

EVALUACIÓN *in vitro* DE *Lactobacillus casei* CON CARACTERÍSTICAS  
PROBIÓTICAS SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis*

FREDY YESID CALPA YAMÁ  
AURA MAGDALENA CHASPUENGAL TULCÁN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
PASTO - COLOMBIA  
2013

EVALUACIÓN *in vitro* DE *Lactobacillus casei* CON CARACTERÍSTICAS  
PROBIÓTICAS SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis*

FREDY YESID CALPA YAMÁ  
AURA MAGDALENA CHASPUENGAL TULCÁN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Zootecnista

Presidente  
HENRY ARMANDO JURADO GÁMEZ  
Zoot. Esp. M.Sc Ph.D

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
PASTO - COLOMBIA  
2013

**“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son  
responsabilidad exclusiva de los autores”.**

**Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable  
Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

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

---

**HÉCTOR FABIO VALENCIA RÍOS. MV. Esp.**  
**Jurado Delegado**

---

**KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO. MV.**  
**Jurado**

**San Juan de Pasto, Septiembre de 2013**

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico al ser más importante, quien es mi principal guía en el camino de la vida, mi Dios; gracias por darme la oportunidad de existir en este mundo, por permitirme llegar hasta este momento traspasando todo tipo de obstáculos, gracias por enseñarme que la vida requiere de grandes esfuerzos y dedicación, y siempre se logran los triunfos con el tiempo y el corazón.

A mi papá y a mi mamá, quienes están allí cuando más los necesito, mis razones de lucha, mi compañía inmortal, son y serán el motivo más grande para seguir adelante sin importar los tropiezos de la vida.

A mis dos hermanos, por estar allí a mi lado, juntos luchando constantemente siempre con las mejores ganas, buenas sonrisas e intentando siempre ser los mejores.

A todos mis compañeros y amigos de la universidad, quienes lograron un lugar especial, a todos aquellos que estuvieron allí en un momento y comparten esta victoria con migo.

A la Universidad de Nariño y en especial a la Facultad de Ciencias Pecuarias por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y formarme profesionalmente.

*Fredy Yesid Calpa Yamá*

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios por darme la oportunidad de vivir, y estar conmigo en cada momento de mi vida; fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, darme la fe y la perseverancia para alcanzar la meta deseada.

A mi madre, una mujer trabajadora, luchadora, quien ha sido ser el mejor ejemplo de superación y amor por el trabajo. Mil gracias madre por apoyarme y brindarme todo tu amor y cariño, todo esto te lo debo a ti.

A mi hermana por su cariño y comprensión durante este tiempo de ausencia sin compartir junto a su lado.

A aquellos familiares quienes me brindaron su confianza, cariño, paciencia y apoyo en cada momento que los necesitaba.

A todos mis amigos y amigas con quienes viví una etapa importante de mi vida, compartiendo buenos y malos momentos de este camino.

A todos mis compañeros de carrera con quienes compartí todos estos años de estudio.

A la Universidad de Nariño y en especial a la Facultad de Ciencias Pecuarias y el programa de Zootecnia por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y formarme profesionalmente.

*Aura Magdalena Chaspuengal Fulcán*

## AGRADECIMIENTOS

Con sincero aprecio y admiración por su colaboración, los autores agradecen a:

HENRY JURADO GÁMEZ, Zootecnista, Esp., M. Sc., Ph.D.

HÉCTOR FABIO VALENCIA RIOS, Médico Veterinario., Esp.

KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO, Médico Veterinario

JAIRO EDMUNDO ESPAÑA CASTILLO, Zootecnista, Esp. Jefe sección Laboratorios y Reactivos

CARLOS ALFREDO BERNAL, Zootecnista, Técnico Laboratorios de Ciencias Pecuarias

NANCY NINFA GALINDEZ SANTANDER, Bacterióloga

IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ, Biólogo, Técnico Laboratorio Biotecnología Microbiana

LUÍS ALFONSO SOLARTE PORTILLA, Zootecnista, Esp. Secretario Académico

Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Zootecnia de la Universidad de Nariño. Laboratorio de Ciencias Pecuarias

Laboratorios Especializados Universidad De Nariño

A todas las personas que de una u otra manera nos orientaron y sirvieron de apoyo en todo momento, sin la ayuda de estas personas no hubiéramos podido lograrlo.

## CONTENIDO

		pág.
INTRODUCCIÓN		
1	DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	26
2	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GENERAL	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MARCO TEÓRICO	30
4.1	LOS PROBIÓTICOS	30
4.2	CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS	31
4.3	GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	31
4.3.1	<i>Lactobacillus casei</i>	32
4.4	USO DE LOS PROBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL	33
4.5	PROBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN CUYÍCOLA	34
4.6	LEGISLACIÓN SANITARIA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS	34
4.7	USO DE ANTIBIÓTICOS Y LA IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN LIMPIA	36
4.8	ENFERMEDADES DEL CUY	37
4.8.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	37
4.8.1.1	Características microbiológicas	38
4.8.1.2	Patogénesis	38



4.8.1.3	Signos clínicos	39
4.8.1.4	Tratamiento	39
5	DISEÑO METODOLÓGICO	41
5.1	LOCALIZACIÓN	41
5.2	MATERIALES Y EQUIPOS	41
5.2.1	Materiales	41
5.2.2	Vidriería	41
5.2.3	Reactivos	42
5.3	RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA Y CONSERVACIÓN DE <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	42
5.3.1	Reconstitución	42
5.3.2	Siembra	42
5.3.3	Conservación	42
5.4	RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, CONSERVACIÓN Y CULTIVO DE <i>Lactobacillus casei</i>	43
5.4.1	Reconstitución	43
5.4.2	Siembra	43
5.4.3	Conservación	43
5.4.4	Cultivo del inóculo	43
5.5	SELECCIÓN DE LA CEPA	45
5.5.1	Poder de inhibición frente a patógenos y comparación frente a antibióticos	45
5.5.1.1	Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	45
5.5.2	Determinación del efecto del sobrenadante (bacteriocinas) de <i>Lactobacillus casei</i> sobre <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	46

5.5.3	Estudio de viabilidad frente a concentración de sales biliares	46
5.5.4	Producción de gas	47
5.5.5	Actividad de catalasa	47
5.5.6	Viabilidad a diferentes concentraciones de pH	47
5.5.7	Resistencia a diferentes niveles de temperatura	48
5.5.8	Cinética de fermentación	48
5.5.8.1	Características de la cinética	48
5.6	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
5.6.1	Modelo matemático para diseño en bloques al azar	51
5.7	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	51
5.7.1	Hipótesis nula ( $H_0$ )	51
5.7.2	Hipótesis alterna ( $H_a$ )	52
5.8	VARIABLES EVALUADAS	52
5.8.1	Conteo de microorganismos (UFC/mL)	52
5.8.2	Determinación de pH	52
5.8.3	Consumo de azúcar	52
5.8.4	Producción de ácido láctico	52
5.8.5	Producción de biomasa	52
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
6.1	SELECCIÓN DE CEPAS PARA LA PRUEBA	53
6.1.1	Descripción de las cepas	53
6.1.1.1	<i>Lactobacillus casei</i>	53

6.1.1.2	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	54
6.2	PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A PATÓGENOS Y COMPARACIÓN FRENTE A ANTIBIÓTICOS	54
6.2.1	Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus casei</i> contra <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	54
6.2.2	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	56
6.2.3	Acción inhibitoria por sobrenadantes	58
6.3	VIABILIDAD FRENTE A CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES Y BILIS BOVINA	60
6.4	PRODUCCIÓN DE GAS Y ACTIVIDAD DE CATALASA	62
6.5	VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH	63
6.6	RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	65
6.7	CINÉTICA DE FERMENTACIÓN	66
6.7.1	Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL)	67
6.7.2	Determinación de pH	69
6.7.3	Determinación de consumo de azúcares totales	71
6.7.4	Determinación de producción de ácido láctico	73
6.7.5	Evaluación de la producción de biomasa	75
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
7.1	CONCLUSIONES	78
7.2	RECOMENDACIONES	80
	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	90

## LISTA DE CUADROS

	<b>pág.</b>
Cuadro 1. Medios de cultivo	48

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Acción inhibitoria de <i>Lactobacillus casei</i> frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	55
Tabla 2. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	57
Tabla 3. Halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante (bacteriocinas)	59
Tabla 4. Viabilidad del medio Pro a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina sigma	61
Tabla 5. Producción de gas y actividad de catalasa	62
Tabla 6. Prueba de viabilidad (UFC/mL) en diferentes tiempos a pH de 3.25, 4.5, 7.6 y 8,2 en el medio Pro	64
Tabla 7. Viabilidad de <i>Lactobacillus casei</i> en el medio Pro a temperaturas de 38°C y 45°C	65
Tabla 8. Valores de Ln UFC/mL obtenidos para <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo	70
Tabla 9. Resultados de la cinética comparativa de la cepa <i>Lactobacillus casei</i> en los medios seleccionados	75
Tabla 10. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de <i>Lactobacillus casei</i> en dos medios de cultivo	76

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. <i>Lactobacillus casei</i> . Izquierda, morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina. Derecha, morfología microscópica	53
Figura 2. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . Izquierda, morfología macroscópica en agar en agar McConkey. Derecha, morfología microscópica	54
Figura 3. Discos de agar MRS impregnados de <i>Lactobacillus casei</i> sobre un cultivo de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	56
Figura 4. Resistencia frente a antibióticos de la cepa probiótica y patógena	58
Figura 5. Discos con volumen definido de bacteriocina sobre la bacteria patógena	60
Figura 6. Izquierda, cepa probiótica en caldo MRS con tubos durham en su interior. Derecha, peróxido de hidrógeno sobre una colonia de <i>L. casei</i>	63
Figura 7. UFC/mL de la cepa probiótica cultivada en los medios MRS y Pro durante 24 horas	66
Figura 8. pH de los medios MRS y Pro y UFC/mL de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas	71
Figura 9. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/mL medio MRS y Pro	73
Figura 10. Acidez (%) de los medios MRS y Pro y UFC/mL de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas	74

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Manejo general de ampollas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	91
Anexo B. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™	92
Anexo C. Evaluación de la acción inhibitoria de <i>Lactobacillus casei</i> sobre <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	92
Anexo D. Discos de antibióticos para antibiograma	93
Anexo E. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer	95
Anexo F. Obtención del sobrenadante (bacteriocinas) de <i>Lactobacillus casei</i>	96
Anexo G. Método modificado por difusión en agar de discos impregnados con el sobrenadante	96
Anexo H. Método de difusión en cilindro plástico	97
Anexo I. Método de difusión en pozos con doble capa modificado	97
Anexo J. Preparación del medio probiótico (Medio Pro)	98
Anexo K. Método de antrona o Dubois	99
Anexo L. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)	101
Anexo M. Lecturas de absorbancia para los medios MRS y Pro	102
Anexo N. Determinación de la acidez por titulación con NaOH 0.1 N.	103
Anexo O. Análisis de varianza para Ln UFC/mL y prueba de significancia de Tukey	104
Anexo P. Análisis de varianza y regresión para pH y Ln UFC/mL en el medio MRS	104
Anexo Q. Análisis de varianza y regresión para pH y Ln UFC/mL	105

Anexo R. Análisis de varianza y regresión para azúcar total y Ln UFC/mL en el medio MRS	105
Anexo S. Análisis de varianza y regresión para azúcar total y Ln UFC/mL en el medio Pro	106
Anexo T. Análisis de varianza y regresión para % ácido láctico y Ln UFC/mL en el medio MRS	106
Anexo U. Análisis de varianza y regresión para % ácido láctico y Ln UFC/mL en el medio Pro	107



## GLOSARIO

**AGENTES PROBIÓTICOS:** monocultivos o mezclas de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúan benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microflora del intestino.

**BACTERICIDA:** que produce la muerte de las bacterias.

**BACTERIOCINA:** moléculas de naturaleza proteica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por las bacterias lácticas que poseen una marcada acción inhibitoria sobre otras cepas bacterianas muy similares.

**BIOMASA:** o masa celular, se puede estimar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo de que se trate.

**CATALASA:** enzima del grupo de las cromo proteínas porfirínicas, cuya molécula contiene ión férrico y que interviene en la descomposición del agua oxigenada. Su acción catalítica es extraordinariamente rápida; existe en los tejidos vegetales y animales y también en algunos géneros de bacterias.

**CEPA:** población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

**COLONIA:** grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

**EFFECTOS ANTIMICROBIANOS:** actividad antagonista contra patógenos por parte de una bacteria láctica, incluyendo la utilización de compuestos antimicrobianos específicos producidos por ésta.

**ESPECIE:** grupo de cepas con muchas propiedades estables en común, que difieren significativamente de otros grupos de cepas.

**FERMENTACIÓN:** proceso liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de donadores como de aceptores de electrones.

**FERMENTACIÓN ACIDO LÁCTICA:** fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

**HUÉSPED:** cuerpo de un organismo que aloja a otro. Se puede considerar, como un micro ambiente que protege y mantiene el crecimiento y la multiplicación del organismo parásito.

**INHIBICIÓN:** fenómeno por el cual el funcionamiento de una actividad biológica disminuye o cesa completamente por la acción de un agente de naturaleza variable denominado inhibidor. La inhibición de contacto es una acción que se manifiesta en los cultivos *in vitro* de células sanas. Las células proliferan y ocupan zonas cada vez mayores del sustrato hasta que sus prolongaciones entran en contacto con las membranas de otras células.

**INÓCULO:** crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el “material iniciador”.

***in vitro*:** locución latina que significa en vidrio. En general, se aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente aislados del conjunto del organismo.

**LINFOIDE:** tejido constituido por una malla de tejido conjuntivo, en cuyo interior se encuentra los linfocitos y sus células antecesoras. Se encuentra muy repartido por el organismo; por sí solo forma los ganglios linfáticos.

**MICROBIOTA:** microorganismos asociados normalmente con un tejido o estructura particular, población microbiana autóctona.

**MORBILIDAD:** incidencia de la enfermedad en una población incluyendo casos mortales y no mortales.

**MORTALIDAD:** incidencia de muertes de una población.

**OXIDASA:** enzima que cataliza la oxidación de un sustrato por eliminación de hidrógeno que se combina con oxígeno molecular.

**PATÓGENO:** se refiere a un organismo o material que produce una enfermedad.

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN:** tiempo necesario para que una población microbiana duplique su número.

**TINCIÓN DE GRAM:** método de tinción usada en bacteriología. Permite diferenciar muchos tipos de bacterias que se tiñen (Gram +) por ejemplo: *Staphylococcus*, de otras que no lo hacen (Gram -) por ejemplo: bacterias tifoideas. La tinción se debe a la presencia de las bacterias de una nucleoproteína.

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC):** número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultiva en medios de cultivos sólidos; indican el número de microorganismos viables en una muestra.

**VÍA DE EMBDEN MEYER-HOFF:** vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de seis carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de tres carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3-fosfato en piruvato.

