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno, lo cual concuerda con lo reportado por Jurado-Gómez *et al.* (2014). La segunda muestra una característica importante para evaluar la capacidad de producir timpanismo de las cepas, cuando estas se administran vía oral (Calpa-Yama y Chaspuengal-Tulcan 2013). Los rumiantes son susceptibles al timpanismo y es producido por diferentes agentes, principalmente las leguminosas

presentes en la ración, que pueden presentar casos más severos produciendo la muerte del animal (Santana *et al.* 2014); de esta manera, la ingestión de la cepa no alterará las funciones intestinales de los animales.

4.4.3 Pruebas de pH. Los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas 3 y 4 para *L. casei* y *L. lactis* respectivamente.

Tabla 3. Prueba de pH para *L. casei*.

Tiempo	pH		
	2	4,5	7
T0	1. 1.6×10^8	1. 2.2×10^8	1. 2.0×10^8
	2. 3.0×10^9	2. 3.0×10^9	2. 2.0×10^9
	3. 3.0×10^{10}	3. 3.0×10^{10}	3. 2.0×10^{10}
	4. 2.7×10^{11}	4. 3.0×10^{11}	4. 2.8×10^{11}
	5. 3.0×10^{12}	5. 3.0×10^{12}	5. 1.5×10^{12}
T1	1. 2.0×10^8	1. 1.4×10^8	1. 7.0×10^7
	2. 1.8×10^9	2. 2.0×10^9	2. 1.8×10^9
	3. 2.0×10^{10}	3. 3.0×10^{10}	3. 3.0×10^{10}
	4. 3.0×10^{11}	4. 1.8×10^{11}	4. 1.3×10^{11}
	5. 2.0×10^{12}	5. 2.0×10^{12}	5. 6.0×10^{11}
T2	1. 2.1×10^8	1. 1.8×10^8	1. 1.6×10^8
	2. 1.9×10^9	2. 1.4×10^9	2. 1.6×10^9
	3. 1.8×10^{10}	3. 1.3×10^{10}	3. 1.2×10^{10}
	4. 1.3×10^{11}	4. 7.5×10^{10}	4. 9.0×10^{10}
	5. 1.4×10^{12}	5. 6.4×10^{11}	5. 7.5×10^{11}

Tabla 4. Valores de crecimiento de *Lactobacillus lactis* evaluado a diferentes niveles de pH.

Tiempo	pH		
	2	4,5	7
T0	1. 9.0×10^7	1. 1.5×10^7	1. 7.0×10^7
	2. 1.3×10^8	2. 5.0×10^8	2. 6.0×10^8
	3. 7.0×10^8	3. 1.0×10^8	3. 3.0×10^9
	4. 6.0×10^9	4. 0	4. 3.0×10^{11}
	5. 9.0×10^{11}	5. 6.0×10^{10}	5. 5.0×10^{10}
T1	1. 1.0×10^7	1. 4.5×10^7	1. 3.2×10^7
	2. 6.0×10^7	2. $9,0 \times 10^7$	2. 4.0×10^7
	3. 4.0×10^8	3. 0	3. 4.0×10^9
	4. 1.1×10^{10}	4. 3.0×10^{10}	4. 3.0×10^{11}
	5. 1.8×10^{11}	5. 0	5. 3.5×10^{11}
T2	1. 7.0×10^7	1. 3.0×10^8	1. 5.0×10^6
	2. 2.2×10^8	2. 3.3×10^8	2. 3.0×10^9
	3. 1.6×10^9	3. 3.5×10^9	3. 3.4×10^9
	4. 3.0×10^{11}	4. 3.0×10^{11}	4. 5.0×10^9
	5. 1.1×10^{11}	5. 2.0×10^{10}	5. 1.0×10^{10}

Los resultados obtenidos para *Lactobacillus casei* indican que la cepa láctica presenta adecuados crecimiento a las condiciones de pH evaluadas, este mismo comportamiento se observó en la cepa de *Lactobacillus lactis*. El tracto gastrointestinal de los seres vivos se caracteriza por variar sus condiciones ambientales; entre las que se encuentran el pH, es así como el paso por el estómago es un reto para las cepas probióticas, dado que este puede llegar a reducirse hasta un valor de 2, siendo una barrera efectiva contra el ingreso de agentes patógenos (Aschenbach *et al.* 2011; Terre *et al.* 2013). Sin embargo, en situaciones particulares algunos microorganismos patógenos atraviesan esta barrera y pueden colonizar el tracto posterior, produciendo complicaciones en el huésped, que deben reducirse mediante diversos tratamientos (Gutiérrez *et al.* 2013).

Por otra parte, el género *Lactobacillus* presenta una característica importante en la colonización del tracto digestivo, debido a su capacidad de resistir pH bajos (Aiba *et al.* 2015). Esta característica se debe a mecanismos de adaptación como la bomba de protones, que les permite realizar un recambio de iones hidrógeno con el medio, manteniendo estable el pH interno de la célula (Melgar-Lalanne *et al.* 2014; Vásquez *et al.* 2007; Lara-Mantilla y Burgos-Partacio, 2012). Además como productos de la fermentación de los carbohidratos obtienen ácidos orgánicos entre los que se encuentran ácido láctico y ácido propiónico (Madhukumar y Muralikrishna, 2012; Abdel-Rahm *et al.* 2013;), estos productos son vertidos al medio, como subproductos, lo que provocan un descenso del pH, aumentando su capacidad de inhibir a otros microorganismos (Saito *et al.* 2014).

4.4.4 Prueba de temperatura sobre las bacterias lácticas. En la tabla 5 se observa los valores de crecimiento de las bacterias lácticas evaluadas a dos niveles de temperatura.

Tabla 5. Crecimiento de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* evaluados a dos temperaturas.

Temperatura	No. de colonias por dilución (UFC/mL)				
	10-ago	10-sep	10-oct	10-nov	10-dic
<i>Lactobacillus lactis</i>					
38°C	2.2 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹	4.0 x 10 ¹¹	8.0 x 10 ¹²	1.2 x 10 ¹³
45°C	2.2 x 10 ⁹	1.8 x 10 ¹⁰	5 x 10 ¹⁰	6 x 10 ¹¹	2.0 x 10 ¹³
<i>Lactobacillus casei</i>					
38°C	4.6 x 10 ⁹	2.6 x 10 ¹⁰	1.0 x 10 ¹¹	1.4 x 10 ¹²	7 x 10 ¹²
45°C	4.8 x 10 ⁹	6.5 x 10 ¹⁰	1.2 x 10 ¹¹	5.0 x 10 ¹²	2.8 x 10 ¹³

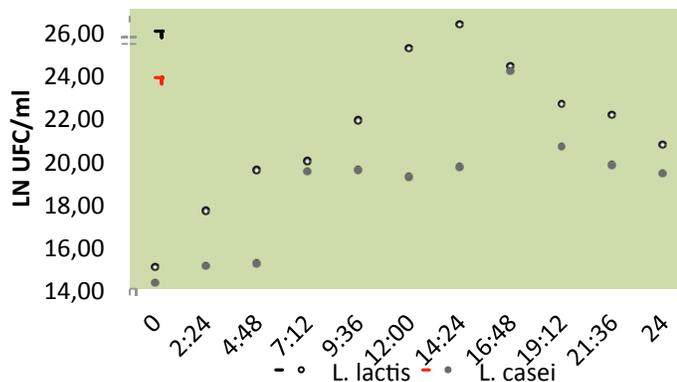
Se encontró crecimientos superiores a 10^8 UFC/ml (Jurado-Gómez 2013), por lo cual se puede argumentar que en condiciones *in vitro* las cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis* crecen de manera adecuada. La evaluación a estas temperaturas simula la temperatura interna de la mayoría de los animales homeotermos, la cual se encuentra en un rango de 36 a 41 °C (Cunningham 2003; Hill 2012; Withers 1992). De esta manera se confirma el crecimiento de las cepas lácticas en las condiciones gastrointestinales de los animales domésticos incluido el bovino. Factor que puede altera el crecimiento de la bacteria y evitar que esta lo colonice.

También se encontró condiciones adecuadas de las cepas lácticas a los procesos de fabricación del alimento, donde las temperaturas pueden llegar a 45°C, que tiene como fin mejorar la palatabilidad y compactación del alimento peletizado. Sin embargo, los microorganismos tienen que soportar otro proceso en la fabricación, como es el estrés mecánico el cual no fue evaluado en la presente investigación (Sullivan *et al.* 2013).

4.5 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.

4.5.1 Evaluación del crecimiento de las bacterias lácticas en el medio MRS.

Figura 13. Cinética de crecimiento de *L. lactis* y *L. casei* en medio MRS.