**VÍA DE DICKENS O PENTOSAS:** otro esquema importante para el catabolismo de la glucosa. Esta vía es motivo de la biosíntesis de los azúcares de cinco carbonos encontrados en los nucleótidos (ATP, NAD +, NADP + coenzima A, FAD), RNA y DNA genera NADPH el cual puede utilizarse en la biosíntesis de ácidos grasos.

## RESUMEN

En la actualidad el uso de probióticos toma importancia al considerarse como el cultivo de uno o más microorganismos vivos, que al ser suministrados en una dieta influyen sobre la microflora ya establecida, produciendo un efecto positivo muy marcado sobre la salud y desarrollo del hospedero; así mismo, su implementación se ha convertido en una alternativa para lograr un mejor aprovechamiento de los alimentos como fuente principal para el crecimiento y desarrollo animal, mejorando la conversión alimenticia, la ganancia de peso, la digestibilidad de los alimentos, la prevención de enfermedades, la reducción de la tasa de mortalidad y evitando así el uso frecuente de antibióticos.

El objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento *in vitro* de la bacteria *Lactobacillus casei* como componente probiótico y bacteria GRAS (Generalmente Reconocida como Segura), sobre el patógeno de *Yersinia pseudotuberculosis*. Para tal hecho se efectuaron varias pruebas como: poder de inhibición frente a patógenos y comparación frente a antibióticos, efecto del sobrenadante (bacteriocinas) de *Lactobacillus casei* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*, viabilidad frente a concentración de sales biliares y pH, producción de gas, actividad de catalasa, resistencia a diferentes niveles de temperatura y cinética de fermentación; en esta última se evaluaron dos sustratos o medios, el primero correspondió a agar MRS (producto comercial) y el segundo a un medio preparado a base de azúcar blanco, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo; en cada uno se evaluó el máximo crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* en producción de biomasa, conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), determinación de pH, consumo de azúcares totales (mg/L) y producción de ácido láctico (%), la prueba se efectuó cada 2:24 horas durante un día; el máximo crecimiento (UFC/mL) para *L. casei* en los medios MRS y Pro, se obtuvo al tiempo 7 (16:48 horas) y tiempo 6 (14:24 horas) de la cinética, es decir, al alcanzar la fase exponencial de crecimiento, con valores de  $7,3 \times 10^8$  UFC/mL y de  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL respectivamente. Se utilizó un diseño de bloques al azar con dos tratamientos los medios MRS y Pro y once bloques correspondientes a los 11 tiempo de evaluación con 2 réplicas por cada uno; el resultado permitió observar que no existe diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) entre los dos medios de cultivo, sin embargo, si existe diferencia para las horas de evaluación ( $P < 0,05$ ). Los valores obtenidos en los dos medios indican ser adecuados para ser utilizados en la preparación de inóculos con propiedades probióticas; ya que el alcanzar poblaciones elevadas permitirá hacer una competencia frente al microorganismo patógeno.

Para la determinación de pH, consumo de azúcar y producción de ácido láctico (%) durante la cinética se aplicó un análisis de regresión donde el incremento en

una unidad de Ln UFC/mL disminuye en -0,0322 el pH, el consumo de azúcar es de -0.4355 mg/L y aumenta en 0,0384 el porcentaje de acidez para el medio comercial MRS, mientras que en medio Pro el pH cae en -0,1553, el consumo de azúcar es -1.228mg/L y la acidez del medio aumenta en 0,0192%.

En la prueba de susceptibilidad antimicrobiana entre antibióticos y la bacteria patógena, los antibióticos que presentaron resistencia fueron cefalotina, cefepima, dicloxacilina, y penicilina, sensibilidad intermedia el antibiótico trimetoprim-sulfametoxazol y sensibilidad ciprofloxacina, enrofloxacina y gentamicina. Para la prueba entre antibióticos y *L. casei* presentó sensibilidad a la mayoría de antibióticos utilizados, mostrando sensibilidad únicamente a la penicilina. Finalmente sobre los ensayos de inhibición la cepa de *Lactobacillus casei* si presenta características inhibitorias frente a *Y. pseudotuberculosis*, al producir halos de inhibición entre 2 y 3 mm; la acción por sobrenadantes mediante técnicas de difusión demostró hacer acción directa sobre el patógeno mediante la formación de halos de inhibición entre 2 y 8 mm. La cepa probiótica demostró un gran potencial al resistir las condiciones simuladas al tracto digestivo de la especie cuyícola, no obstante es recomendable evaluar el inóculo probiótico en fase experimental *in vivo*.

**Palabras claves:** probióticos, *Lactobacillus casei*, *Yersinia pseudotuberculosis*, cuyes, producción animal.

## ABSTRACT

At present the use of probiotics becomes important when considered as the cultivation of one or more live microorganisms which, when supplied on a diet influence the microflora already established, producing a very strong positive effect on the health and development of the host, so , its implementation has become an alternative to make better use of food as a main source for growth and animal development, improved feed conversion, weight gain, digestibility of food, disease prevention, the reduction of the mortality rate and avoiding the frequent use of antibiotics.

The aim of the study was to evaluate the in vitro behavior of the bacterium *Lactobacillus casei* probiotic component and bacteria as GRAS (Generally Recognized As Safe) on the pathogen *Yersinia pseudotuberculosis*. For this fact several tests were conducted as to inhibition versus comparison against pathogens and antibiotic effect of the supernatant (bacteriocins) of *Lactobacillus casei* on *Yersinia pseudotuberculosis*, viability against bile salt concentration and pH, gas production activity catalase, resistance to different levels of temperature and fermentation kinetics, in the latter two substrates were evaluated or means, the first corresponded to MRS agar (commercial product) and the second half prepared with white sugar, soy milk, milk powder and wheat bran; in each evaluated the maximum growth of the strain of *Lactobacillus* in production of biomass, viable microorganisms count Plate (CFU/mL), determination of pH, total sugar consumption (mg/L ) and lactic acid production (%), the test was carried out every hour during a day 2:24; maximum growth (CFU/mL) for *L. casei* in MRS media and Pro, while 7 was obtained (16:48 hours) and 6 time (14:24 hrs) kinetics, ie reaching the exponential phase of growth, with values of  $7.3 \times 10^8$  CFU/mL and  $3.0 \times 10^{11}$  CFU/mL respectively. We used a randomized block design with two treatments and Pro MRS media and eleven blocks corresponding to the 11 evaluation time with 2 replicates each, the result allowed us to observe that there is no significant statistical differences ( $P > 0.05$ ) between the two culture media, however, if there is a difference for the assessment hours ( $P < 0.05$ ). The values obtained in the two media indicate be suitable for use in the preparation of inocula with probiotic properties, and that reaching high populations will allow a competition against the pathogen.

For the determination of pH, sugar consumption and lactic acid production (%) was applied during the kinetics regression analysis where rising Ln unit CFU/mL decreases -0.0322 pH, sugar consumption is -0.4355 mg/L and increases in the percentage of 0.0384 acidity for commercial MRS medium, whereas in medium pH falls Pro -0.1553, sugar intake is -1.228mg/L and acidity the medium increases at 0.0192%.

In testing and antibiotic susceptibility among pathogenic bacteria, antibiotics that were resistant were cephalothin, cefepime, dicloxacillin and penicillin intermediate sensitivity antibiotic trimethoprim-sulfamethoxazole and sensitivity ciprofloxacin, enrofloxacin and gentamicin. To test between antibiotics and *L. casei* was sensitive to most antibiotics used showing sensitivity only to penicillin. Finally on inhibition assays *Lactobacillus casei* strain if you have inhibitory properties against *Y. pseudotuberculosis*, to produce zones of inhibition between 2 and 3 mm, the supernatants action demonstrated by diffusion techniques make direct action on pathogens by inhibition halos between 2 and 8 mm. The probiotic strain showed a great potential to withstand the conditions simulated digestive tract guinea pig species, however it is advisable to evaluate the probiotic inoculum in vivo experimental phase.

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus casei*, *Yersinia pseudotuberculosis*, guinea pigs, animal production.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el ser humano se ha visto en la necesidad de buscar nuevas y mejores alternativas para alcanzar un equilibrio en su forma de vida y bienestar, una de ellas la investigación en biotecnología animal, con el propósito de generar alimentos más saludables, inocuos y de mayor calidad. La biotecnología en este ámbito tiene como finalidad influir directamente sobre el desempeño productivo de los animales, impulsando así, una mejor eficiencia productiva.

La utilización de microorganismos tales como las bacterias dentro de este proceso abarca un renglón de gran importancia, es así, como la microbiota puede ser una alternativa de uso, cuando se controla cuantitativamente y define su funcionalidad. Un ejemplo claro son las bacterias GRAS (generalmente reconocidas como seguras), dentro de ellas las bacterias ácido lácticas (BAL) como el género *Lactobacillus* especialmente especies de interés probiótico.

La especie *L. casei*, se ha convertido en un componente elemental con gran potencial probiótico, gracias a su aplicación como producto alimenticio ayuda a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez puede tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped; su implementación mejora el aprovechamiento de los alimentos para el crecimiento y desarrollo animal, mejorando la conversión alimenticia, la ganancia de peso, la digestibilidad de los alimentos, la prevención de enfermedades, la reducción de la tasa de mortalidad y evitando así el uso frecuente de antibióticos.

En sistemas productivos como el cuyícola condiciones de manejo por parte del productor no siempre son las más óptimas, el principal problema es quizá un bajo control sanitario, generalmente se desconoce el diagnóstico que causa las enfermedades o la muerte de los animales, se desconocen métodos para restablecer la salud de los animales o el costo es muy elevado. Actualmente no se cuenta con una farmacología adecuada para el tratamiento de las diferentes enfermedades en cuyes, por lo cual se formulan medicamentos de otras especies sin conocer su acción sobre estos, y los efectos residuales que puedan ocasionar.

Con el objetivo de determinar el efecto probiótico producido por la bacteria *Lactobacillus casei* sobre una de las enfermedades más frecuentes en cuyes (*Cavia porcellus*) causada por *Yersinia pseudotuberculosis*, se evalúa su comportamiento y acción *in vitro*; para tal efecto, se realizaron análisis de cinéticas de fermentación, determinación de pH, conteo de microorganismos viables en



placa UFC/mL, determinación de azúcar total, evaluación de la producción de biomasa y pruebas de inhibición.

## 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La cuyicultura Nariñense, dentro del renglón productivo, en comparación con otros departamentos se ve muy marcada como una actividad pecuaria importante para la economía de la región. Actualmente, se nota un gran avance en cuanto al incremento de unidades productivas/año, razón por la cual su importancia se debe enmarcar bajo un enfoque socio-cultural, económico e investigativo. Datos estadísticos reportan para el año 2010 una producción total de 2'679.438 animales en Nariño, valor duplicado al referente de años anteriores (Secretaría de Agricultura y Medio Ambiente de Nariño)<sup>1</sup>.

Frente a la demanda mundial de productos de calidad, en cantidad y generados o distribuidos de forma continua, se puede enfocar este tipo de producción; sin embargo, los límites a los cuales se expone radica en la cantidad insuficiente cubierta en el mercado local con una demanda insatisfecha, sumado a esto una baja eficiencia técnica y un deprimido cuidado sanitario con enfermedades que acarrearán grandes pérdidas económicas, patologías con distinto origen como el causado por bacterias indeseables, dentro de ellas la más conocida la *Yersinia pseudotuberculosis*, una bacteria que afecta la mayor parte de la población de cuyes, causando generalmente la muerte de los animales.

Para Correa<sup>2</sup> este tipo de enfermedad se puede relacionar estrechamente con los ectoparásitos y puede causar el 70% de morbilidad y mortalidad de la especie cuyícola. Esta representa grandes pérdidas económicas (37%) con respecto a otras prevalencias de patologías; en los gastos de producción, los antibióticos y sulfas utilizados para su control y el de otras enfermedades de tipo bacteriano pueden constituir el 43% del gasto total y disminuir hasta en un 40% los ingresos del productor (Patiño *et al*)<sup>3</sup>.

Dentro del marco internacional esta enfermedad tiene una amplia distribución presentándose mayormente en animales (aves, cerdos, bovinos, cobayos entre otros) y humanos en los países del norte de Europa, Escandinavia y Japón, aunque, también muestra prevalencia en otros países como Estados Unidos,

---

<sup>1</sup> SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE DE NARIÑO. Consolidado Agropecuario Nariño 2010. San Juan de Pasto. 2010. 113 p.

<sup>2</sup> CORREA, Ramón. Limitantes sanitarias en la producción de cuyes en Colombia alternativas de solución. En: Seminario taller sobre nuevos avances en la cuyicultura latinoamericana. Memorias. Universidad Mayor de San Simón Proyecto Mejocuy. Cochabamba Bolivia. 1997. 57 p.

<sup>3</sup> PATIÑO, Roció *et al*. Caracterización molecular de cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* aisladas de lesiones en *Cavia porcellus* (Cuyes) del departamento de Nariño y su relación epidemiológica con la presentación de *Yersiniosis*. Pasto, Nariño. 2007. p. 66, 74.

Alemania, Holanda y Argentina (Velasco y Lértora citados por Amaya y Calle)<sup>4</sup>. En Colombia de acuerdo a la secretaria de salud de Bogotá se han reportado casos en animales como gatos; y se han conocido casos en humanos por mordeduras de perros (Amaya y Calle)<sup>5</sup>.

---

<sup>4</sup> AMAYA, María y CALLE, Liliana. Avances en la producción de una vacuna viva contra *Yersinia pseudotuberculosis* y evaluación de su efectividad mediante un ensayo de infección experimental en *Cavia porcellus*. Trabajo de Grado Medica Veterinaria. Bogotá D.C: Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria, 2008. p. 8,9.

<sup>5</sup>Ibid., p. 9.

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Una alternativa útil para generar beneficios y controlar enfermedades, es el uso de bacterias del genero *Lactobacillus*. Escobar<sup>6</sup> afirma que la especie *casei*, se ha utilizado ampliamente *in vivo* e *in vitro* demostrando su capacidad probiótica, además, Mennickent y Green<sup>7</sup> aseguran que su aplicación efectiva no solo ayuda a mantener el estado de salud general del organismo, sino, que tiene efectos terapéuticos o preventivos en el huésped; no obstante, bajo su implementación se mejora el crecimiento y desarrollo animal, la conversión alimenticia, la ganancia de peso y la digestibilidad de los alimentos. Con el objetivo de determinar el efecto de la bacteria probiótica *Lactobacillus casei*, sobre la bacteria patógena de *Yersinia pseudotuberculosis* presente en cuyes (*Cavia porcellus*) se evalúa el comportamiento y la acción *in vitro*. Para tal efecto se ha planteado el siguiente problema de investigación:

¿Cuál es el efecto *in vitro* producido por *Lactobacillus casei*, con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*?

---

<sup>6</sup> ESCOBAR, Ana. Comportamiento poblacional de *Lactobacillus casei* en un medio a base de suero de leche. Trabajo de Grado Biólogo. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Programa de Biología, 2008. 75 p.

<sup>7</sup> MENNICKENT, Singrid y GREEN, Karina. Los probióticos y su utilidad terapéutica. En: Ciencia Ahora. Julio-diciembre, 2009, no. 24, p. 32.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vitro* de la acción de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto bactericida *in vitro* de *Lactobacillus casei* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Identificar el efecto biocida del sobrenadante producido por la cepa de *Lactobacillus casei*, sobre la bacteria patógena.
- Establecer las condiciones óptimas de desarrollo de las bacterias ácido-lácticas en la producción de inóculos en el medio seleccionado.
- Evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus casei* en el medio seleccionado comparado con el comercial.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 LOS PROBIÓTICOS

La palabra “probiótico”, procede del Griego “pro bios” (por la vida), y posiblemente fue aplicado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar (Vergio)<sup>8</sup>. Sin embargo, el concepto pionero de probiótico se atribuye a Lilly y Stillwell<sup>9</sup>, quienes lo describieron como aquellas sustancias producto de un microorganismo, que estimulan el crecimiento de otro, a diferencia de los antibióticos. Posteriormente en 1989 Fuller<sup>10</sup> definió a lo probióticos como “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano de su flora intestinal”.

Por otro lado Sumano y Ocampo<sup>11</sup> definen a los probióticos como cultivos de microorganismos vivos (bacterias, hongos y levaduras) que actúan directa o indirectamente sobre bacterias patógenas Gram negativas en el tubo digestivo, actuando especialmente por competición física o de nutrientes, por secreción de bacteriocinas, producción de ácidos o por inmunidad cruzada.

En los últimos 20 años el proceso investigativo del tema referente al uso de probióticos ha presentado un progreso satisfactorio y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos específicos y se ha logrado demostrar las propiedades saludables en relación con su consumo (FAO)<sup>12</sup>.

Con respecto a los microorganismos que son utilizados como probióticos, Mennickent y Green<sup>13</sup>, señalan, que son bacterias que forman colonias en el tracto

---

<sup>8</sup> VERGIO, F. Anti-Und Probiotika. Hipócrates.1954, no.13, p.1103-1108.

<sup>9</sup> LILLY, D. M. y STILWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. En: Science. February, 1965, no. 147, p. 747-748.

<sup>10</sup> FULLER, R. Probiotics in man and animals. En: Journal of Applied Bacteriology. Enero, 1989, vol. 66, 366 p.

<sup>11</sup> SUMANO, Héctor y OCAMPO, Luis. Farmacología Veterinaria. 3 ed. España, Madrid: Mac Graw-Hill, 2006. 384 p. ISBN: 9789701056967.

<sup>12</sup> FAO. Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación 85. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina, 2001. 3 p. ISBN 92-5-305513-8.

<sup>13</sup> MENNICKENT y GREEN. Op. cit., p.36.

gastrointestinal, vaginal y en la boca y entre ellas están los *Lactobacillus*, ciertos cocos Gram positivos, las *Bifidobacterias*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*, además, algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *boulardii*.

## 4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

Nava citado por Aguavil, definen que un microorganismo para ser considerado probiótico debe reunir las siguientes características:

- La seguridad biológica, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal.
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino.
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.
- La sinergia con la microflora endógena normal del intestino
- El efecto barrera, este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.
- La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped<sup>14</sup>.

A demás, Morgensen citado por Jurado<sup>15</sup>, menciona que es importante que los probióticos se caractericen por ser microorganismos preferentemente GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguros)

## 4.3 GÉNERO *Lactobacillus*

“Este género presenta normalmente morfología bacilar que puede variar desde bacilos largos y esbeltos a bacilos cortos y curvados, la mayoría son homofermentativos, pero algunos son heterofermentativos. Son habituales en los productos derivados de la leche y algunas cepas se emplean para la preparación

---

<sup>14</sup> AGUAVIL, Juan. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler. Proyecto de Investigación Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida, 2012. 19 p.

<sup>15</sup> JURADO, Henry. 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. Valle del Cauca: Universidad del Valle. Escuela de ingeniería de alimentos, 2009. 5 p.

de leches fermentadas” (Madigan *et al*<sup>16</sup>). “Crecen de forma óptima en condiciones de ligera acidez, a un pH de entre 4.5 y 6,4. Este género se encuentra sobre las superficies de las plantas y en productos lácteos, carne, aguas residuales, cerveza, frutas y muchos otros materiales. Estos forman parte de la flora normal del cuerpo humano, de la boca, el tracto digestivo y la vagina. En general no son patógenos” (Willey, Sherwood, Woolverton)<sup>17</sup>.

Así mismo, los *Lactobacillus* son considerados excelentes probióticos por ser de caracteres no patogénicos, inoocuos, estables y viables, por resistir al cambio del pH y tener la capacidad de transformar numerosos carbohidratos (Zamudio y Zavaleta)<sup>18</sup>.

**4.3.1 *Lactobacillus casei*.** Collins *et al.*<sup>19</sup>, alude que *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. “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” (Santacruz)<sup>20</sup>. 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.

---

<sup>16</sup>MADIGAN, Michael; MARTINKO, John; DUNLAP, Paul y CLARK, David. Brock. Biología de los microorganismos. 12 ed. Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2009. 493 p. ISBN: 978-84-7829-097-0.

<sup>17</sup>WILLEY, Joanne; SHERWOOD, Linda y WOOLVERTON, Christopher. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7 ed. Aravaca, Madrid: McGraw Hill-Interamericana de España, S.A.V., 2008. 582 p. ISBN: 978-0-07-299291-5.

<sup>18</sup> ZAMUDIO, Karín, y ZAVALA, Amparo. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. En: Ciencia e investigación. 2003, vol.6, no. 1, 30 p.

<sup>19</sup> COLLINS, Matthew; PHILLIPS, Brian y ZANONI, Paolo. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., *subsp. paracasei* and *subsp. tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. En: International Journal of Sytematic Bacteriology. Abril, 1989, vol. 39, no. 2, 105 p.

<sup>20</sup> SANTACRUZ, Yolanda. Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana. Tesis de Maestría en Biotecnología. Cholula-Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias, Departamento de Química y Biología, 2004. 14 p.



Gaon *et al.*, citado por Rúaless y Vallejo<sup>21</sup>, afirma que:

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. 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 que *Lactobacillus casei* sea un candidato ideal para considerarlo como probiótico.

#### 4.4 USO DE LOS PROBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

Varios son los trabajos e investigaciones que se han realizado con respecto al uso de los probióticos en la producción animal. Es así como “su uso se ha recomendado en casos de síndrome de inflamación intestinal, infecciones intestinales bacterianas y virales entre otras” (Nava)<sup>22</sup>, no obstante, Guevara<sup>23</sup> describe que su utilización como suplemento probiótico se emplea para tratamientos o prevención de varias condiciones de estrés y otras enfermedades de diversa etiología

Dilworth y Day 1978; Miles *et al.*, 1981; Mordeti, 1986 citados por Rosmini *et al.*<sup>24</sup>, indican que en la producción animal, su importancia se basa en los beneficios que puede generar en los animales al mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y actuar como promotores de crecimiento. Así mismo, Macouzet<sup>25</sup>, señala dentro de la producción pecuaria, tres son las ventajas que se podrían generar con el uso de los probióticos, como son: la seguridad sanitaria, al disminuir microorganismos patógenos en las personas tales como la *Salmonella* sp. y *E. coli*; la competitividad de las empresas al ofrecer un producto que permite mantener en buen estado a los animales y como último la diferenciación, permitiendo a las empresas cambien

---

<sup>21</sup> RUALES, Bertha, y VALLEJO, Vladimir. Producción de Biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* empleando diferentes tipos de sustratos. Tesis de Grado Ingeniería Agroindustrial. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial, 2007. 35 p.

<sup>22</sup> NAVA, GM y DÁVILA, V. Nuevas perspectivas en la selección y evaluación de probióticos. En: Revista Chilena de Nutrición, Santiago. Noviembre, 2004, vol. 31, no. 1, 184 p.

<sup>23</sup> GUEVARA, Jorge. Probióticos en Nutrición Animal. Revisión bibliográfica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, 2011. 4 p.

<sup>24</sup> ROSMINI, M.; SEQUEIRA, G.; GUERRERO, I.; MARTI, L.; DALLA, R.; FRIZOO, L. y BONAZZA, J.C. Production de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. En: Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2004, vol.3, no 002, 182 p.

<sup>25</sup> MACOUZET, Martín. Prebióticos, componente clave de la producción animal moderna. [online]. [Citado 19 Octubre 2012] Disponible en:< <http://www.invdes.com.mx/suplemento-noticias/1049-prebioticos-componente-clave-de-la-producción-animal-moderna?format=pdf>>

a un sistema de producción orgánico y puedan ofrecer productos buenos para la salud.

#### 4.5 PROBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN CUYÍCOLA

En aspectos comerciales y de investigación, se encuentra una variedad de probióticos que son utilizados con fines terapéuticos y alimenticios para la especie *Cavia porcellus*.

Probióticos como: Enterodex (Videx Animal Health Ltd), Live natural yogurt, contiene *Lactobacillus acidophilus*, Avipro (VetArkHealth), contiene *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces* y electrolitos y Vetrumex, son recomendados para ser suministrados al mismo tiempo con los antibióticos con el fin de ayudar a proteger el intestino de los efectos dañinos que ocurren cuando se destruye la flora bacteriana intestinal (Richardson)<sup>26</sup>.

De igual manera *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, han sido utilizados en estudios de Molina<sup>27</sup> y Farinango<sup>28</sup>, a fin de evaluar su efectividad sobre los parámetros productivos de los cuyes en diferentes fases de crecimiento y desarrollo.

#### 4.6 LEGISLACIÓN SANITARIA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

En nuestro país se recalca el aspecto sanitario e inocuidad de los alimentos, como un tema de gran importancia enfocado al bienestar y seguridad de la población colombiana, de aquí que existan entidades facultadas, como el Ministerio de Protección Social encargado de regular aspectos sanitarios de calidad e inocuidad de los alimentos, a través del Instituto Nacional de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) y el Instituto Nacional de Salud (INS), El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) operando sobre la

---

<sup>26</sup> RICHARDSON, V.C.G. Diseases of domestic guinea pigs. 2da ed. USA: Blackwell Science Ltda., 2000. 109 p. ISBN 0-632-05209-0.

<sup>27</sup> MOLINA, Mónica. Efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde. Trabajo de grado Ingeniería Agropecuaria. Sangolqui-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida, 2012. 139 p.

<sup>28</sup> FARINANGO, Héctor. Evaluar la incidencia de la levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) en la fase de recría y engorde del cuy (*Cavia porcellus*). Trabajo de grado Ingeniero Agropecuario. Ibarra-Ecuador: Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Escuela de Ingeniería Agropecuaria, 2010. 9 p.

protección y regulación sanitaria agropecuaria<sup>29</sup>; para lo cual, ha implementado las Buenas Prácticas Agrícolas, las Buenas Prácticas Pecuarias o ganaderas, las Buenas prácticas Veterinarias, las Buenas Prácticas en la Alimentación Animal y las Buenas Prácticas en la utilización de Medicamentos Veterinarios, entre otras.

El concepto de inocuidad es entendido como un atributo de calidad en la cual un alimento no constituye un riesgo para la salud, esto implica la utilización racional y prudente de insumos agropecuario, como un producto natural o sintético, biotecnológico o químico, utilizado para promover la producción agropecuaria, así como para el diagnóstico, prevención, control, erradicación y tratamiento de las enfermedades, plagas, malezas y otros agentes nocivos que afecten a las especies animales y vegetales o a sus productos (Decreto 1840 de 1994<sup>30</sup> y Resolución 302 de 2007<sup>31</sup>), en la producción primaria obteniendo alimentos de origen animal con límites máximos de residuos químicos (LMR) aceptados por organismos internacionales. Dentro del concepto sanitario el uso de medicamentos como antibióticos, antiparasitarios, hormonas, anabólicos, etc., deberán ser productos distribuidos y vendidos en almacenes veterinarios debidamente autorizados por el ICA, de conformidad con lo establecido en la resolución 1023 de 1997, sobre el registro de almacenes que comercializan medicamentos veterinarios y plaguicidas agropecuarios (ICA)<sup>32</sup>.

De igual manera, el ICA, como entidad responsable de la calidad de los alimentos de origen pecuario producidos en Colombia, en 2001 crea el “Grupo de Inocuidad de las Cadenas Agroalimentarias Pecuarias” (GICAP), que junto con el Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios (LANIP), también dependencia del ICA, vienen adelantando acciones destinadas a fomentar la inocuidad de los alimentos a través del control de residuos de fármacos utilizados en animales productores (Lozano y Arias)<sup>33</sup>.

---

<sup>29</sup> ORTIZ, Ana y MARTÍNEZ, Martha. Inocuidad Alimentaria: Panorama en Colombia. En: Conexión Agropecuaria JDC. Julio-Diciembre, 2011, vol. 1, no. 1, 40 p.

<sup>30</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Decreto 1840 (3, agosto, 1994). Por el cual se reglamenta el artículo 65 de la Ley 101 de 1993. Diario oficial. Bogotá, D.C.: El Ministerio, 1994. no. 41.473. 11 p.

<sup>31</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Resolución 302 (10, diciembre, 2007). Por la cual se establece la política de precios en materia de insumos agropecuarios. Bogotá, D.C.: El Ministerio, 2007. 5 p.

<sup>32</sup> INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Buenas prácticas en el uso de los medicamentos veterinarios y la inocuidad de los alimentos. Bogotá, 2007. 10 p.

<sup>33</sup> LOZANO; María y ARIAS, Diana; Residuos de Fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. En: Revista colombiana de ciencias pecuarias. Febrero, 2008, vol. 21, 130 p.

## 4.7 USO DE ANTIBIÓTICOS Y LA IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN LIMPIA

Con respecto al uso de antibióticos Swaffham<sup>34</sup> menciona que “los antibióticos se han venido usando desde hace más de cincuenta años. Son los medicamentos maravillosos que han venido a transformar la práctica de la medicina humana y veterinaria en todo el mundo” a pesar de ello, el uso indiscriminado de estos, ha incrementado la resistencia en un gran número de especies de bacterias patógenas y no patógenas, lo cual se ha traducido en graves problemas para los consumidores que consumen una gran cantidad de alimentos tanto agrícolas como pecuarios. Ante esta problemática, Castro y Rodríguez<sup>35</sup> sugieren que una solución para evitar el uso indiscriminado de antibióticos es presentar nuevas alternativas como es el uso de probióticos y prebióticos, para obtener una producción más limpia, que evite perjudicar la salud humana y la de los animales.

Es así que para lograr obtenerse una producción más limpia, son varias las entidades u organizaciones tanto de orden internacional y nacional que han desarrollado ciertas normas jurídicas con el fin de tender a producir alimentos cada vez más sanos y seguros para el consumidor final, y que a la vez no contaminen el medio ambiente.

De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la producción más limpia es:

La aplicación continúa de una estrategia ambiental preventiva integrada a procesos, productos y servicios para incrementar la eficiencia total y reducir los riesgos para el ser humano y el medio ambiente. Este concepto puede ser aplicado a diferentes procesos industriales, a productos en sí mismos y a varios servicios ofrecidos a la sociedad. En productos, la producción más limpia ayuda a reducir el impacto ambiental, en la salud y en la seguridad de los productos durante todo su ciclo de vida<sup>36</sup>.