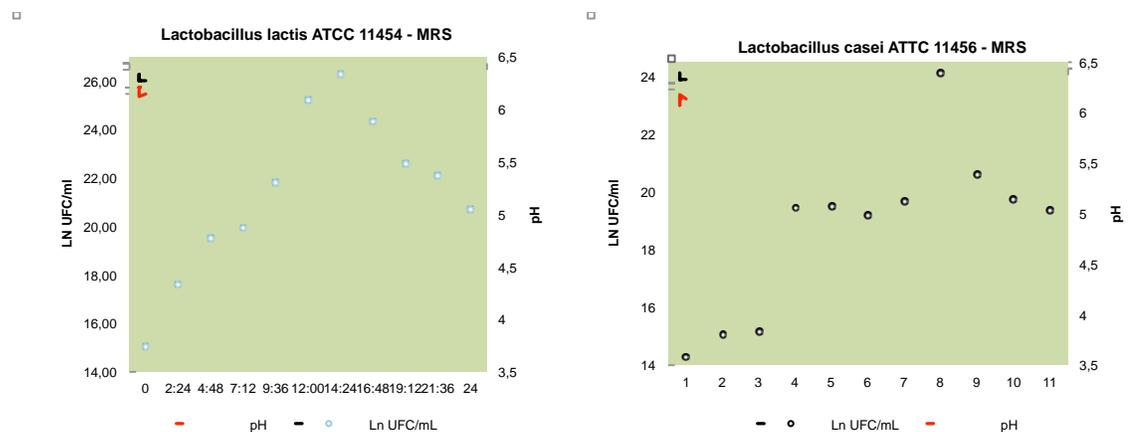


La fase exponencial de la cinética de fermentación se observó a las 16 h 48 min con un valor de 3.0×10^{10} UFC/ml (24.12 LN UFC/ml) para *L. casei* y a las 14h 24 min con un valor de 2.6×10^{11} UFC/ml (26.28 LN UFC/ml) para *L. lactis*(figura 13).

Los valores obtenidos, muestran que las cepas lácticas presentan características adecuadas de crecimiento en el medio MRS, con el cual se puede obtener inóculos que permitan la obtención de la bacteria a nivel comercial (Pérez y Luyo 2008),de igual manera los niveles de crecimiento son adecuados para realizar una colonización de la mucosa intestinal del huésped. Al poder colonizar el tracto gastrointestinal la cepa láctica tiene capacidad de competencia con otras bacterias y evita su proliferación, factor importante de una cepa probiótica (Rudcard *et al.* 2012).

4.5.2 Evolución del pH durante la cinética de fermentación en medio MRS.

Figura 14. Reducción del pH durante la cinética de fermentación y crecimiento microbiano de *L. lactis* y *L. casei* en medio MRS.



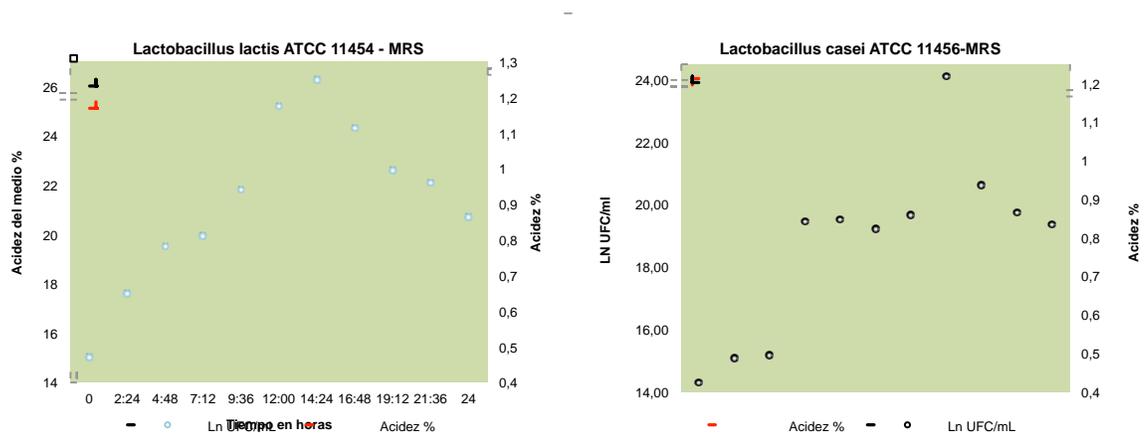
Se encontró un pH de 3.91 y 4.32 a las 24 h de evaluación para *L. lactis* y *L. casei* respectivamente (figura 14), estos valores demuestran la capacidad de las

bacterias lácticas de reducir el pH del medio en que se encuentran. Es bien sabido que uno de los factores que afecta el crecimiento de microorganismo es el pH. La mayoría de las bacterias patógenas se caracterizan por presentar un crecimiento a un valor cercano a 7 y no crecer en valores inferiores a 5 (Gruenheid y Moual, 2012; Poole, 2012; Tango *et al.* 2015). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos considerar que ambas cepas lácticas pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas ya que permiten la disminución del pH del medio. Se encontró que la fase exponencial de crecimiento se dio a un pH de 4.284 para *L. lactis* y 4.94 para *L. casei*, estos resultados son congruentes con lo reportado por Ramírez-Ramírez *et al.* (2011), quienes manifiestan que las bacterias ácido lácticas crecen en valores cercanos a 4, pero se pueden observar crecimientos con valores de 3.2. Sin embargo se observó que *L. lactis* tuvo mayor capacidad para reducir el pH y la diferencia se observa de forma más evidente durante la fase exponencial.

El análisis de regresión mostró que *Lactobacillus lactis* tuvo un descenso del pH de 0.182 por cada periodo de evaluación (2 h 24 min), el cual equivale a un descenso de 0.0758 por hora, mientras que *Lactobacillus casei* un valor de 0.117 por periodo y 0.049 por hora. Este descenso en el medio se debe a la producción de ácidos láctico y ácidos orgánicos (acético, propiónico y butírico), el primero como producto de la fermentación de hexosas (carbohidrato) y los segundos a partir de los polisacáridos no digeribles (Prückler *et al.* 2015; Castillo-Martínez *et al.* 2013; Patel *et al.* 2012).

4.5.3 Incremento de la acidez durante la cinética de fermentación en medio MRS.

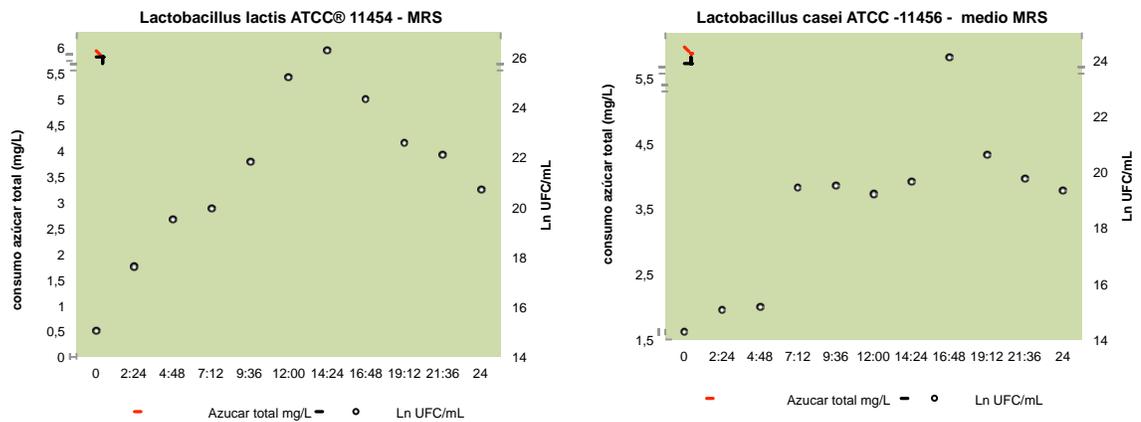
Figura 15. Aumento de la acidez durante la cinética de fermentación de *L. lactis* y *L. casei* en el medio MRS.



Los resultados mostraron que *Lactobacillus casei* tuvo un descenso de 0.037% por periodo (2h 24 min), lo que equivale a un descenso de 0.015% por hora, igualmente *Lactobacillus lactis* mostró un descenso de 0.028 lo que equivale a un descenso de 0.012% por hora (figura 15). La acidez determina en forma indirecta la capacidad de la cepa láctica en crear antagonismo con otras cepas evaluadas, como se mencionó para el pH, las bacterias patógenas no tienen una elevada capacidad de tolerancia a la acidez del medio. Uno de los factores que permite el aumento de acidez es ácido láctico, el cual se produce a través de la enzima lactato deshidrogenasa que se da en procesos de fermentación (Waldir *et al.* 2007; Pellicer *et al.* 2009). Sin embargo, la prueba no determina la cantidad de ácido láctico producido por lo cual el incremento no puede ser atribuido en su totalidad a este ácido, ya que durante los procesos de fermentación se crean otros compuestos que aumentan la acidez del medio.

4.5.4 Consumo de azúcar durante la cinética de fermentación en medio MRS.

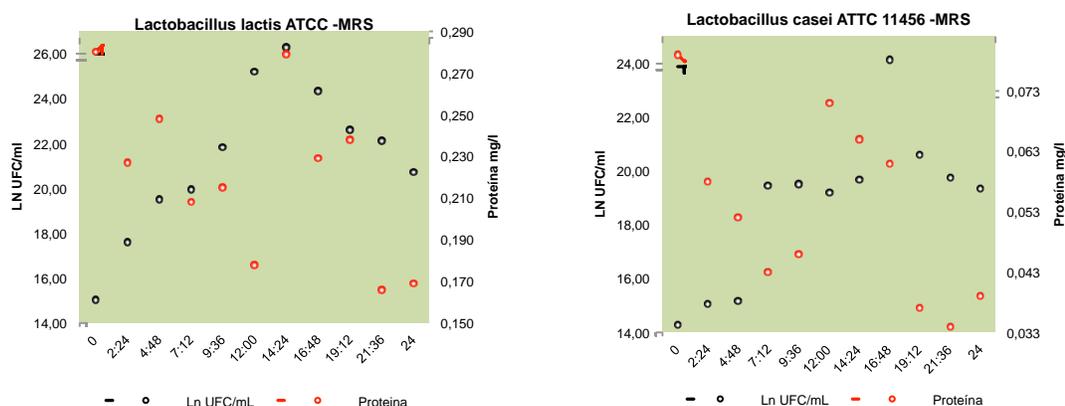
Figura 16. Consumo de azúcar de *L. lactis* y *L. casei* en medio MRS durante la cinética de fermentación.



Lactobacillus casei mostró un consumo de 0.289 mg/l (r^2 0.763 $p < 0,05$) por cada periodo evaluado (2 h 24 min) y *Lactobacillus lactis* indicó un consumo de 0.29 mg/l (r^2 0.872 $p < 0.05$) (figura 16). El consumo de azúcar muestra una adecuada utilización de los carbohidratos presentes en el medio, esto permite inferir que el crecimiento de la bacteria no fue supeditado al suministro de este nutriente y que esta pudo transformar el azúcar en productos como el ácido láctico, que permite la disminución del pH.

4.5.5 Consumo de proteína durante la cinética de fermentación en medio MRS.

Figura 17. Consumo de proteína durante la cinética de fermentación de las bacterias lácticas.



En la figura 17 se observa un consumo estable hasta las 12 h en *Lactobacillus lactis* mientras que en *Lactobacillus casei* se observa hasta las 7 h 12 min, durante este periodo se obtuvo un consumo de 0.102 mg/l para el primero y 0.036 mg/l para el segundo. Sin embargo, para ambas cepas se observa un consumo final de proteína de 0.111 y 0.040 mg/l. El consumo de proteína por parte de los microorganismos hace parte de sus necesidades nutricionales, responde a un recambio de nutrientes y la construcción de estructuras internas para el buen funcionamiento.

4.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN EL SOBRENADANTE DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

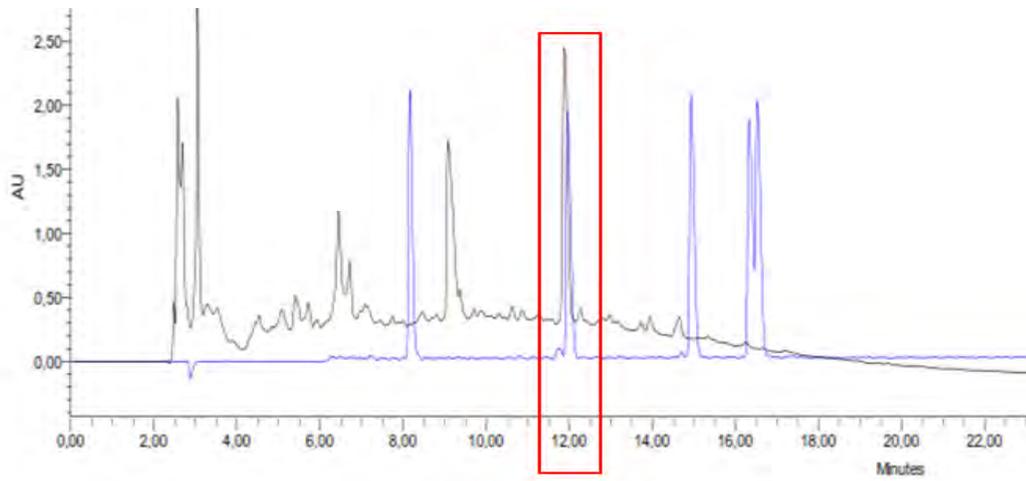
4.6.1 Análisis de péptidos en el sobrenadante de *Lactobacillus casei*. Los péptidos encontrados en el sobrenadante de *L. casei* se pueden observar en la

tabla 6 y el análisis de la muestra en la figura 18 y 19, mientras que los patrones en la tabla 7 y figura 20.

Tabla 6. Resultados análisis de péptidos para las bacterias lácticas a 214 nm.

Pico n°	<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Lactobacillus lactis</i>	
	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio
1	2.472	1.09	2.526	6.74
2	2.597	6.97	2.695	5.69
3	2.688	2.78	3.039	3.43
4	2.971	18.08	3.567	2.99
5	7,342	8.62	5.514	2.31
6	7.707	3.01	6.585	12.38
7	9.716	21.86	9.021	22.48
8	12.145	33.85	11.842	30.92
9	12.541	0.52	12.343	0.99
10	14.836	1.51	14.026	2.52
11	-	-	14.737	1.46
12	-	-	15.398	0.33

Figura 18. Cromatograma de *L. casei* a 214 nm y estándar de calibración.



Color azul mezcla estándar; color negro sobrenadate de *L. casei*

Figura 19. Cromatograma de *L. lactis* a 214 nm y estándar de calibración.

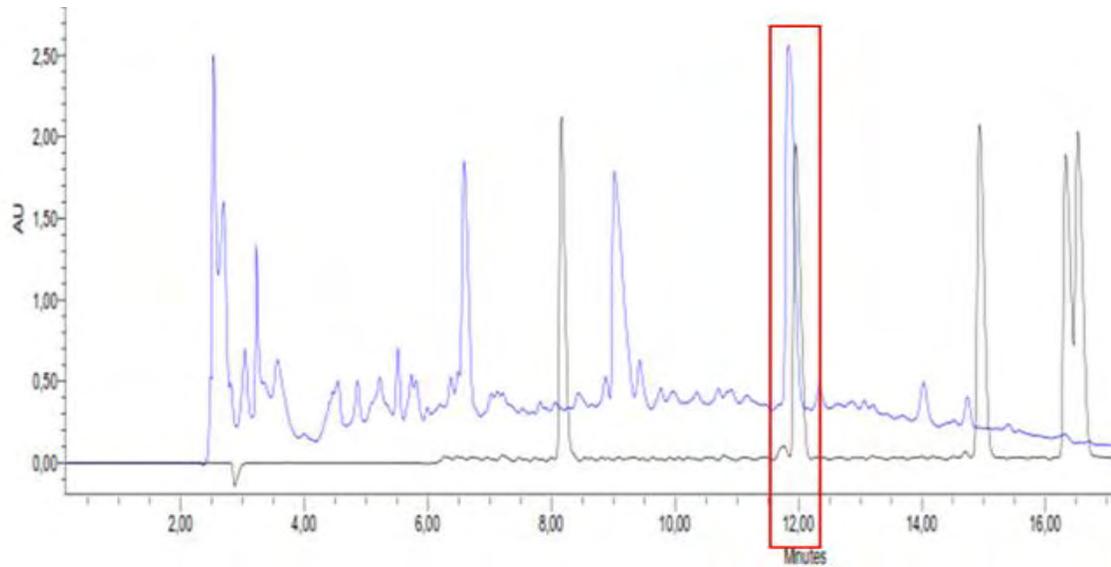
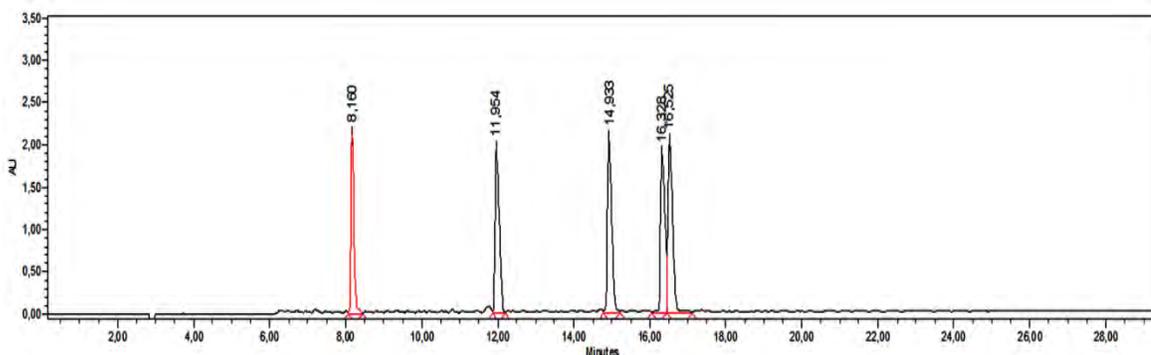


Tabla 7. Péptidos patrón.