---

<sup>34</sup> SWAFFHAM, Soulsby de, Lord. El uso de antibióticos en producción animal y la resistencia antimicrobiana. En: Reunión Interamericana en Salud Animal a Nivel Ministerial (11: 13-15, abril: Washington D.C.). Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 1999. 4 p.

<sup>35</sup> CASTRO, Marilce y RODRÍGUEZ, Fernando. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción Animal. En: Revista Corpoica. Enero-Junio, 2005, vol. 6 no.1, p. 2,3.

<sup>36</sup> PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE (PNUMA). Manual de Producción más Limpia: Un paquete de recursos de capacitación. [online]. [citado 23 octubre 2012]. Disponible en: <[http://www.pnuma.org/industria/produccionlimpia\\_manual.php](http://www.pnuma.org/industria/produccionlimpia_manual.php)>

Por otra parte en las Buenas Prácticas Agrícolas<sup>37</sup>, se considera que para aprovechar los diversos productos que se originen de la actividad agropecuaria como es las carnes o lácteos, es importante producir o procesar estos productos cumpliendo con las condiciones de una producción limpia.

#### 4.8 ENFERMEDADES DEL CUY

De acuerdo a Correa<sup>38</sup>, las enfermedades de los cuyes, se clasifican en:

1. Enfermedades infecciosas bacterianas
2. Enfermedades parasitarias
3. Enfermedades carenciales
4. Enfermedades orgánicas

Para el caso de las enfermedades infecciosas bacterianas, el mismo autor distingue las respectivas enfermedades y su agente etiológico, de la siguiente manera:

- Yersinia (*Yersinia pseudotuberculosis*)
- Salmonelosis (*S. thipinurium*, *S. enteriditis*)
- Colibacilosis (*Escherichia coli*)
- Neumonía (*Pasterella multocida*, *Bordetella brochiseptica*, *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*)
- Piobacilosis (*Corynebacterium piogenes*)
- Abscesos Subcutáneos (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*)

##### 4.8.1 *Yersinia pseudotuberculosis*. Patiño et al., señala que:

“*Yersinia pseudotuberculosis* es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza siendo posible aislarlo a partir de muestras de polvo, suelo, agua y leche. Infecciones naturales pueden sucederse en el hombre, aves, roedores, conejos, cuyes, gatos, primates no humanos, ovejas, cabras, cerdos y

---

<sup>37</sup> COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Agricultura limpia. Buenas Prácticas Agrícolas. 4 p.

<sup>38</sup> CORREA, Ramón. Sanidad en cuyes. En: Memorias del V curso y V congreso Latinoamericano de Cuyicultura y Mesa Redonda sobre Cuyicultura Periurbana. Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela. 1999. 92 p.

vacas. *Y. pseudotuberculosis* causa infección zoonótica y las especies animales domésticas o salvajes se convierten comúnmente en reservorios”<sup>39</sup>.

Esta enfermedad es conocida como “achaque o pepa”, que puede atacar a los cuyes en cualquier edad, llegando a afectar a todos los animales, ocasionando grandes pérdidas económicas. Actualmente ocasiona entre el 10 y 64% de mortalidad en los cuyes; presentándose un 22% de prevalencia en 16 municipios del departamento de Nariño (Patiño citado por Caycedo *et al*)<sup>40</sup>.

**4.8.1.1 Características microbiológicas.** Siegrist<sup>41</sup>, indica que la yersinia es un cocobacilo, Gram negativo y anaerobio facultativo. Tiene un metabolismo fermentativo, es oxidasa negativa, manitol positivo, glucosa positiva y lactosa negativa. De igual manera es ureasa positiva, ramnosa positiva y esculina positiva y negativa a ornitina descarboxilasa e indol. Es un organismo psicrófilo, puede sobrevivir y proliferar a bajas temperaturas desde los 0 a 4°C (por ejemplo, en alimentos en el refrigerador); móvil entre los 22-26 °C, e inmóvil 37 °C; “tiene la capacidad de crecer en rangos de pH de 4 a 10, siendo un óptimo de 7.6, su tolerancia depende de la temperatura ambiente, la composición del medio y la fase de crecimiento de la bacteria y puede diferenciarse de otras especies sobre la base de la prueba de Voges-Proskauer y su capacidad de fermentar el sorbitol, ramnosa, sacarosa y melibiosa” (Jiménez)<sup>42</sup>.

**4.8.1.2 Patogénesis.** “La infección se adquiere por contacto con heces de aves salvajes y roedores, o por ingestión de vegetales contaminados; otro factor negativo es el hacinamiento predisponiendo al desarrollo de la enfermedad. La infección en explotaciones de cobayos se produce por contaminación fecal de la comida a partir de roedores salvajes” (Ernest *et al.*, citado por Amaya y Calle)<sup>43</sup>. Correa<sup>44</sup>, afirma que de un periodo de incubación de 48 a 72 horas, y de acuerdo la vía de infección, la bacteria llega a la sangre, donde produce una septicemia, que presenta hemocultivos positivos. Seguidamente se localiza en los órganos linfoides (ganglios, bazo y placas de peyer), hígado, pulmones y útero gestante,

---

<sup>39</sup> PATIÑO *et al.* Op. cit., p. 5.

<sup>40</sup> CAYCEDO, A.; ZAMORA, A.; ECHEVERRY, S.; ENRÍQUEZ, R.; ORTEGA, E.; BURGOS, M. y CAYCEDO, C. Producción Sostenible de Cuyes. Alternativa Económica para la conservación de Cuencas Hidrográficas en Nariño. Pasto, Colombia, 2011. 160 p. ISBN 978-958-8609-00-3.

<sup>41</sup> SIEGRIST, Jvo. Genus *Yersinia*. Detection, identification, differentiation and cultivation of *Yersinia* species. *En: Microbiology Focus*. 2010, vol. 23, p.5, 6.

<sup>42</sup> JIMÉNEZ, Sabrina. Identificación de proteínas de secreción con capacidad inmunogénica de aislamientos de *Yersinia pseudotuberculosis* provenientes de plántulas cuyícolas del departamento de Nariño. Trabajo de Magíster Ciencias Biológicas, énfasis Microbiología Médica. Bogotá D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2011. 11 p.

<sup>43</sup> AMAYA y CALLE. Op. cit., p. 10.

<sup>44</sup> CORREA, Sanidad en cuyes, Op. cit., p. 93.

produciendo lesiones inflamatorias crónicas de tipo granulomatoso, similares a los de la tuberculosis y comienza la eliminación del germen por la saliva, orina y materia fecal. La muerte de los animales puede ocurrir entre los 20 y 30 días y dependiendo de la patogenicidad de la cepa y del tropismo tisular puede llegar a ser letal para la casi totalidad de la producción.

**4.8.1.3 Signos clínicos.** La enfermedad se manifiesta por: aparición súbita, marcada inapetencia, depresión, pelo erizado y sin brillo, lomo arqueado, deshidratación, pérdida rápida de peso, secreciones oculares, disnea espiratoria, desplazamientos de la pared abdominal, secreciones nasales mucopurulentas, aborto espontáneo, signos nerviosos y lesiones en ganglios mesentéricos (Correa)<sup>45</sup>.

**4.8.1.4 Tratamiento.** Según la Organización Mundial de la Salud, la yersiniosis se puede tratar con antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina y clortrimasol; no obstante, frecuentemente se revela la sensibilidad de esta bacteria frente a tratamientos con ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglicocidos, resultando mejores bactericidas *in vivo* las fluoroquinolonas, gentamicina y doxicilina (Lemaitre *et al.*, 1991; Zonneveld *et al.*, 2002, citados por Patiño *et al*)<sup>46</sup>.

Otros medicamentos recomendados según la FAO<sup>47</sup>, son: penicilina (30 000 UI) y dehidroestreptomina (1,25 mg/kg de peso), dos veces al día, por vía oral o intramuscular. Productos como tetraciclinas u oxitetraciclina pueden ser utilizados en cantidades de 10 y 5 mg/Kg de peso vivo, respectivamente, sin embargo, su uso total se restringe debido a reportes de casos de toxicidad en cuyes (Drug\_Dosage)<sup>48</sup>.

Resaltando el uso de medicamentos veterinarios en Colombia, no existe una ley aprobada que dicte medicamentos específicos para ser utilizados exclusivamente en la especie cuyícola. Hasta el momento se destacan algunos estudios desarrollados por entidades como la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, junto con algunas universidades, con respecto a caracterización, detección de la yersinia, así como en la identificación de proteínas con capacidad inmunogénica y estudios en la producción de una vacuna viva. En

---

<sup>45</sup>Ibíd., p. 93.

<sup>46</sup> PATIÑO *et al.* Op. cit., p. 6.

<sup>47</sup> FAO. Sanidad en Cuyes. [online]. [Citado 19 Octubre 2012] Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/W6562S/w6562s07.htm>>

<sup>48</sup> Drug\_Dosage. [online]. [Citado 04 Febrero 2013] Disponible en: <<http://www.avicenna.ac.ir/Documents/Research/En/Lab/Drug-Dosage.pdf>>

el caso del departamento de Nariño, se han realizado algunas investigaciones sobre los medicamentos utilizados comercialmente para el tratamiento de la yersinia, encontrando de acuerdo al estudio realizado por Revelo y Tobar<sup>49</sup>, que los principales medicamentos recomendados por los almacenes agropecuarios son la enrofloxacin en dosis de 1.2-40 mg en animales adultos, 0.8-40 mg en animales jóvenes y el trimetoprim-sulfadiazina en dosis de 1.44-120 mg en animales adultos y 0.96-72 mg en animales jóvenes. Sin embargo, los mismos autores analizan que la farmacología sugerida incurre en sub-dosificación y sobredosificación al tomar como referencia a autores como Mark quien reporta que la dosis a utilizar de enrofloxacin en los cobayos es de 5-10 mg/kg, señalando el mismo autor la ausencia de estudios farmacocinéticos realizados en roedores; y de 15 a 30 mg/kg para trimetoprim-sulfadiazina de acuerdo a Tynes.

Otros autores como Sumano y Ocampo<sup>50</sup>, aseguran que la enrofloxacin se debe usar en dosis de 5mg/kg vía en conejos y mencionan que la DL<sub>50</sub> (Dosis letal del medicamento capaz de causar la muerte al 50% en los animales sometidos a experimentación) en ratas y ratones por VO (Vía Oral) es >50 g/kg. Para el caso de las sulfonamidas combinadas con otros fármacos como la sulfadiazina-trimetoprim, no presentan ninguna recomendación de uso en roedores o lagomorfos.

---

<sup>49</sup> REVELO, Alex y TOBAR, Mario. Estudio de los principales medicamentos utilizados en las explotaciones cuyícolas del municipio de Pasto. Tesis de grado Médico Veterinario. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2009. p. 30, 40, 47.

<sup>50</sup> SUMANO y OCAMPO. Op. cit., p. 163, 321.



## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Pecuarias de Zootecnia sección Microbiología en la Universidad de Nariño, Torobajo ubicado en el municipio de Pasto, departamento de Nariño.

### 5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

#### 5.2.1 Materiales

- Juego de 8 Antibióticos con 50 sensidiscos cada uno
- Cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580
- Cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 334®
- Agar MRS
- Agar Mueller Hinton
- Caldo BHI (Caldo Infusión Cerebro corazón)
- Caldo MRS
- Agar nutritivo
- Agar McConkey
- Agua peptonada buferada
- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa de luz
- Incubadora
- Microscopio, agitador, vortex, pHmetro
- Tubos eppendorf
- Microcentrifuga refrigerada
- Cámara de flujo laminar
- Espectofotometro
- Micropipetas volumen variable de 10-100µL y 100-1000µL

#### 5.2.2 Vidriería

- Erlenmeyers de 250 ml, 500ml, 1000 ml
- Beakers de 50ml, 100ml y 300ml
- Pipetas volumétricas de 1ml, 5ml, 10ml
- Cajas Petri desechables
- Balones aforados de 250 ml

- Tubos de ensayo tapa rosca
- perlas de vidrio
- Probetas de 100 ml y 500ml
- Tubos Durham

### 5.2.3 Reactivos

- Peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y 3,6%
- Sales biliares y bilis bovina sigma
- Salvado de trigo (molido finamente)
- Leche de soya natural
- Glucosa anhidra
- Azul de anilina
- Leche en polvo
- Azúcar blanco refinado
- Reactivos tinción de Gram
- Fenolftaleína
- Antrona
- Hidróxido de sodio NaOH 0,2 N
- Ácido sulfúrico 95-97%

## 5.3 RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA Y CONSERVACIÓN DE *Yersinia pseudotuberculosis*.

**5.3.1 Reconstitución.** Para el proceso de reconstitución se verificó las indicaciones de la casa comercial, teniendo en cuenta método y medio de siembra e incubación (Anexo A).

**5.3.2 Siembra.** Trascorridas 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento y desarrollo de esta y se pasó a realizar el repique en cajas con agar McConkey, con asa de argolla por el método de estrías y se incubó por 24 horas de 35 a 37°C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar tipo II, junto a mechero para evitar contaminación del medio. Al día siguiente, se revisó nuevamente su crecimiento en el agar seleccionado y para constatar su morfología macroscópica como microscópicamente y mediante coloración de Gram se confirmó su pureza. Posteriormente se repicó la cepa en caldo BHI para conservarla activa.

**5.3.3 Conservación.** La conservación de la cepa probiótica posterior a la reconstitución se realizó cada cinco a ocho días, en medio sólido en cajas con

agar MacConkey en medio líquido en tubos con caldo BHI, estos preservados se incubaron por 20-24 horas a 35-37°C y se almacenaron refrigerados en nevera a 4°C. Así mismo cada vez que se realizó un nuevo repique o siembra se confirma su pureza mediante coloración de Gram.

#### **5.4 RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, CONSERVACIÓN Y CULTIVO DE *Lactobacillus casei*.**

**5.4.1 Reconstitución.** Inicialmente la reconstitución de la cepa se realizó de acuerdo a las indicaciones del laboratorio en un medio no selectivo con el fin de optimizar su crecimiento y recuperación.

Para esto se utilizó una agar nutritivo, el cual se lo preparó de acuerdo a las instrucciones indicadas. 24 horas después se procedió a la reconstitución de la cepa de acuerdo a las instrucciones para Microorganismos KWIK-STIK™, (Anexo B).

**5.4.2 Siembra** Trascorridas las 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento y desarrollo de esta y se pasó a realizar el repique en cajas con agar MRS comercial, con asa de argolla por el método de estrías y se incubó por 24 horas de 35 a 37°C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar tipo II, junto a mechero para evitar contaminación del medio.

Al día siguiente, se revisó nuevamente su crecimiento en el agar MRS y para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópicamente y mediante coloración de Gram se confirmó su pureza.