No. Pico	Nombre	Tiempo de retención	Área	Cantidad relativa %
1	GLY-TYR	8.16	13536607	17.32
2	VAL-TYR-VAL	11.954	15409159	19.71
3	Metionine Enkefalin Acetate	14.933	16289583	20.84
4	Leucine Enkefalin	16.328	15163721	19.4
5	Angiotensin II Acetate	16.525	17776696	22.74

Figura 20. Cromatograma de péptidos patrón.



El análisis reportó que en el pico número 8 de la muestra de *Lactobacillus casei*, con un tiempo de retención de 12.15 min se observó un tiempo de retención similar al péptido estándar VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0.55 mg/ml de muestra. Mientras que *Lactobacillus lactis* mostró la presencia del misma cadena peptídica VAL-TIR-VAL en el sobrenadante, con una concentración de 0.66 mg/ml de muestra. El patrón indica que esta cadena pertenece a péptidos con anillos aromáticos presentes en sustancias opioides y antihipertensivos. Se esperaba

encontrar cadenas que demuestren la presencia de bacteriocinas en el sobrenadante, sin embargo, esto no sucedió, pero no significa que estas sustancias no se hayan producido, ya que los resultados obtenidos en la investigación muestran que las bacterias lácticas redujeron el crecimiento microbiano.

4.6.2 Análisis de ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis*.

Tabla 8. HPLC para ácidos orgánicos usando el sobrenadante de *Lactobacillus casei*.

Bacteria	Ácido cítrico	Glucosa	Ácido Succínico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol
<i>L. casei</i>	2.62 (g/L) 8.30%	3.95(g/L)	0.71 (g/L) 2.29%	26.5 (g/L) 83.46%	1.38(g/L) 3.51%	0.88 (g/L) 2.44%

Tabla 9. Resultados de HPLC para ácidos orgánicos en sobrenadante de *Lactobacillus lactis*.

Bacteria	Ácido cítrico	Glucosa	Ácido succínico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol
<i>L. lactis</i>	2.72 (g/L) 8.53%	3.95(g/L)	0.70 (g/L) 2.27%	26.20 (g/L) 82.90%	1.42(g/L) 3.62%	0.90 (g/L) 2.68%

Los resultados encontrados demuestran que las cepas lácticas son homofermentadoras, debido a que el porcentaje de ácido láctico en las muestras es superior al 80%. Sin embargo, se observa la producción de otros compuestos como ácido cítrico, ácido succínico y ácido acético. Estos resultados son un indicativo de que las bacterias lácticas pueden alterar el medio donde se

encuentran, reduciendo el pH e inhibiendo la colonización del ambiente por parte de otros microorganismos (Helander 2009). Estos metabolitos son producto de la fermentación de hexosas usando la vía de Embden-Meyerhoff en las bacterias lácticas (Zhan, Bon y Joan 2006).

Finalmente en la tabla 11 se observa el resumen de la cinética de fermentación para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis* en medio MRS.

Tabla 10. Resumen de la cinética de fermentación en medio MRS.

Variable	<i>L. casei</i>	<i>L. lactis</i>
Fase latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	1.233	1.48
Fin fase log (h)	16:48	14:24
Tiempo de duplicación (min)	33	45
Incremento cel. Total	2.60E+08	2,90E+09
Incremento cel. Fin fase log	3.30E+10	1.20E+13
% azúcares consumidos totales (%)	70.07	62.18
% azúcares consumidos fin fase log (%)	54.35	41.12
% proteína consumida total (%)	51.5	31.48
% proteína consumida fin fase log (%)	43.5	11.14
Coeficiente de determinación R^2	0.85	0.772

Los resultados demuestran que *Lactobacillus lactis* presenta mejores características de fermentación en comparación con *Lactobacillus casei*. Sin embargo, los parámetros de crecimiento para ambas cepas son adecuados para su evaluación como probiótico en condiciones *in vivo*.

CONCLUSIONES

Se encontró un adecuado crecimiento de *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus casei* en el medio MRS, sin embargo, el primero presentó un menor tiempo para llegar a la fase exponencial en comparación con el segundo.

Lactobacillus lactis y su sobrenadante inhibieron a las cepas patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* aisladas y de referencia.

Lactobacillus casei inhibió a todas las cepas patógenas de referencia y a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* de las bacterias patógenas aisladas, pero no inhibió a *Escherichia coli*.

La cepa de *Lactobacillus lactis* mostró características adecuadas de inhibición en condiciones *in vitro*, para microorganismos causantes de mastitis subclínica tomadas de un sector de la región nariñense. Sin embargo, presentó dificultades en el crecimiento a sales biliares, por lo cual se necesita continuar investigando con la cepa.

Lactobacillus casei inhibió a la mayoría de cepas patógenas aisladas, demostrando su capacidad de control de estos microorganismos, además el crecimiento bajo las condiciones gastrointestinales *in vitro* indicó una adecuada colonización del trato digestivo.

RECOMENDACIONES

Se debe evaluar las cepas lácticas en condiciones *in vivo* con el fin de determinar el efecto en campo, y observar si existen diferencias con los resultados encontrados en condiciones *in vitro*.

Se deber realizar un análisis molecular de las biocinas presentes en el sobrenadante, que permita caracterizarla y determinar su modo de acción.

Sería interesante evaluar las cepas con otros patógenos causantes de mastitis subclínica en el departamento de Nariño.

Se sugiere evaluar las cepas con bacterias patógenas de otras especies de interés zootécnico, con el fin de determinar su efecto *in vitro*, y luego su efecto *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-RAHAM, M., TASHIRO, Y., SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advance*. Vol. 31, 2013. p. 877-902.

ADELAYO-TAYO, B. y ONILUDE, A. Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Applied Science Journal*. Vol. 4. No 5. 2008. 741-747.

AGUDELO-LONDOÑO, N. Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Universidad Politécnica Bolivariana*. 2013. p. 63.

AHMAD, J. y AHMAD, S. Drug resistance an international issue. Vol. 3. No. 2. 2015. p. 905-915.

AIBA, Y., NAKANO, Y., KOGA, Y., TAKAHASHI, K. y KOMATSU, Y. A highly acid-resistant novel strain of *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 has antibacterial activity, including that against *Helicobacter pylori*, and inhibits gastrin-mediated acid production in mice. *MicrobiologyOpen*. 2015. p. 1-10.

AKABANDA, F., OWUSU-KWARTENG, J., TANO-DEBRAH, K., GLOVER, D. y JESPERSEN, L. Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. *Food Microbiology*. Vol. 34. 2013. p. 277-283.

ALCALDÍA DE GUACHUCAL. Departamento de Nariño. Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria UMATA. COMUNICADO DE PEQUEÑOS PRODUCTORES DE LECHE DEL MUNICIPIO DE GUACHUCAL NARIÑO. 2013. Disponible en: http://www.fcm.org.co/fileadmin/Contenidos/imagenes/NOTICIAS/NOTICIAS_REGIONALES/comunicado_lecheros.pdf.

ALFARO-SANABRIA, L. Efecto de Penicilinas y Tetraciclinas en Leche sobre el Crecimiento de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. Zamorano. 2007. p. 40.

AMÓRTEGUI-DÍAZ, J. Purificación y caracterización de bacteriocinas producidas por dos cepas nativas de *Lactobacillus plantarum*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 2012. p.53.

ANAYA-LÓPEZ, J., CONTRERAS-GUZMÁN, O., CÁRABEZ-TREJO, A., BAIZABAL-AGUIRRE, V., LÓPEZ-MESA, J., VALDÉS-ALARCÓN, J. y OCHOA-

ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*. Vol. 81. 2006. p. 358-361.