**5.4.3 Conservación.** La conservación de la cepa probiótica posterior a la reconstitución se realizó cada cinco días en medio sólido en cajas con agar MRS y cada ochos días en medio líquido en tubos con caldo MRS, estos preservados se incubaron por 20-24 horas a 35-37°C y se almacenaron refrigerados en nevera a 4°C. Así mismo, cada vez que se realizó un nuevo repique o siembra se confirmó su pureza mediante coloración de Gram

**5.4.3 Cultivo del inóculo.** Se inoculó una asada de la cepa en un erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS comercial estéril. Se incubó por 24 horas a 35° a 37°C. Nuevamente se realizó un repique de 4 ml de está en caldo a otros 40 ml de caldo MRS comercial y se incubó en las condiciones antes mencionadas.

Según Crueger y Crueger<sup>51</sup>, el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10% v/v, para iniciar la fermentación. Para esto, se prepararon 90 ml de caldo MRS estéril y se adicionaron 10 ml del inóculo probiótico aplicando la regla. Después de este tiempo se calculó el número de bacterias por ml.

Del caldo MRS comercial con el inóculo se tomó 1 ml y se hizo lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm, cuando se presentó mayor población de la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad de acuerdo a Guerrero citado por Montes *et al*<sup>52</sup>.

$M_1$ = población o densidad celular que se debe ajustar

$M_2$ = 0,125 densidad óptica equivalente a  $1,50 \times 10^8$  bact/ml. Densidad utilizada primera fermentación

$V_1$ = 1 ml volumen proveniente del inóculo total (10/90)

$X_1$ = cantidad que contiene  $M_2$

$V_2$ = lo que se agrega a 1 ml para ajustar a  $1,50 \times 10^8$  bact/ml.

$V_3$ = 100 ml cantidad total del inóculo

$X_2$ = cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a  $V_3$  para ajustar la población el valor de  $M_2$

Encontramos entonces  $X_1$

$M_1$  ----- $M_2$

$M_2$ -----  $X_1$

$$X_1 = \left( \frac{M_2 * V_1}{M_1} \right) \quad X_1 = \left( \frac{(0,125) * 1ml}{0,800} \right) = 0,15625$$

<sup>51</sup>CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acirbia, 1993, 413 p. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

<sup>52</sup> MONTES, Andrea; SANTACRUZ, Ayda. y SAÑUDO, Jessie. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias matemáticas y naturales, 2003. 85 p.

Encontramos entonces  $V_2$

$$V_2 = V_1 - X_1 \quad V_2 = 1 \text{ ml} - 0.15625 = 0,843475 \text{ ml}$$

Finalmente se obtiene el valor de  $X_2$

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

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

$$X_2 = \left( \frac{V_3 * V_2}{V_1} \right) \quad X_2 = \left( \frac{100 \text{ ml} * 0,843475 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \right) = 84,3475 \text{ ml}$$

El valor de  $X_2$  (84,3475 ml) es la cantidad que se debe agregar a 100 ml para ajustar la población de  $1,50 \times 10^8$  bact/ml.

## 5.5 SELECCIÓN DE LA CEPA

### 5.5.1 Poder de inhibición frente a patógenos y comparación frente a antibióticos.

**5.5.1.1 Ensayos de inhibición *in vitro*.** La inhibición del crecimiento de la bacteria patógena se realizó mediante una adaptación del método de Tagg y McGiven<sup>53</sup>, con discos de agar impregnados de *Lactobacillus casei*, sobre *Yersinia pseudotuberculosis* (Anexo C). La inhibición se determinó por el halo producido alrededor del disco de agar impregnado de la bacteria láctica después de 24 horas de crecimiento en el medio donde creció la bacteria patógena. El tamaño del halo se determinó teniendo en cuenta la distancia desde el borde del disco de agar de la bacteria láctica seleccionada hasta el extremo del halo formado por la inhibición de la bacteria patógena. El tamaño crítico del halo para determinar si hay inhibición es igual o superior a 2 mm. La prueba se efectuó con la bacteria de referencia: *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580. Igualmente se evaluaron ensayos de inhibición frente a los antibióticos: Cefalotina Kf 30 µg, Cefepima Fep 30 µg, Ciprofloxacina Cip 5 µg, Dicloxacilina Dcx 1 µg, Enrofloxacin Enr 5 µg, Gentamicina Cn 10 µg, Penicilina G P 10 IU y Trimetoprim-sulfametoxazol COT 25 µg, con el propósito de contrastar la acción sobre las bacterias (Anexo D), mediante un test de susceptibilidad según el método de Kirby Bauer (Anexo E),

---

<sup>53</sup>TAGG, J. y MCGIVEN, A. Assay system for Bacteriocins. En: Applied Microbiol. Mayo, 1971, vol. 21, no. 5, 943 p.

con el fin de comparar la acción inhibitoria de los antibióticos comerciales sobre la bacteria láctica y la bacteria patógena.

**5.5.2 Determinación del efecto del sobrenadante (bacteriocinas) de *Lactobacillus casei* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.** Para realizar la respectiva prueba primero se procedió a obtener el sobrenadante (posiblemente bacteriocinas) (Anexo F) ajustándolo a diferentes condiciones: sin filtrar, filtrado, neutralizado a pH 6 y calentado a 80°C por 10 minutos con el fin de prevenir la acción de enzimas proteolíticas, de acuerdo a lo recomendado por Zapata *et al*<sup>54</sup>. Posterior a la obtención se pasó a realizar la determinación de la acción inhibitoria, donde se evaluaron diferentes cantidades de 50µl, 75 µl y 100 µl, frente a la bacteria patógena por medio de tres métodos a saber: el primero por el método modificado de difusión en agar con discos impregnados con el sobrenadante (Anexo G), el segundo por el método de difusión en cilindro plástico (Anexo H) y el tercero por el método de difusión en pozos con doble capa modificado (Anexo I).

**5.5.3 Estudio de viabilidad frente a concentración de sales biliares.** Para estudiar la viabilidad de las cepa seleccionada frente a diferentes concentraciones de sales biliares se empleó el método descrito por Cai *et al*<sup>55</sup> y Cai *et al*<sup>56</sup>. De la misma manera se estudiaron tres concentraciones de bilis bovina sigma. Inicialmente la cepa se cultivó en caldo MRS por 24 horas, posteriormente se efectuó la prueba de viabilidad, sembrando la bacteria láctica en medio Pro, probando concentraciones de 3%, 4% y 5% de sales biliares, y 0.5%, 1% y 2% de bilis bovina (Sigma) p/v, enseguida se cultivó en agar MRS con azul de anilina por 48 horas a 32°C. La variable estudiada consistió en determinar esta viabilidad de la bacteria láctica seleccionada expresada en concentraciones iguales o mayores de 10<sup>9</sup> UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro). La presencia de bilis, sales biliares y su actividad enzimática inhibe un buen porcentaje de microorganismos durante el paso por el tracto digestivo.

“Con la verificación de la viabilidad de los microorganismos después de ser sometidos a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina (Sigma),

---

<sup>54</sup> ZAPATA, Sandra; MUÑOZ, Juliana; RUIZ, Orlando; MONTOYA, Olga y GUTIÉRREZ, Pablo. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. En: VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Enero, 2009, vol. 16, no. 1. 77 p.

<sup>55</sup> CAI, Yimin; BENNO, Yoshimi; NAKASE, Tasakashi and OH, Tae-Kwang. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. En: Journal Genealogy Applied Microbiology. 1998, vol. 44, 312 p.

<sup>56</sup> CAI, Yimin; SUYANANDANA, Puangpen; SAMAN, Premasuda and BENNO, Yoshimi. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: Journal Genealogy Applied Microbiology. 1999, vol. 45, 180 p.

podríamos predecir si son resistentes a las condiciones de circulación por el tracto digestivo”, como lo señala Menezes y Gil<sup>57</sup>.

**5.5.4 Producción de gas.** Para verificar la producción de gas a partir de glucosa se empleó el caldo MRS con 5% de glucosa y colocando tubos Durham para verificar la presencia de gas siguiendo el método de Cai *et al*<sup>68</sup>.

**5.5.5 Actividad de catalasa.** Se colocó peróxido de hidrógeno sobre la colonia de la bacteria láctica seleccionada; la reacción se considera como positiva en caso de formación de burbujas (Dahl, Midden, y Hartman)<sup>59</sup>.

**5.5.6 Viabilidad a diferentes concentraciones de pH.** La tolerancia a pH bajo es una importante característica probiótica para la sobrevivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto digestivo (Cai *et al*)<sup>60</sup>.

La acidez en el estómago de monogástricos puede alcanzar valores hasta de pH 2.0 (Toit *et al.*)<sup>61</sup>, por lo tanto, el estudio requirió probar la viabilidad de la cepa seleccionada frente a diferentes niveles de pH. La tolerancia a los diferentes niveles fue medida a pH 3.25 control, 4.5, 7.6 y 8.2, según los encontrados por Smith, citado por Cheeke<sup>62</sup> en tres porciones del tracto digestivo del cuy, estómago, duodeno e íleon, respectivamente y siguiendo la metodología recomendada por Cai *et al*<sup>63</sup>.

---

<sup>57</sup>MENEZES, Mario and GIL, Carlos. Probiotics and immune response. En: Revista Ciencia Rural, Santa María. Julio-agosto, 2004, vol. 34, no. 4, 1297 p.

<sup>58</sup>CAI *et al*, Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Op. cit., p. 178.

<sup>59</sup>DAHL, Thomas; MIDDEN, W. Robert and HARTMAN, Philip. Comparison of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. En: Journal of Bacteriology. April, 1989, vol.171, no. 4.5 p.

<sup>60</sup>CAI *etal*. Op. cit., 180 p.

<sup>61</sup>TOIT, M.; FRANZ, CM.; DICKS, LM.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F. and HOLZAPFEL, WH. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. En: Journal Food Microbiology. 1998, vol. 40, p. 93-104.

<sup>62</sup>CHEEKE, Peter. Alimentación y nutrición del conejo. Zaragoza (España): Acribia, S.A., 1995, 34 p. ISBN: 84-200-0783-8.

<sup>63</sup>CAI *et al*. Op. cit., 178 p.

Por otro lado, es importante verificar la resistencia a niveles bajos de pH debido, a que favorece los procesos de fermentación para la producción de inóculos (Ramírez)<sup>64</sup>.

**5.5.7 Resistencia a diferentes niveles de temperatura.** Según la metodología de Cai *et al*<sup>65</sup>, se realizaron pruebas de crecimiento de la bacteria láctica seleccionada con características probióticas a diferentes temperaturas (38°C y 45°C), sembrada en medio Pro por 14:24 horas. Posteriormente, se efectuaron pruebas de viabilidad en agar MRS por 48 horas a 32°C. Fueron seleccionadas las cajas de petri con viabilidades de 30 y 300 UFC/mL y valores de dilución iguales o superiores a 10<sup>7</sup> UFC/mL.

### 5.5.8 Cinética de fermentación

**5.5.8.1 Características de la cinética.** Se propusieron dos medios de cultivo, medio MRS comercial y Medio Pro (Cuadro 1 y Anexo J), de los cuales se verificó y optimizó las mejores condiciones para producción de biomasa de la cepa seleccionada efectuando una cinética de fermentación.

#### Cuadro 1. Medios de cultivo

Medio	Composición
MRS	D-glucosa 20g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4g/L
Pro	10 g/L azúcar blanco; 15 g/L leche de soya; 150 g/L leche en polvo; 15 g/L salvado de trigo

Fuente: Jurado<sup>66</sup>, 2010.

La cinética de fermentación se efectuó en un erlenmeyer con 600 mL del medio y la bacteria probiótica ajustada (540 mL del medio y 60 mL del inóculo) a 32°C, en agitación constante en incubadora shaker a 100 rpm, no se realizó control de pH considerando que los microorganismos seleccionados son resistentes a pH bajo. Las variables evaluadas durante la cinética fueron las siguientes: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), determinación de pH, determinación

<sup>64</sup> RAMÍREZ, Cristina. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos. Curitiba: Setor de Tecnologia, Universidad Federal do Paraná, 2005. 77p.

<sup>65</sup> CAI *et al*. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. Op cit., p 312.

<sup>66</sup>JURADO. Op cit., p 58.



de azúcar total, determinación de producción de ácido láctico y la evaluación de la producción de biomasa.

Las mediciones o toma de muestras se realizaron por duplicado en el tiempo cero y subsecuentemente cada 2:24 horas durante 24 horas para determinar los parámetros de fermentación. Como son mediciones que se hicieron en el tiempo, estos datos se analizaron usando un diseño experimental con bloques al azar.

- **Conteo de microorganismos viables en placa UFC/mL.** La técnica de conteo en placa propicia la información del número de células viables durante el proceso en términos de UFC/mL, permitiendo determinar la evolución de la producción de biomasa. No se efectuaron medidas por peso seco ni por turbidimetría debido a las elevadas cantidades de sólidos en suspensión del medio de cultivo. Para los conteos se diluyó 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1% y se hicieron diluciones decimales; de cada dilución se transfirió a cajas de Petri con medio MRS con azul de anilina 0.1 mL para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 32°C y observadas entre las 24 y 48 horas. Se consideraron las cajas de Petri con conteos de UFC/mL entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/mL formadas (Lanara)<sup>67</sup>.
- **Determinación de pH.** La evolución del pH se valoró mediante la medición con un pHmetro digital.
- **Determinación de consumo de azúcares totales.** La cuantificación de azúcar permitió determinar el consumo para el crecimiento de los microorganismos y establecer la relación de consumo/crecimiento celular. Los azúcares fueron determinados por el método de Dubois<sup>68</sup>, conocido por el método de antrona (Anexo K). Se preparó previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón glucosa; los valores obtenidos de la lectura de densidad óptica (D.O.) a 625 nm se graficaron versus la concentración en mg/L y se obtuvieron los valores de la ecuación de la recta  $y = mX + b$  (Anexo L). Obtenidas las muestras de los diferentes tiempos de la cinética se procedió a realizar las lecturas de absorbancia a las muestras en espectrofotómetro a 625

---

<sup>67</sup>LANARA, Laboratorio de Referencia Animal. Métodos analíticos oficiáis para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasilia. 1981, vol. 2, no. 25, p. 1-15.

<sup>68</sup>DUBOIS, Michel; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. and SMITH, Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. En: Anal Chem. 1956, vol. 28, p. 350-356.

nm, y se procedió a aplicar la fórmula despejando los valores de X para cada tiempo, teniendo en cuenta que se trabajó en base a una dilución de 1/100 y 1/1000 para MRS y Pro, respectivamente (Anexo M)

- **Determinación de producción de ácido láctico.** Se realizó aplicando el método de titulación con Hidróxido de sodio 0,1 N (Anexo N).

- **Evaluación de la producción de biomasa.** Los resultados obtenidos permitieron determinar si la cepa resulta ser la más adecuada en términos tiempo-tasa de crecimiento durante el proceso de fermentación para establecer el tiempo de duración en la producción de biomasa.

Los cálculos de fermentación para las cinéticas fueron los definidos por Crueger<sup>69</sup> y Rodríguez *et al*<sup>70</sup>.

Siendo la velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación:

$$v_{\max} = \frac{d\ln X}{dt}$$

El tiempo de duplicación celular:

$$td = \frac{\ln 2}{v_{\max}}$$

## 5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el conteo de microorganismos viables en placa UFC/mL obtenidos durante la cinética de fermentación se adoptó un diseño en bloques al azar (DBA), los medios se consideraron como los dos tratamientos a aplicar y las horas de evaluación correspondieron a los bloques (11 tiempos), se evaluó el

---

<sup>69</sup> CRUEGER y CRUEGER. Op cit., p. 413.

<sup>70</sup> RODRÍGUEZ, L.; BUENO, G.; RODRÍGUEZ, D.; DELGADO, G.; SERRANO, P. and BRIZUELA, MA. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. En: New Horizons Biotechnology. 2003, p. 163-172.

comportamiento desde el tiempo 0 (cero horas), hasta el tiempo 11 (24 horas), se consideraron dos replicas para cada medio y tiempo.

Para analizar pH, consumo de azúcar total (mg/L) y % de ácido láctico resultado de la cinética, se aplicó un análisis de regresión para cada variable respecto a las UFC/mL formadas.

Los datos obtenidos se analizaron en S.A.S. 9.1.3 versión 2007 y fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA y prueba de significancia de Tukey para comparar variaciones que resulten estadísticamente significativas (P menor 0.05).

### 5.6.1 Modelo matemático para diseño en bloques al azar

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = la puntuación del  $i$  sujeto bajo la  $j$  condición experimental o tratamiento

$\mu$  = la media global de todos los datos del experimento

$\alpha_j$  = es el efecto del tratamiento  $i$  y que es comun a todos los individuos que reciben ese tratamiento

$\beta_j$  = es el efecto del bloque  $j$  y que es comun a todos los tratamientos que se aplicaron en ese bloque

$\varepsilon_{ij}$  = es el residuo o error aleatorio (dentro)

## 5.7 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

**5.7.1 Hipótesis nula (Ho):** Ho:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_T$ . La media de los tratamientos es igual. No hay diferencias significativas en las variables evaluadas.

**5.7.2 Hipótesis alterna (Ha):**  $H1: \mu1 \neq \mu2... \muT$ . La media de los tratamientos no es igual. Por lo tanto, al menos uno de los tratamientos muestra diferencias significativas en los promedios de las variables evaluadas.

## **5.8 VARIABLES EVALUADAS**

**5.8.1 Conteo de microorganismos (UFC/mL).** Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL), para *L. casei*.

**5.8.2 Determinación de pH**

**5.8.3 Consumo de azúcar.** Cuantificación de azúcar para el crecimiento de la bacteria para establecer la relación de consumo/crecimiento celular.

**5.8.4 Producción de ácido láctico**

**5.8.5 Producción de biomasa.** En términos de tiempo-tasa.

## 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 SELECCIÓN DE CEPAS PARA LA PRUEBA

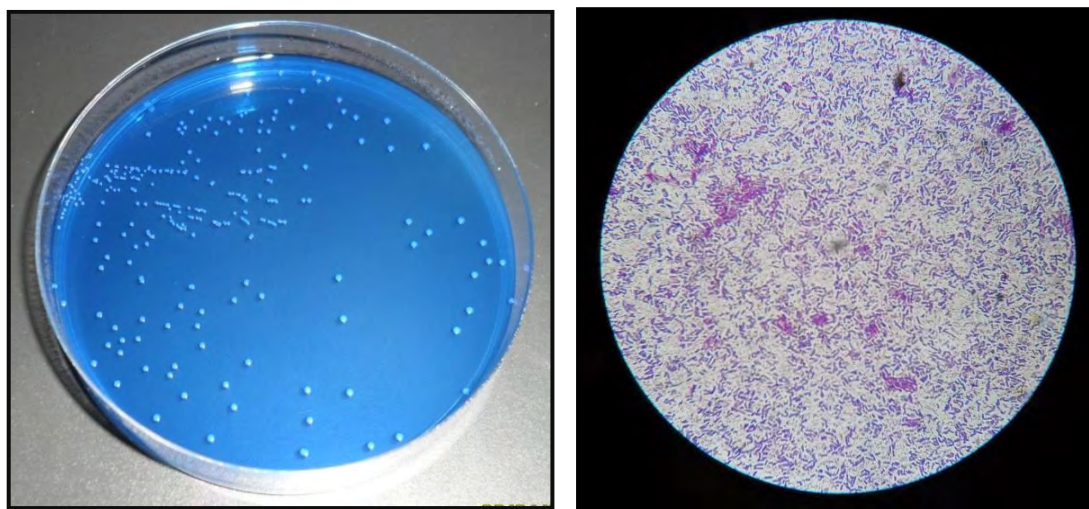
Una vez realizada la reconstitución, siembra y cultivo de las cepas probiótica y patógena, se procedió a verificar su pureza previo al inicio de cada prueba, para ello, se realizó tinción de Gram, verificando características y morfología propias de cada una, además, confirmando que en el medio donde crecían no hubiese otro tipo de bacterias que altere o afecte posteriormente los resultados.

#### 6.1.1 Descripción de las cepas

**6.1.1.1 *Lactobacillus casei*.** La bacteria ácido láctica *Lactobacillus casei*, pertenece a una cepa de colección American Type Culture Collection ATCC® 334™\*, obtenida mediante un laboratorio reconocido (Figura 1).

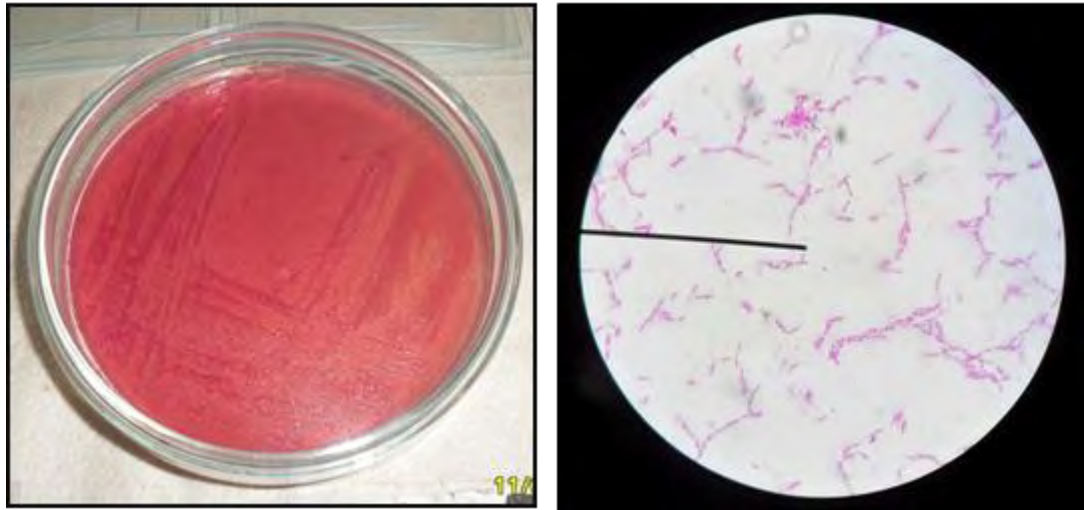
La cepa *Lactobacillus casei* ATCC® 334™\*, se presentó en un dispositivo KWIK-Stik™. Cada unidad KWIK-Stik™ incluyó una cepa de microorganismos en una sola pastilla liofilizada, un depósito de fluido hidratante, y un hisopo inoculador.

**Figura 1. *Lactobacillus casei*.** Izquierda, morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina. Derecha, morfología microscópica



**6.1.1.2 *Yersinia pseudotuberculosis*.** La bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis*, pertenece a una cepa de colección National Collection of Type Cultures NCTC 8580, aislada de una liebre y la cual fue obtenida mediante un laboratorio reconocido (Figura 2).

**Figura 2. *Yersinia pseudotuberculosis*.** Izquierda, morfología macroscópica en agar en agar McConkey. Derecha, morfología microscópica



## **6.2 PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A PATÓGENOS Y COMPARACIÓN FRENTE A ANTIBIÓTICOS**

**6.2.1 Ensayos de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* contra *Yersinia pseudotuberculosis*.** La acción inhibitoria se determinó por el halo producido alrededor del disco de agar impregnado de la bacteria láctica sobre la bacteria patógena; los halos se midieron teniendo en cuenta el radio de estos. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede determinar que la bacteria láctica si presenta características inhibitorias frente a la *Yersinia pseudotuberculosis*, produciendo halos de inhibición entre 2 y 3 mm, sin incidir en esto la cantidad de bacteria láctica utilizada en el ensayo. A favor del medio cabe resaltar al agar Mueller Hinton, ya que presenta diferencias en cuanto al halo formado con

respecto al agar TSA, respuesta probable del segundo medio considerado como el mejor para la realización de pruebas de susceptibilidad (Newmark<sup>71</sup>).

**Tabla 1. Acción inhibitoria de *Lactobacillus casei* frente a *Yersinia pseudotuberculosis***

Medio	Halo de inhibición (mm)			
	Cantidades			
	Azada	25 µl	50 µl	100 µl
TSA	2	2	2	2
Mueller Hinton	3	3	2	3

La acción inhibitoria se debe probablemente a las sustancias producto de la fermentación, para Ouwehand, 1993, citado por Ramírez<sup>72</sup> en este proceso se producen compuestos antimicrobianos como el ácido láctico, acético y propionico, al igual que peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reuterina, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), diacetilo (2,3-butanodiona), acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas.

En estudios realizados por Ramírez<sup>73</sup> sobre la actividad inhibitoria de BAL frente a microorganismos patógenos, las bacterias *Salmonella typhi* y *Yersinia enterocolitica* fueron los microorganismos que mayor sensibilidad presentaron a los compuestos generados por las cepas probióticas. Estos resultados los atribuye a las diferencias que existen entre las bacterias Gram positivas y negativas por cuanto las segundas contienen una membrana que actúa de barrera selectiva al paso de algunas sustancias como macromoléculas, pero no a las de bajo peso molecular que son producidas por las BAL y que atraviesan las porinas afectando la permeabilidad de la membrana exterior hasta debilitarla o desintegrarla. Dichas sustancias que pueden ocasionar esto son la reuterina y el ácido pirolutamico, también la presencia de peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácido láctico.

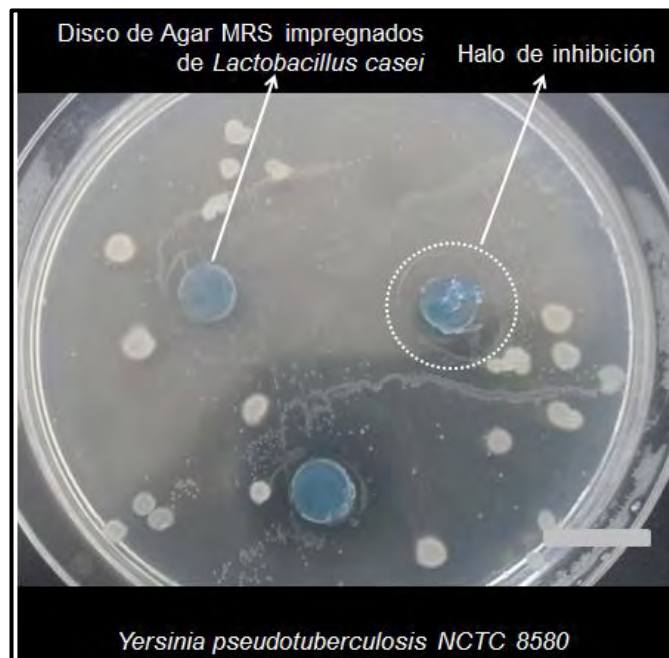
<sup>71</sup>NEWMARK, F.;SANTOS, M.; CHAVES, A.; MORA, J.; ARIAS, J. y ZEA, S. Proyecto Piloto de Prospección de Bioactividad en Organismos Marinos Colombianos. [online]. 2005 [Citado 2 mayo 2013]. pp. 1-28. Disponible en: <www.invemmar.org.co>

<sup>72</sup> RAMÍREZ, María. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis Licenciado Químico en Alimentos. Pachuca de Soto, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, 2005. p. 13,57.

<sup>73</sup>Ibid., p. 9.

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn<sup>74</sup> aseguran, que cada compuesto antimicrobiano producido durante la fermentación proporciona una barrera adicional para los patógenos y bacterias de deterioro; y dado que cualquier microorganismo puede producir un número de sustancias inhibitorias, su potencial antimicrobiano es definido por la acción colectiva de sus productos metabólicos sobre las bacterias indeseables.

**Figura 3. Discos de agar MRS impregnados de *Lactobacillus casei* sobre un cultivo de *Yersinia pseudotuberculosis***



**6.2.2 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a *Yersinia pseudotuberculosis* y *Lactobacillus casei*.** Los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a la bacteria láctica y la bacteria patógena se presentan en la tabla 2. Para esta prueba se midió el diámetro del halo formado por cada sensidisco de cada antibiótico.

Según los datos obtenidos, se puede considerar que la bacteria patógena es resistente a la cefalotina, cefepima, dicloxacilina y penicilina, lo cual significa que esta responde negativamente a dichos antibióticos, que en el caso de ser aplicados no habría respuesta positiva para controlar la enfermedad.

<sup>74</sup> RATTANACHAIKUNSOPON, P. y PHUMKHACHORN, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. En: Annals of Biological Research. 2010, vol.1, no. 4, 220 p.



Para el caso de la trimetoprim-sulfametoxazol, uno de los antibióticos más utilizados por los productores de cuyes para controlar la *Yersinia* evidenció sensibilidad intermedia para esta prueba, no obstante, se ha confirmado su sensibilidad ante la bacteria patógena en estudios realizados por Patiño *et al*<sup>75</sup>, probado en 67 cepas de *Y. pseudotuberculosis* encontrando que todas mostraron ser sensibles al antibiótico, presentando halos de 24 a 40 mm de diámetro. Para la investigación la bacteria patógena mostró ser sensible únicamente a la ciprofloxacina, enrofloxacina y gentamicina.

**Tabla 2. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a *Yersinia pseudotuberculosis* y *Lactobacillus casei***

Antibióticos	<i>Y. ps NCTC 8580</i>	Nivel de Sensibilidad	<i>L. casei ATCC 334®</i>	Nivel de Sensibilidad
Cefalotina KF 30 µg	11	R <sup>1,2</sup>	46	S <sup>1,2,3</sup>
Cefepima FEP 30 µg	11	R <sup>1,4</sup>	34	S <sup>1,4</sup>
Ciprofloxacina CIP 5 µg	27	S <sup>1,4</sup>	33	S <sup>1,4</sup>
Dicloxacilina DCX 1 µg	8	R <sup>1</sup>	28	S <sup>1,3</sup>
Enrofloxacina Enr 5 µg	29	S <sup>1</sup>	34	S <sup>1</sup>
Gentamicina CN 10 µg	24	S <sup>1,2,4</sup>	25	S <sup>1,2,3,4</sup>
Penicilina G P 10 IU	0	R <sup>1,2</sup>	26	R <sup>1,2,3</sup>
Trimetoprim-sulfametoxazol COT 25 µg	15	I <sup>1,2,4</sup>	31	S <sup>1,2,3</sup>

**S** = sensible

**I** = intermedio

**R**= resistente

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011<sup>76</sup>
2. Centro de controle productos para diagnósticos Ltda. CECON<sup>77</sup>
3. Paniagua *et al.*, 2003<sup>78</sup>.
4. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012<sup>79</sup>.