ASAF, S., LEITNER, G., FURMAN, O., LAVON, Y., KALO, D., WOLFENSON, D. y ROTH, Z. Effects of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus* induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*. Vol. 147. 2014. p. 33-43.

ASCHENBACH, J. R., PENNER, G. B., STUMPF, F. y GÄBEL, G. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science*. Vol. 89. 2011. p. 1092-1107.

BATDORJ, B., DALGALARRONDO, M., CHOISSET, Y., PEDROCHE, J., MÉTRO, F., PRÉVOST, H., CHOBERT, J. y HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 101. 2006. p. 837-848.

BAUER, A. W., KIRBY, J. SHERRIS, C. y TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* Vol. 36. 1966. p. 493-496.

BEDOLLA, C y PONCE DE LEÓN, M. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDEVET*. Vol. IX, Nº 4. 2008. p. 1-14.

BELTRÁN-VAQUERO, D., CRESPO-GARZÓN, A., RODRÍGUEZ-BRAVO, C. y GACÍA-IGLESIAS, A. Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 31. No. supl. 1. 2015. p. 89-95.

BENAVIDES, V., JURADO, C. y CEDEÑO, D. Factores de riesgo asociados a aborto bovino en la cuenca lechera del departamento de Nariño. *Rev. MVZ. Córdoba*. Vol. 15. No. 2. 2010. p. 2087-2094.

BERGONIER, D., SOBRAL, D., FEBLER, T., JACQUET, E., GILBERT, F., SCHAWART, S., TREILLES, M. BOULOC, POURCEL, C. y VERGNAUD, G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Veterinary Research*. Vol. 45. 2014. p. 97.

BERISTAIN-BAUZA, S., PALOU, E. y LÓPEZ-MALO, A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Vol. 2. No. 2. 2012. p. 64-78.

BESHKOVA, D. y FRENGOVA, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* Vol. 12. No. 4. p. 419-432.

BOUMAN. M. Células somáticas: ¿cómo interpretar los datos? COLAVECO. [Citado 03 diciembre de 2013] disponible en: http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/Celulas_somaticas.pdf

BRADLEY, J. y GREEN, M. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol.39. 2001. p.1845 -1849.

BRIZUELA, M. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Universidad de la Habana. 2003. p. 78.

BROADBENT, J., LARSEN, R., DEIBEL, V. y STEELE, J. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *Journal of Bacterology.* Vol. 192. No. 9. 2010. p. 2445-2458.

CABALLERO-CERVANTES, Y. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holsteins. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Posgrado de recursos genéticos y productividad ganadera. 2014. p. 85.

CABELLO-ACEFES, M. Caracterización de una cepa de *Lactobacillus* para su utilización como probiótico. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. 2007. p. 58.

CÁCERES, P. y GOTTELAND, M. Alimentos probióticos en Chile: ¿qué cepas y qué propiedades saludables?. *Revista Chilena de Nutrición.* Vol. 37. No. 1. 2010. p. 97-109.

CAI, Y., BENNO, Y., NAKASE, T. y TAE-KWANG, O. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. En: *Journal Genealogy Applied Microbiology.* Vol. 44. 1998. p. 312.

CAI, Y., SUYANANDANA, P., SAMAN, P. y BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal Genealogy Applied Microbiology.* Vol. 45. 1999. p. 177-184.

CAJARVILLE, C., BRAMBILLASCA, S. y ZUNINO, P. Utilización de prebióticos en monogástricos: aspectos fisiológicos y productivos relacionados al uso de

subproductos de agroindustrias y de pasturas en lechones. Revista Porcicultura Iberoamericana. Vol. 1. No. 2. 2011. p. 1-11.

CALVINHO, F. y TIRANTE, L. prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias. Vol. 4. No. 1-2. 2005. p. 29-40.

CALDERÓN, A. y RODRÍGUEZ, V. Prevalencia de Mastitis Bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano Cundiboyacense (Colombia). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 21. No. 4. 2008. p.1-8.

CALPA, F. y CHASPUENGAL, A. Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias pecuarias. 2013. p 73.

CAMPOS, C., RODRÍGUEZ, O., CALO-MATA, P., PRADO, M. y BARROS-VELÁSQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International. Vol. 39. p. 356-364.

CANCHO, B., GARCÍA, M. y SIMAL, J. El Uso De Los Antibióticos En La Alimentación Animal: Perspectiva Actual. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 3. No. 001. 2000. p. 39-47.

CASTILLO, M., SUNIAGA, J., ROJAS, G., HERNÁNDEZ, J., CAAÑAMO, J., URBINA, A. y TOVAR, L. Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado mérida. Agricultura Andina. Vol. 16. 2009. p. 39-48.

CASTILLO-MARTÍNEZ, F., MARCOS-BALCIUNAS, E., SALGADO, J., DOMÍNGUEZ, J., CONVERTI, A. y DE SOUSA-OLIVEIRA, R. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends in Food Science & Technology. Vol. 30. 2013. p. 70-83.

CASTRO, G., VALBUENA, E., BRÍÑEZ, W., SÁNCHEZ, E., VERA, H. y TOBAR, A. comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blanco. Revista Científica FCV-LUZ. Vol. XIX. No. 2. 2009. 201-209.

CARAYA, G., KUMAR, A., SHARMA, A., SINGH, M. y GOPEL, P. polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Escherichia coli* mastitis in murrah buffaloes. Journal of Cell and Tissue Research. Vol. 14. No. 3. 2014. p. 4485-4489.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Information Supplement. vol. 3, no. 001. 2011. p. 172.

CONTRERAS, A., SIERRA, D., SANCHÉZ, A., CORRALES, J., MARCO, J., PAAPE, M. y GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. Vol. 68. 2007. p. 145-153.

CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Ed. Acribia, 1993. p. 413.

CUETO-VIGIL, M., ACUÑA-MONSLAVE, Y. y VALENZUELA-RIAÑO, J. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Actual Biol. Vol. 32. No. 93. 2010. p. 129-138.

CUNNINGHAM, J. Fisiología Veterinaria. Elsie España, 2003. p. 575.

DAHL, T., MIDDEN, W. y HARTMAN, P. Comparison of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. Journal of Bacteriology. vol.171, no. 4. 1989. p. 5.

DAL-BELLO, B., COCOLIN, L., ZEPPA, G., FIELD, D., COTTER, P. y HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. Vol. 153. 2012. p. 58-65.

DANAMIEL, G., PUIGDEVALL, T., CHAN, D. y GENTILINI, E. Mastitis bovina: variaciones en la detección de β -hemolisina y factor CAMP para la identificación de *Streptococcus agalactiae*. Rev. Med. Vet. (B. aires). Vol. 94. No. 2. 2013. p. 24-27.

DE-VUYST, L. y LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. Vol. 13. 2007. p. 194-199.

DUBOIS, M. GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. y SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. Vol. 28. 1956. p. 350-356.

ESTRADA, A., GUTIÉRREZ, L. y MONTOYA, O. Evaluación *in vitro* del efecto bacteriocida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Rev. Facultad Nacional Agropecuaria Medellín, Vol. 58. No 1. 2005. p. 2601-2609.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012.

FEDEGAN. Oficina de planeación de la Federación Colombiana de ganaderos. 2013. Disponible en: <http://www.elheraldo.co/noticias/agropecuaria/consumo-de-leche-subio-levemente-en-colombia-110553>.

FERNÁNDEZ, D. A., Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina, Universidad Complutense de Madrid. 2005. p. 98.

GARCÍA-PEÑA, C. Evaluación de la acción antimicrobiana de bacteriocinas aisladas a partir de bacterias lácticas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. 2012. p. 72.

GHAREEB, K., AWAD, W., MOHL, M., PORTA, R., BIARNÉS, M., BÖHM, J. y SCHATZMAYR, G. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. Poultry Science. Vol. 91. 2012. 1825-1832.

GIANNEECHINI, R., CONCHA, C., DELUCCI, I., GIL, J., SALVARREY, L. y RIVERO, R. Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. Veterinaria (Montevideo). Vol. 50. No. 196. 2014. p. 4-32.

GÓMEZ-QUISPE, O., SANTIVAÑEZ-BALLÓN, C., ARAUCO-VILLAR, F., ESPEZUA-FLORES, O. y MANRIQUE-MEZA, J. Criterios de Interpretación para California Mastitis Test en el Diagnóstico de Mastitis Subclínica en Bovinos. Rev. Inv. Vet. Perú. Vol. 26. No. 1. 2015. p. 86-95.

GORAYA, M., ASHRAF, M., UR-RAHMAN, R. y HABIB, A. Determination of Antibacterial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Producing Bacteria. Journal of Infection and Molecular Biology. Vol. 1. No. 1. 2013. p. 9-12.

GRUENHEID, S. y MOUAL, H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Letters. Vol. 330. 2012. p. 81-89.

GASQUE, R. Mastitis bovina. Pág. 176-181. En: Enciclopedia bovina. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2008. p. 433.

GUTIÉRREZ, C., LÓPEZ, A. y PARRA, J. Lesiones en órganos de cerdos posdestete, inducidas por el lipopolisacárido de *E. coli*. Rev. MVZ Córdoba. Vol. 18. No. 2. 2013. p. 3534-3542.

GUTIÉRREZ-RAMÍREZ, L. y ACOSTA-OTALVARO, E. Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. Revista Lasallista de Investigación. Vol. 5. No. 2. 2008. 68-73.

GUZMÁN, B., HERNÁNDEZ, J., ORTEGA, S., VIRUEGAS, R. y BARRITA, S. Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber. Revista Mexicana de Pediatría. Vol. 76. No. 3. 2009. 136-145.

HAL, S., LODISE, T. y PATERSON, D. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in Staphylococcus aureus Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. Clinical Infectious Diseases. Vol. 54. No. 6. 2012. p. 755-771.

HALASA, T., HUIJPS, K., OSTERAS, O. y HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Veterinary Quarterly. Vol. 29. No. 1. p. 18-31.

HILL, R. Animal Physiology. Sinauer Associates. 2012. p. 725.

JURADO-GÁMEZ, H., RAMÍREZ, C. y MARTÍNEZ-BENAVIDES, J. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. Rev MVZ Córdoba. Vol 18. No. supl. 2013. p. 3648-3654.

JURADO-GÁMEZ, H., CALPA-YAMÁ, F. y CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. 2014. p. 241-257.

JURADO-GÁMEZ, H., MARTINEZ, J., CHASPUENGAL, A. y CALPA, F. Evaluation *in vitro* OF the action of *Lactobacillus plantarum* with probiotic characteristics on *Yersinia pseudotuberculosis*. Rev. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 12. No. 2. 2014, p. 49-59.

JURADO, H. Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. Tesis Doctorado en Ingeniería de Alimentos. Universidad del Valle. Escuela de ingeniería de alimentos, 2010.p. 170.

KHEMARIYA, P., SINGHI, S., NATH, G. y GULATI, A. Isolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility of nis⁺ Lactococcus lactis from Dairy and Non-dairy Sources. Vol. 31. No. 4. 2013. p. 323-331.

LARA-MANTILLA, C. y BURGOS-PORTACIO, A. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV. No. 1. 2012. p. 31-40.

LANARA, Laboratorio de Referencia Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasília. vol. 2, no. 25. 1981. p. 1-15.

LI, J., ZHOU, H., YUAN, L., HE, T. y HU, S. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. Journal of Zhejiang University Science B. Vol. 10. No. 10. 2009. p. 753-760.

LÓPEZ, J., OCHOA, A., SANTOYO, P., ANAYA, J., MEDINA, E., MARTÍNEZ, M. y LOEZA, P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Vol. 39. No. 3. 2008. p. 49-57.

LÓPEZ-BREA, S. y DOMINGO, D. Antibioticoterapia con probióticos. Rev. Esp. Quimioterap. Vol. 20. No. 2. 2007. p. 170-181.

LOWRY, O., ROSEBROUG, N., FAR, A. RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. Vol. 193. 1951. p. 265-75.

LÜTHJE, P. y SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 57. 2006. p. 966-969.

MADHUKUMAR, M. y MURALIKRISHNA, G. Fermentation of xylo-oligosaccharides obtained from wheat bran and Bengal gram husk by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Vol. 49. No.2. 2012. 745-752.

MADUREIRA, A., SOARES, J., AMORIN, M., TAVARES, T., GÓMEZ, A., PINTADO, M. y MALCABA, F. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. Vol. 93. 2013. p. 1458-1465.

MANZANARES, M., ALONSO, M. y BIESTRO, A. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos en pacientes críticos. Rev. Bras. Nutr. Clin. Vol. 21. No. 2. 2006. p. 155-162.

MARTÍNEZ-PACHECO, D., CRUZ-CARRILLO, A. y MORENO-FIGUEREDO G. Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los microbianos más frecuentes. Revisión. Conexión agropecuaria. Vol. 3. No. 1. 2013. p. 53-73.

MELGAR-LALANNE, G., RIVERA-ESPINOZA, Y., FARRERA-REBOLLO, R. y HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. survival under stress of halotolerant lactobacilli with probiotic properties. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 13. No. 1. 2014. p. 323-335.

- MENAD, N., CHERIGUENE, A., BELARDI, F., HAMMOUNI, R. y MOGHTET, S. The Antibacterial Activity of *Lactococcus lactis* sbsp *cremoris* against *Salmonella* Sp. J. Med. Microb. Diagn. Vol. 3. No. 1. 2014. p. 129.
- MENZIES, P. y RAMANOON, S. Mastitis of sheep and goats. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Vol. 17. No. 2. 2001. p. 333-358.
- MOHANKUMAR, A. y MURUGALATHA, N. Characterization and Antibacterial Activity of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. International Journal of Biology. Vol. 3. No. 3. 2011. 128-143.
- MOON, J., LEE, A., KANG, H., LEE, E., JOO, Y., PARK, Y., KIM, M. y KOO, C. Antibioqram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. Journal of Dairy Science. Vol. 90. 2007. p. 1716-1724.
- MOROSINI, M., CERCENADO, E., ARDANUY, C. y TORRES, C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2011. p. 1-8.
- MOUSAVI, Z., MOUSAVI, S., RAZAVI, S., EMAM-DJOMEH, Z. y KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. Mayo. 2010. p. 1-6.
- MOYES, K., LARSEN, T., SORENSEN, P. y INGVARTSEN, K. Changes in various metabolic parameters in blood and milk during experimental *Escherichia coli* mastitis for primiparous Holstein dairy cows during early lactation. Journal of Animal Science and Biotechnology. Vol. 5. 2014. p. 47.
- MADR. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Resolución No. 000017 de 2012. Por la cual se establece el sistema de pago de leche cruda al proveedor. p 18.
- NATH-MOHANTY, J., KUMAR-DAS, P., NANDA, S., NAYAK, P. y PRADHAN, P. Comparative analysis of crude and pure lactic acid produced by *Lactobacillus fermentum* and its inhibitory effects on spoilage bacteria. The Pharman Innovation Journal. Vol. 3. No. 11. 2015. p. 38-42.
- NEGRI, L. El pH y la acidez de la leche. [Citado 02 dediciembre de 2013] disponible en:<http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>

NEHA, A., KAMALJIT, S., AJAY, B. y TARUN, G. Probiotic: as effective treatment of diseases. International Research Journal of Pharmacy. Vol. 3. No. 1. 2012. p. 96-101.

NORREN, N., YENG, W., BARADARAN, A., ROSFARIZAN, M., SILEO, Ch., ILLIAS, Md., YUSOFF, K. y RAHIN, A. *Lactococcus lactis* M4, a potential host for the expression of heterologous proteins. Microbial Cell Factories. Vol. 10. No. 28. 2011. p. 1-10.

OLDEN-RIEKERINK, R., BARKEMA, H., KELTON, D. y SCHOLL, D. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. Vol. 91. No. 4. 2008. p. 1366-1377.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. FAO-OMS. 2006. p. 52.

ORTIZ, P. Utilización de Alternativas Naturales a los Antibióticos Promotores del Crecimiento en la Salud Intestinal y Parámetros Productivos de Pollos Broilers. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 2004. p. 78.

OSTERAS, O., SOLVEROD, L. y REKSEN, O. Milk cultura results in a Large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. Journal of DairyScience. Vol. 89 No. 2. 2006. p. 1010-1023.

PARADA, J., CARON, C., BIANCHI, A., MEDEIROS, P. y SOCCOL, R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 50. No. 3. 2007. p. 521-542.

PASTOR-GUIZAR, F. y BEDOLLA-CEDEÑO, L. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacan, mediante la prueba de california. REDVET. Vol. IX. No. 10. 2008. p. 1-34.

PATEL, S., MAJUMDER, A. y GOYAL, A. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. Indian J. Microbiol. Vol. 52. No. 1. 2012. p. 3-12.

PELLICER, K., HOYO DEL, G. y BROCARD, S. Efecto del Ácido clorhídrico y Ácido Láctico sobre el desarrollo de treinta cepas de *Listeriaspp.* aisladas de alimentos. Rev. Fac. Cs. Vest. Vol. 50. No. 1. 2009. p. 19-22.

PEREIRA, U., MIAN, G., OLIVERIRA, I., BENCHETRIT, L., COSTA, G. y FIGUEIREDO, H. Genotyping of Streptococcus agalactiae strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. Veterinary Microbiology. Vol. 140. 2010. p. 186-192.