<sup>75</sup>PATIÑO *et al.* Op. cit., p. 21, 22.

<sup>76</sup>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Information Supplement. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Diciembre, 2011, vol. 3, no. 001, 172 p.

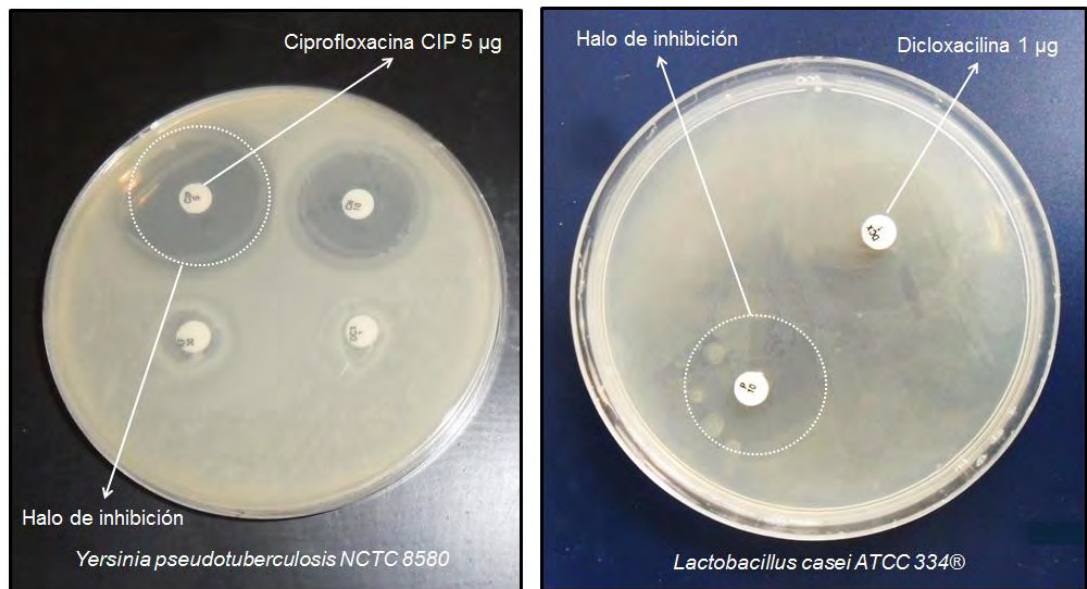
<sup>77</sup> CENTRO DE CONTROLE E PRODUCTOS PARA DIANOSTICOS LTDA CECON. [online]. [Citado 2 mayo 2012] Disponible en: <<http://www.ceconsp.com.br/>>

<sup>78</sup> PANIAGUA, Gloria; MONROY, Eric; VACA, Sergio y GONZALES, Susana. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. En: Revista Médica del Hospital General de México. Enero-Marzo, 2003, vol. 66, no. 1, 15 p.

<sup>79</sup>EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, valid from 2012-01-01. [online]. [Citado 2

En el caso de la bacteria láctica esta manifestó ser resistente únicamente a la penicilina y sensible a los demás antibióticos propuestos. Ante estos resultados se señala que *Lactobacillus casei* no podría ser aplicado en dietas que contengan algunos de estos antibióticos ya que estos inhibirían su crecimiento sin poder ejercer control sobre los organismos patógenos.

**Figura 4. Resistencia frente a antibióticos de la cepa probiótica y patógena**



**6.2.3 Acción inhibitoria por sobrenadantes.** La acción inhibitoria por sobrenadantes fue determinada por el halo producido alrededor del disco impregnado de la bacteria láctica aplicando técnicas de difusión, se midió la distancia del extremo del disco al borde del halo obteniendo los resultados mostrados en la tabla 3.

En la prueba inhibitoria se utilizaron varios sobrenadantes (bacteriocinas) bajo distintas condiciones filtrado, sin filtrar, a 80°C y a pH 6; observando los datos obtenidos en la tabla se puede inferir que hubo inhibición frente a *Yersinia pseudotuberculosis*, al presentarse la formación de halos con medidas entre 2 y 8 mm. Este resultado se atribuye a que “las bacteriocinas de bacterias Gram positivas poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga

neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas” (López *et al*<sup>80</sup>). Aunque, no debe ignorarse cuál puede ser el tipo de compuestos inhibitorios que produce la bacteria láctica y se sugeriría efectuar estudios referentes, como pruebas de identificación molecular para saber qué tipos de compuestos están actuando.

**Tabla 3. Halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante (bacteriocinas)**

Método	Condición	Halo (mm)		
		50 µl	75 µl	100 µl
Difusión en agar con discos método modificado	Filtrado	5	2	4
	Sin Filtrar	1	2	2
	80°C	0	1	2
	pH 6	1	4	6
Difusión en agar con cilindro plástico	Filtrado	0	3	3
	Sin Filtrar	2	2	4
	80°C	1	1	1
	pH 6	2	3	2
Difusión en agar en Pozos con doble capa modificado	Filtrado	5	-	5
	Sin Filtrar	5	-	4
	80°C	0	-	0
	pH 6	7	-	8

El sobrenadante llevado hasta una temperatura de 80°C presentó halos de 0 y 1 mm concluyendo que no presenta inhibición frente a la bacteria patógena y por lo tanto no se recomendaría llevarlo a procesos de altas temperaturas por cuanto su acción inhibitoria se vería afectada, sin embargo, como menciona Zapata *et al*<sup>81</sup> la estabilidad térmica de las bacteriocinas de las bacterias lácticas de bajo peso molecular es muy importante por cuanto estos compuestos son utilizados en muchos procesos de las industrias alimentarias en donde tienen que pasar por diferentes procesos de altas y bajas temperaturas.

<sup>80</sup> LÓPEZ, J.; OCHOA, A.; SANTOYO, G.; ANAYA, L.; MEDINA, E; MARTÍNEZ, M. y LOEZA, P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *En*: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Julio-septiembre, 2008, vol. 39, no. 3, 53 p.

<sup>81</sup> ZAPATA *et al*. Op. cit., p. 9.

En cuanto a la cantidad de sobrenadante utilizado 50, 75 y 100  $\mu\text{l}$ , no se observaron diferencias para la inhibición del patógeno entre tratamiento, indicando así que las cantidades empleadas son independientes del efecto inhibitorio ejercido, igualmente, se notó que no existen diferencias marcadas entre los métodos empleados.

**Figura 5. Discos con volumen definido de bacteriocina sobre la bacteria patógena**



### 6.3 VIABILIDAD FRENTE A CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES

Los resultados de la prueba de viabilidad frente a concentraciones de sales biliares muestran como a una concentración del 3%, 4% y 5% de sales biliares, *Lactobacillus casei* expresa un buen promedio de crecimiento, al igual que a diferentes concentraciones de 0,5%, 1% y 2% de bilis bovina (Tabla 4).

De acuerdo a la investigación realizada se puede observar que *Lactobacillus casei* es capaz de crecer y resistir a diferentes concentraciones del 3%, 4% y 5% de sales biliares al igual que a concentraciones del 0,5%, 1% y 2% de bilis bovina, presentando altos recuentos bacterianos incluso en diluciones de  $10^{-10}$ . Esta es una característica importante por cuanto las cepas destinadas a probióticas deben ser capaces de pasar a través del tracto gastrointestinal sin sufrir alteraciones en su comportamiento fisiológico. Así, una cepa no solo debe sobrevivir a las condiciones acidas del estómago sino además, a sales biliares con el fin de ejercer sus efectos beneficiosos en el intestino, siendo por lo tanto considerada la

tolerancia a la bilis como una de las propiedades más importantes de los microorganismos probióticos para que les permita sobrevivir y colonizar el aparato gastrointestinal (Iñiguez *et al.*<sup>82</sup>).

**Tabla 4. Viabilidad del medio Pro a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina sigma**

Concentración	No. de colonias por dilución (UFC/mL)				
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
<b>Sales biliares</b>					
<b>3%</b>	5,2 x 10 <sup>7</sup>	7,8 x 10 <sup>8</sup>	4,5 x 10 <sup>9</sup>	7,8 x 10 <sup>10</sup>	4,2 x 10 <sup>11</sup>
<b>4%</b>	9,1 x 10 <sup>7</sup>	6,1 x 10 <sup>8</sup>	9,7 x 10 <sup>9</sup>	1,54 x 10 <sup>11</sup>	9,4 x 10 <sup>11</sup>
<b>5%</b>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>9</sup>	2,5 x 10 <sup>10</sup>	6,9 x 10 <sup>10</sup>	2,2 x 10 <sup>12</sup>
<b>Bilis bovina sigma</b>					
<b>0,50%</b>	7,2 x 10 <sup>7</sup>	5,3 x 10 <sup>8</sup>	4,4 x 10 <sup>9</sup>	7,0 x 10 <sup>10</sup>	5,0 x 10 <sup>11</sup>
<b>1%</b>	4,0 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>9</sup>	3,6 x 10 <sup>9</sup>	6,4 x 10 <sup>10</sup>	3,4 x 10 <sup>11</sup>
<b>2%</b>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>9</sup>	4,4 x 10 <sup>9</sup>	8,2 x 10 <sup>10</sup>	8,5 x 10 <sup>11</sup>

El autor mencionado anteriormente señala que cuando las bacterias sean administradas de forma oral, éstas deben resistir al tránsito gastrointestinal para que colonicen la mucosa y ejerzan un efecto antagónico contra diversas bacterias patógenas; por lo cual se hace necesario realizar una selección de las cepas ácidas y bilis-tolerante para asegurar la calidad de los cultivos probióticos durante su fabricación y almacenamiento. En este sentido Gregoret<sup>83</sup> menciona que resulta fundamental determinar la resistencia de bacterias potencialmente probióticas frente a los efectos de los ácidos biliares; para lo cual la FAO<sup>84</sup>, indica que dentro de las pruebas *in vitro* uno de los ensayos que deben considerar para caracterizar a las cepas como GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) es la evaluación a sales biliares.

Lo anterior nos permite concluir que si se desea utilizar esta bacteria probiótica en la elaboración de inóculos para ser empleados junto con la ración para la

<sup>82</sup> IÑIGUEZ, P.; PEREZ, R. y ACEDO, F. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. En: Revista Latinoamericana de Microbiología. Julio-septiembre, 2007, vol. 49, no. 3-4, 47 p.

<sup>83</sup> GREGORET, Verónica. Cepas autóctonas de *Lactobacillus* aisladas de neonatos santafesinos para el desarrollo de alimentos probióticos. Aspectos tecnológicos. Herramientas moleculares para su detección en alimentos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santa Fe-Argentina: Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química, 2011. 113 p.

<sup>84</sup> FAO. Op. cit., p.39.

alimentación de los cuyes, la cepa es capaz de soportar la acción de las sales biliares presentes en el animal.

#### 6.4 PRODUCCIÓN DE GAS Y ACTIVIDAD DE CATALASA

En cuanto a la prueba de producción de gas para *Lactobacillus casei* fue negativa, resultado similar al obtenido en estudios de Jurado<sup>85</sup> con *Lactobacillus plantarum*; verificado ya que en los tubos con caldo MRS con 5% de glucosa y tubos Durham invertidos hubo ausencia de gas, resaltándola como una cepa no productora de gas.

Así mismo, el resultado en la prueba de catalasa fue negativo para dos concentraciones de peróxido de hidrógeno evaluadas al 3,6 y 30%, observándose la ausencia de burbujas de gas en presencia de este compuesto (Tabla 5).

**Tabla 5. Producción de gas y actividad de catalasa**

Bacteria probiótica	Producción de Gas	Prueba de catalasa	
		3,6%	30%
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-

La formación de burbujas evidencia la presencia de enzimas como la catalasa, quien puede desdoblar el peróxido de hidrógeno en moléculas simples agua y oxígeno (burbujas), a pesar, como lo afirma Madigan *et al.*, citados por Escobar<sup>86</sup>, la mayoría de cepas lácticas no poseen catalasa, lo cual confirma la negatividad del resultado.

En la prueba de catalasa la cepa fue catalasa (-) por la ausencia de gas, siendo esto una característica general del género *Lactobacillus*, lo que concuerda con lo citado por Roissart y Luquet<sup>87</sup>, donde la mayoría de las cepas lácticas tienen esta característica.

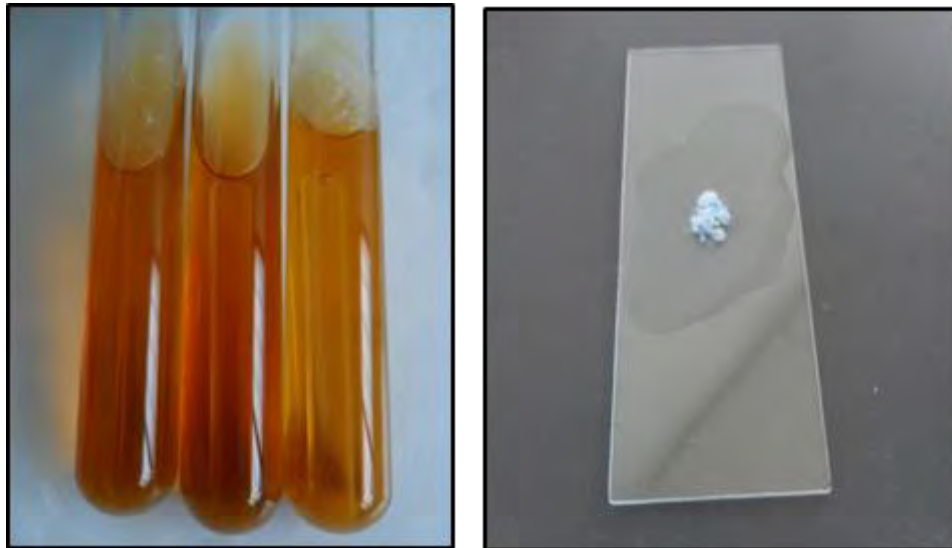
<sup>85</sup> JURADO. Op cit., p. 68.

<sup>86</sup>ESCOBAR. Op cit., p. 26.

<sup>87</sup> ROISSART, H. de, y LUQUET, F. Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques. Vol. 2 France: Ed. Loriga, 1994. 614 p. ISBN 2950747701.

Por su parte la respuesta negativa a producción de gas es una indicación favorable debido a que una condición básica que deben cumplir las cepas probióticas es no generar gas evitando así, problemas como timpanismos y en casos severos la muerte del animal.

**Figura 6. Izquierda, cepa probiótica en caldo MRS con tubos Durham en su interior. Derecha, peróxido de hidrógeno sobre una colonia de *Lb. casei***



## 6.5 VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH

La prueba de viabilidad se evaluó durante 3 horas correspondientes a los tiempos T0, T1 y T2, en ella se sometió la cepa cultivada en medio Pro a 4 diferentes pH 3.25, 4.5, 7.6 y 8.2, posterior a un periodo de incubación de 48 horas a 32 °C se observó el crecimiento dando como resultado los valores que aparecen en la tabla 6.