PEREYRA, E., DALLAR, B. y CALVINO, L. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 46. No. 4. 2014. p. 363-375.

PÉREZ-LUYO, A. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? Rev Estomatol Herediana. Vol18. No. 1. 2008. p. 65-68.

PETZL, W., ZERBE, H., GÜNTER, J., YANG, W., SEYFER, H., NÜRNBERG, G. y SCHUBERT, H. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Veterinary Research, BioMed Central. Vol. 39. No. 2. 2008. p. 1-23.

PINZÓN-TRUJILLO, A., MORENO-VÁSQUEZ, F. y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, G. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 17. 2009. p. 23-35.

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. p. 1-21.

PROEXPORT, Promoción de Turismo, Supervisión y Exportaciones. Sector lácteo en Colombia. Bogotá, Colombia. 2011. p. 3.

PRÜCKLER, M., LORENS, C., ENDO, A., KRALER, M., DÜRRSCHMID, K., HENDRIKS, K., DA SILVA, F., AUTERITH, E., KNEIFEL, W. y MICHLMAYR, H. Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. Food Microbiology. Vol. 49. 2015. p. 211-219.

QUINTERO, E. Evolución y desarrollo del sector lácteo en Colombia desde la perspectiva del eslabón primario (producción). Monografía tipo Revisión de Literatura a Profundidad presentado para optar por el título de Especialista en Gerencia Agropecuaria. Corporación universitaria Lallista. 2011. p 78.

QUIROZ-ENRÍQUEZ, M., FERNÁNDEZ-RUÍZ, D., BARRIOS-ROMERO, B., MILIÁN-VÁSQUEZ, P., CISNÉROS-NÁPOLES, Y. y NOA-JUSTAFÉ, L. Las oxazolidinonas como alternativa en el tratamiento del Staphylococcus aureus multirresistente. Vol. 11. No. 2. 2013. p. 159-166.

RAFIK, S., SELIM, S., RAFIK, S., HUSSEIN, G. y AZZA, T. Preparation of Combined Inactivated Vaccine Against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens* type A and C Toxins. World Applied Sciences Journal. Vol. 33. No. 3. p. 472-478.

RAJARAM, G., MANIVASAGAM, P., THILAGAVATHI, A., SARAVANAKUMAR, A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. Vol. 2. No. 2. 2010. p. 138-144.

RAMÍREZ-PEINADO, M. Evaluación de la seguridad *in vitro* de cepas de *Lactobacillus lactis* aisladas de trucha arcoíris y su ambiente acuícola para su aplicación como probióticos en la acuicultura. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. 2013. p. 66.

RAMÍREZ-RAMÍREZ, J., ROSAS-ULLOA, P., VELÁSQUEZ-GONZÁLEZ, M., ULLOA, A. y ROMERO, F. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente. Vol. 2. No. 7. 2011. p. 1-16.

REIS, J., PAULA, A., CASAROTTI, S. y PENNA, A. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. Food Eng. Rev. Vol. 4. 2012. p. 124-140.

RELOVA-VENTO, D., ARMANTEROS-AMAYA, M. y CAPDEVILA-VARELA, J. Caracterización de la situación clínico-epizootiológica de la mastitis bovina en vacas primerizas Holstein de una lechería especializada. REDVET. Vol. IX. No. 9. 2008. p. 1-12.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, G. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 12. 2006. p. 35-55.

RODRÍGUEZ, I., BUENO, G., RODRÍGUEZ, D., DELGADO, G., SERRANO, P. y BRIZUELA, M. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. New Horizons Biotechnology. 2003. p. 163-172.

ROESCH, M., DOHERR, M., SCHÄREN, W., SCHÄLLIBAUM, M. y BLUM, J. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. Journal of Dairy Research. Vol. 74. 2007. p.86-92.

ROLDÁN, M., OTERO, J., VILLAREAL, F., BARONI, M., CARRASCO, M., ÁLVAREZ, C., RUSSELL-WHITE, K., MÉNDEZ, E. y SIMONETTA, A. Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 31. 2011. p. 31-37.

ROTEM, E., FRIEDMAN, N., MOLSHANSKI-MOR, S. y QIMRON, U. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 78. No. 3. 2012. p. 744-751.

RUÍZ, A., PONCE, P., GOMES, G., MOTA, R., SAMPAIO, E., LUCENA, E. y BENONE, S. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim.* Vol. 33. No. 1. 2011. p. 57-64.

SAITO, V., SANTOS, T., VINDEROLA, C., ROMANO, C., NICOLI, J. ARAÚJO, L. COSTA, M., ANDRIOLI, J. y UETANABARO, A. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. *Journal of Food Science.* Vol. 79. No. 2. 2014. p. M208-M213.

SANKAR, N., PRIYANCKA, D., REDDY, P., RAJANIKANTH, P., KUMAR, V. y INDIRA, M. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. *International Journal of Microbiological Research.* Vol. 3. No. 2. 2012. p. 133-137.

SANTANA, J., DA SILVA, V. y PINHO, A. Distúrbios metabólicos em ruminantes – Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.* Vol. 8. No. 4. 2014. 157-186.

SOLARTE-PORTILLA, C., MARTÍNEZ-SALAS, A. y BURGOS-PAZ, W. El tlc con estados unidos: efectos y retos para la cadena láctea de Nariño. Vol. VII. No. 1. p. 101-120.

SOURAV, B., ARIJIT, D. Produced by lactic acid bacteria isolated from traditional indian fermented foods. *American Journal of Food Technology.* Vol. 5. No. 2. 2010. p. 111-120.

SULLIVAN, K., FREEMAN, S., HEUTENG, E., HEUTENG, K., WOLFE, B. y POORE, M. Impact of two types of complete pelleted, wild ungulate feeds and two pelleted feed to hay ratios on the development of urolithogenic compounds in meat goats as a model for giraffes. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition.* Vol. 97. 2013. p. 566-576.

SUNAGAR, R., DEORE, S., DESHPANDE, P., RIZWA, A., SANNEJAL, D., SUNDARECHAN, S., RAMWOOL, D., et al. Differentiation of *taphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by PCR for the fibrinogen binding protein gene. *Journal of Dairy Science.* Vol. 96. 2013. p. 1-9.

TAFUR, J., TORRES, J. y VILLEGAS, M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Inyectología.* Vol. 12. No. 3. 2008. p. 223-233.

TAGG, J. y MCGIVEN, A. Assay system for Bacteriocins. Appl. Environ. Microb. Vol. 21. No. 5. 1971. p. 943.

TAMBEKAR, D. y BHUTADA, S. Studies on Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by Lactobacillus strains isolated from milk of domestic animals. The International Journal of Microbiology. Vol. 8. No. 2. 2009. p. 1-9.

TANGO, C., MANSUR, A. y OH, D. Fumaric Acid and Slightly Acidic Electrolyzed Water Inactivate Gram Positive and Gram Negative Foodborne Pathogens. Microorganisms. Vol. 3. 2015. p. 34-46.

TATSADJIEU, N., NJINTANG, Y., SONFACK, T., DAOUDOU, B. y MBOFUNG, C. Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. African Journal of Microbiology Research. Vol. 3. No. 5. 2009. p. 220-227.

TERRE, M., CASTELL, L., FÁBREGAS, F. y BACH, A. *Short communication*: Comparison of pH, volatile fatty acids, and microbiome of rumen samples from preweaned calves obtained via cannula or stomach tube. Journal of Dairy Science. Vol. 96. 2013. p. 5290-5294.

TRUJILLO, C., GALLEGU, A., RAMÍREZ, N. y PALACIO, L. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. Vol. 24. 2011. p. 11-18.

VALLEJO, M., OLIVERA, N., SEQUEIROS, C. y MARGUET, E. Actividad antilisterica de bacterias ácido lácticas Aisladas de peces marinos. Analecta Veterinaria. Vol. 29. No. 2. 2009. p. 19-23.

VÁSQUEZ, S., LOPRETTI, M., REY, F. y ZUNINO, P. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de Lactobacillus spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. INN-TEC. Vol. 2. 2007. p. 12-14.

VÁSQUEZ, S., SUÁREZ, H. y ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Rev Chil Nutr. Vol. 36. No. 1. 2009. p. 1-12.

VICTORÍA-LEÓN, T., TOTOSAUS, A., GUERRERO, I. y PÉREZ-CHABELA, L. efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas thermoresistan lactic acid bacteria effect on cooked sausages. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 5. No. 2. 2006. p. 135-141.

WAKIL, S., LABA, S. y FASIKU, S. Isolation and identification of antimicrobial-producing lactic acid bacteria from fermented cucumber. African Journal of Biotechnology. Vol. 13. No. 25. 2014. p. 2556-2564.

WALDIR, E., RYCHTERA, M., MELZUCH, K., QUILLAMA, E. y EGOAVIL, E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Rev. Perú Biol. Vol. 14, No. 2. 2007. p. 271-275.

WITHERS, P. Comparative Animal Physiology. Saunders College Pub. 1992. p. 949.

WU, R., SUN, Z., WU, J. MENG, H. y ZHANG, H. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. Journal of Dairy Science. Vol. 93. 2010. p. 3858-3868.

ZARATE, E. Modelamiento del efecto del cloruro de sodio sobre el crecimiento y la producción de nisina de *Lactococcus lactis*. Universidad del Cauca. 2011. p 60

ZECCONI, A., CESARIS, L., LIANDRIS, E., DAPRA, V. y PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microbial Patogénesis. Vol. 40. 2006. p. 177-183.

ANEXOS

Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™

- En cámara de flujo laminar tipo II, junto al mechero, y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente, abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.
- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad, triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato, saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando un asa estéril, crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.

De Inmediato, llevar a incubar las cajas petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

Anexo B. Método de Dubois

Mediante la utilización de el reactivo antrona, permite la determinación de componentes importantes como hexosas, aldopentosas y ácidos hexouronicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La lectura de las muestras se hace a una absorbancia máxima a 625 nm.

Reactivos: antrona, ácido sulfúrico 10% y 96%, glucosa anhidro

Lavado de vidriería con H₂SO₄ al 10%. Se dejan en remojo los tubos de ensayo con el mismo acido por 24 horas, luego se desocupan y se dejan invertidos para su secado por lo menos 3 horas.

Curva Estándar

Preparación del reactivo de antrona: disolver 200mg (0,2 g) de antrona en 100 ml de H₂SO₄ al 96% en un balón aforado y conservarlo cubierto con papel aluminio.

Solución Madre: Disolver 1,25 g de glucosa anhidra en un balón aforado de 250 ml, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

Solución estándar: De la solución madre trasferir 1 ml en un balón aforado de 100ml, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

Dilución patrón: se establece una curva estándar de 0 a 50 mg/L. después de efectuar una dilución de 1/10 de la solución madre (500 mg/L), depositar en una serie de tubos 0-0,25-0,50-0,75-1.0-1,25-1,50-1,75-2,0-2,5 ml de la solución madre y completar a 2,5 ml con agua destilada.

Adición de la antrona

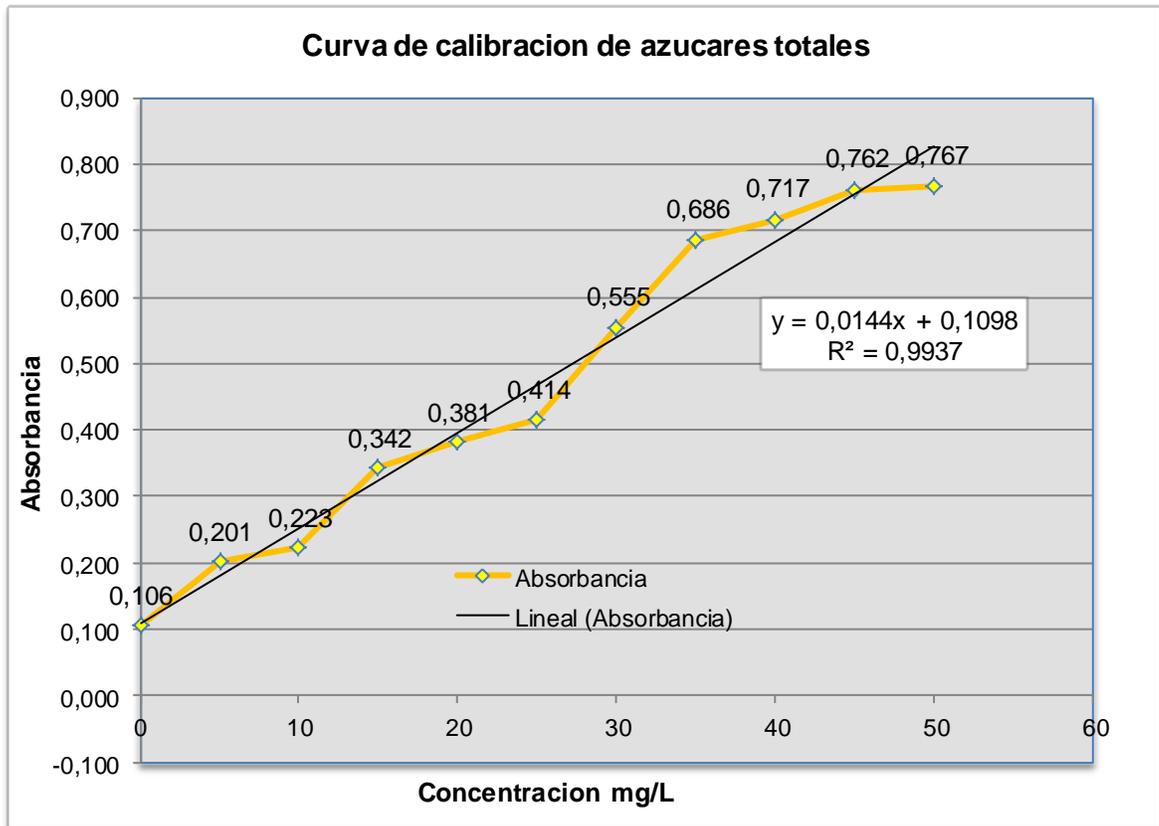
- Se depositan 5 ml de la solución preparada en cada dilución (3 tubos) de los diferentes tubos. Estos tubos se colocan perpendiculares en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex continuamente hasta homogenizar la solución.
- Llevar a ebullición por 10 minutos todos los tubos al mismo tiempo.
- Enfrían posteriormente en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex y esperar 15 minutos para eliminar las burbujas de aire y el empañamiento de los tubos.

- Llevar a lectura al espectrofotómetro a 625 nm en un periodo máximo de 30 minutos.
- El blanco se lee por duplicado. El blanco es 2,5 ml de agua destilada.

Procedimiento para azúcares totales para la muestra a evaluar

- Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento, más la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2,5 ml de muestra convenientemente diluida conservados en congelación.
- Para las muestras de azúcares se hacen diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} de cualquiera de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de la cinética en agua destilada, filtrada y estéril para correr densidad óptica.
- Se escoge la dilución a trabajar que La densidad óptica se encuentre entre 0 y 1, si se pasa se debe diluir.
- Entonces ya escogida la dilución a trabajar se lleva cada dilución de cada tiempo de la cinética a esta dilución.
- Una vez hechas las diluciones se procede a tomar de cada una de ellas 2,5 ml de la muestra y se los deposita en un tubo de ensayo (que también debe haber sido lavado previamente con H₂SO₄ al 10% durante toda la noche).
- Posteriormente a esta muestra de 2,5 ml se le deposita 5 ml de la solución de antrona ya preparada anteriormente y se sigue el mismo procedimiento que en la curva estándar.
- El blanco se prepara con 2,5 ml de agua destilada más 5 ml del reactivo de antrona.

Anexo C. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)



Ecuación curva estándar

La condición general para aplicar la ecuación de la recta debe considerar que el coeficiente de determinación sea (R^2) > 0,99.

$$y = mX + b$$

Y = absorbancia

m= pendiente

X = concentración (mg de azúcar/L)

b = ordenada al origen

Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L

Tiempo	Concentración	Absorbancia
0	0	0,106
1	5	0,201
2	10	0,223
3	15	0,342
4	20	0,381
5	25	0,414
6	30	0,555
7	35	0,686
8	40	0,717
9	45	0,762
10	50	0,767

Anexo D. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de las dos cepas

Tiempo (horas)	Medios de cultivo			
	<i>L. casei</i>		<i>L. lactis</i>	
	X	Y	X	Y
0	5,98	0,989	5,95	0,981
2:24	5,186	0,856	4,86	0,813
4:48	4,948	0,823	4,84	0,807
7:12	4,718	0,792	4,77	0,801
9:36	4,274	0,723	4,03	0,693
12:00	3,488	0,613	3,49	0,615
14:24	3,138	0,567	2,18	0,423
16:48	2,872	0,523	2,39	0,453
19:12	2,734	0,501	1,75	0,362
21:36	2,592	0,483	0,77	0,221
24	1,79	0,382	0,13	0,128

X: Concentración de azúcar (mg/L)

Y: absorbancia en el medio MRS

Ecuación:
$$X = \frac{y - b}{m} * Dilución / 1000mg$$

m=0,0144 y b=0,1098

Dilución: Medio MRS 1/1000