Las bacterias del genero *Lactobacillus* comprende un numero variado de especies, el cual se agrupa en las bacterias acido lácticas (BAL) que poseen una característica muy importante como la tolerancia a pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores) (Cabeza<sup>88</sup>).

---

<sup>88</sup> CABEZA, Enrique. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. [online]. [Citado 10 mayo 2013] Disponible en: <[http://www.academia.edu/992789/Bacterias\\_acido-lacticas\\_BAL\\_aplicaciones\\_como\\_cultivos\\_estarter\\_para\\_la\\_industria\\_lactea\\_y\\_carnica](http://www.academia.edu/992789/Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_lactea_y_carnica)>

Liong y Shah, citados por León<sup>89</sup> recalcan la importancia de los probióticos frente a la resistencia de pH bajos, como una necesidad para tolerar y soportar la acidez del estómago de forma exitosa tras el paso por esta porción; por ello, frecuentemente se evalúa la habilidad para sobrevivir a bajos pH durante 3 horas, periodo relacionado directamente con el tiempo promedio de pasaje por el estómago.

**Tabla 6. Prueba de viabilidad (UFC/mL) en diferentes tiempos a pH de 3.25, 4.5, 7.6 y 8,2 en el medio Pro**

Tiempo	pH			
	3.25	4.5	7.6	8.2
<b>T0 (H1)</b>	1. $1,8 \times 10^7$	1. $3,0 \times 10^6$	1. $1,5 \times 10^7$	1. $3,0 \times 10^8$
	2. $3,0 \times 10^8$	2. $8,0 \times 10^7$	2. $1,8 \times 10^8$	2. $3,0 \times 10^9$
	3. $3,0 \times 10^{10}$	3. $1,4 \times 10^9$	3. $3,0 \times 10^{10}$	3. $3,0 \times 10^{10}$
	4. $3,0 \times 10^{11}$	4. $1,5 \times 10^{10}$	4. $3,0 \times 10^{11}$	4. $7,2 \times 10^{10}$
	5. $3,0 \times 10^{12}$	5. $1,0 \times 10^{11}$	5. $3,0 \times 10^{12}$	5. $3,0 \times 10^{10}$
<b>T1 (H2)</b>	1. $1,6 \times 10^7$	1. $3,0 \times 10^8$	1. $1,5 \times 10^7$	1. $3,0 \times 10^8$
	2. $3,0 \times 10^7$	2. $3,0 \times 10^9$	2. $4,0 \times 10^7$	2. $3,0 \times 10^9$
	3. $3,1 \times 10^9$	3. $3,0 \times 10^{10}$	3. $3,0 \times 10^8$	3. $3,0 \times 10^{10}$
	4. $2,0 \times 10^9$	4. $2,0 \times 10^9$	4. $2,0 \times 10^9$	4. $1,8 \times 10^{10}$
	5. $6,0 \times 10^{10}$	5. 0	5. $3,0 \times 10^{11}$	5. $5,0 \times 10^{10}$
<b>T2 (H3)</b>	1. $3,0 \times 10^8$	1. $2,0 \times 10^6$	1. $8,0 \times 10^6$	1. $1,0 \times 10^7$
	2. $3,0 \times 10^9$	2. $2,0 \times 10^7$	2. $3,2 \times 10^8$	2. $2,0 \times 10^7$
	3. $3,0 \times 10^{10}$	3. $1,0 \times 10^8$	3. $7,0 \times 10^8$	3. $2,4 \times 10^{10}$
	4. $3,0 \times 10^{11}$	4. $1,0 \times 10^9$	4. $6,0 \times 10^9$	4. $3,0 \times 10^{11}$
	5. $3,0 \times 10^{12}$	5. $3,0 \times 10^{10}$	5. $6,0 \times 10^{10}$	5. $3,0 \times 10^{12}$

**T0** = Inicio de la prueba en la primera hora

**T1** = Segunda hora

**T2** = Tercera hora

**4.** = A los 45 minutos

**1.** = Prueba a los cero minutos

**2.** = A los 15 minutos

**3.** = A los 30 minutos

**5.** = A los 60 minutos

Bajo las condiciones fisiológicas del cual los pH presentados en tres porciones del tracto digestivo se encuentran 4.5, 7.6 y 8.2 (Smith, citado por Cheeke<sup>90</sup>), estómago, duodeno e íleon, respectivamente. El crecimiento microbiano (UFC/mL) para la cepa probiótica evaluada bajo diferentes concentraciones de pH demostró valores satisfactorios con índices más altos de  $3,0 \times 10^{12}$ ,  $3,0 \times 10^{11}$  y  $3,0 \times 10^{12}$ ,

<sup>89</sup> LEÓN, Ma Fernanda. Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado Licenciatura en Bioquímica. Montevideo-Argentina: Universidad de la República. Facultad de Ciencias, 2012. 25 p.

<sup>90</sup> CHEEKE. Op cit., p. 34



para T0, T1 y T2 respectivamente; incluso el pH más bajo 3,25 tomado como punto control en caso de presentarse, reflejó valores entre  $3,0 \times 10^8$  y  $3,0 \times 10^{12}$  UFC/mL, señalando que tras la ingestión del probiótico en cuyes y trascurridas tres horas se podrían encontrar valores de viabilidad altos.

## 6.6 RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Los resultados obtenidos en la tabla 7, muestran que *Lactobacillus casei* demostró una termotolerancia a las dos temperaturas de 38°C y 45°C, sin afectarse su crecimiento. Según Jay citado por Mora y García<sup>91</sup>, mencionan que los lactobacilos pueden desarrollarse con límites de temperatura que van desde los 2 a 52°C, siendo su rango óptimo de crecimiento de 30 a 40°C. Por lo tanto, esta es una característica importante de la bacteria puesto que le permite crecer en diferentes temperaturas, observándose en este caso que a una temperatura de 45°C en algunas diluciones se presentó un mayor número de UFC/mL y no se vio afectado su crecimiento.

**Tabla 7. Viabilidad de *Lactobacillus casei* en el medio Pro a temperaturas de 38°C y 45°C**

Temperatura	No. de colonias por dilución (UFC/mL)				
	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
38°C	$2,9 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{12}$
45°C	$3,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{12}$

A un rango de temperatura de 38°C, la cepa probiótica se podrían usar para otras aplicaciones como por ejemplo, incorporar esta bacteria a concentrados para la alimentación de los cuyes a través de métodos como el secado. Además, de tener en cuenta que la bacteria debe resistir a la temperatura corporal del cuy, entre 38°C y 45°C, al momento de ser suministrada y le permita colonizar el tracto gastrointestinal del animal.

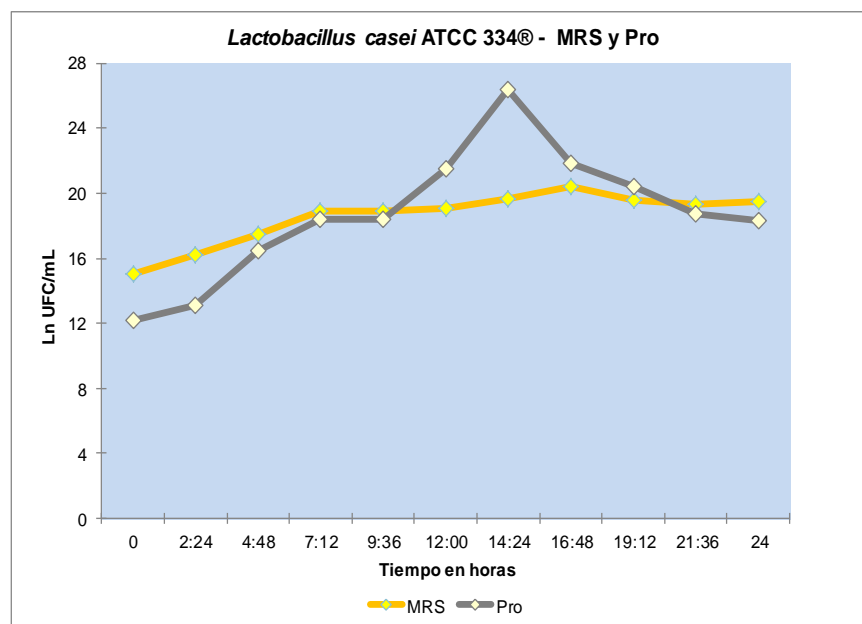
<sup>91</sup> MORA, Nancy. y GARCÍA, Andrés. Susceptibilidad de Bacterias ácido láctica (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis Licenciado en Química de Alimentos. Hidalgo-México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, 2007.4 p.

Al respecto de la importancia de la temperatura en el crecimiento y producción de sustancias antimicrobianas, Dalie *et al.*<sup>92</sup>, menciona que la temperatura y el período de incubación, son factores esenciales que modulan el crecimiento de las BAL, los cuales pueden llegar a afectar considerablemente las cantidades producidas de metabolitos antimicrobianos. Debido a esto es importante realizar estas pruebas con el fin de determinar la capacidad de crecimiento de las bacterias a ser utilizadas como probióticas.

## 6.7 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

La cinética de fermentación se efectuó de acuerdo a lo descrito en el ítem 5.5.2 con la cepa de *L. casei* en los medios MRS y Pro evaluados como sustrato. En la figura 7 se puede observar cual fue el crecimiento de la cepa probiótica cada 2:24 horas durante 24 horas en once (11) tiempos de evaluación, la cual en el medio Pro tubo un menor crecimiento expresado como Ln UFC/mL durante las 9:36 horas de haber iniciado el proceso de fermentación, sin embargo, alcanza su fase exponencial más rápido que en el medio MRS, con una caída después de las 14:24 horas de iniciado el proceso.

**Figura 7. UFC/mL de la cepa probiótica cultivada en los medios MRS y Pro durante 24 horas**



<sup>92</sup> DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M. y RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria- Potential for control of mouldgrowth and mycotoxins: A review. *En: Food Control*. Abril, 2010, vol. 21, no. 4, 372 p.

**6.7.1 Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL).** El máximo crecimiento (UFC/mL) para *L. casei* en los medios MRS y Pro, se obtuvo al tiempo 7 (16:48 horas) y tiempo 6 (14:24 horas) de la cinética, es decir, al alcanzar la fase exponencial de crecimiento, con valores de  $7,3 \times 10^8$  UFC/mL y de  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL respectivamente, siendo más alta para el medio Pro, lo que representa mayor ventaja al manifestarse 2:24 horas antes que la del segundo medio, respuesta positiva ya que en futuras investigaciones se facilitaría la generación de inóculos probióticos con menor tiempo y menores costos de producción.

De igual manera, tras el propósito de establecer cuál de los medios fue el mejor u ofrece mayores ventajas para el crecimiento microbiano expresado en UFC/mL, se realizó el diseño estadístico aplicando un diseño en bloques al azar los medios se consideraron como los dos tratamientos a aplicar y las horas de evaluación correspondieron a los bloques, se evaluó el comportamiento desde el tiempo 0 (cero horas), hasta el tiempo 11 (24 horas), se consideraron dos replicas para cada medio y tiempo, considerando después de la siembra en cajas petri colonias comprendidas entre 30 y 300 colonias, criterio de selección para la producción de inóculos probióticos, y para lo cual las UFC/mL se trabajaron bajo transformación a logaritmo natural.

Los datos obtenidos se analizaron en S.A.S. 9.1.3 versión 2007 y fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA y prueba de significancia de Tukey para comparar variaciones que resulten estadísticamente significativas (P menor 0.05) (Anexo O).

En conclusión al resultado se permite observar que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre el efecto que pueda producir la interacción entre los medios de cultivo, no obstante, al considerar los periodos de evaluación tomando diferentes tiempos, estadísticamente si existe diferencia entre las horas de evaluación ( $P < 0,05$ ). El error estándar no fue considerado dentro del análisis estadístico ya que el R cuadrado alcanzo un valor considerablemente alto (73%).

Finalmente el análisis de anova revela que los dos tipos de medios no presentan diferencias estadísticas significativas, por consiguiente, ambos pueden ser usados como medio de cultivo en el laboratorio, aunque a favor del medio Pro, se debe considerar su mayor producción de biomasa y otros puntos de vista como económico, que resaltaría su importancia como medio de cultivo para producción de UFC/mL, ofreciendo los nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria ácido láctica y encontrándose en el rango deseable para la producción de inóculos probióticos en futuros estudios para el suministro a animales *in vivo*.

En respuesta al comparador Tukey las mismas letras presentadas en el Anexo O para las medias nos demuestran igualmente que no hay diferencias significativas entre los dos medios de cultivo, por tal razón se acepta como hipótesis nula y se rechaza la diferencia entre medios.

De esta manera, los valores obtenidos en la prueba expresan ser adecuados para ser utilizados en la preparación de inóculos con propiedades probióticas; ya que al alcanzar poblaciones elevadas permitirá hacer una competencia frente al microorganismo patógeno, facilitando la colonización del tracto gastrointestinal considerando lo afirmado por Zamudio y Zavaleta<sup>93</sup>.

Por otro lado la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  h<sup>-1</sup>) tuvo una diferencia muy marcada entre los dos medios (1,482 unidades), para el medio MRS fue de 0,705 en comparación con la  $\mu$  h<sup>-1</sup> en el medio Pro que fue de 2,187. Con estos resultados se confirma que el medio Pro presenta mejor comportamiento para crecimiento microbiano y la producción de biomasa para *L. casei*.

De igual manera con la cinética efectuada se determinó el tiempo requerido para obtener el máximo crecimiento microbiano en los medios MRS y Pro, siendo de 16:48 horas (T7) y 14:24 horas (T6) respectivamente. Estos resultados tienen relación con los encontrados por Ramírez<sup>94</sup>, en un medio similar a base de azúcar blanco, leche de soya, suero de leche y salvado de trigo con un cultivo de una cepa probiótica asilada de un probiótico comercial, la cual alcanzo el máximo crecimiento a las 15 horas (T5) del proceso con  $6,2 \times 10^{11}$  UFC/mL. Así mismo, Montes, Santacruz, y Sañudo<sup>95</sup>, indicaron que en la fermentación por 12 horas en medio elaborado a base de melaza y leche en polvo con cultivo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* se presentó el pico máximo de crecimiento de la bacteria en el tiempo T10 (11 horas) determinándose así el tempo de cosecha con una biomasa de  $9,3 \times 10^{11}$  UFC/mL. Finalmente, se debe tener en cuenta que la curva de cinética de fermentación dependerá de los siguientes factores: tipo de cepa probiótica, tiempo y periodos de evaluación, medio y condiciones de cultivo.

Para que se presenten efectos beneficiosos, los *Lactobacillus* debe sobrevivir y adherirse a la pared del tubo digestivo en número suficiente, como indican los resultados de la viabilidad (UFC/mL) para *L. casei* y que al mismo tiempo le permitirán una eficiente colonización en la mucosa intestinal. Uno de los criterios de selección más importantes para determinar que microorganismos serán

---

<sup>93</sup> ZAMUDIO y ZAVALETA. Op cit., p 31.

<sup>94</sup> RAMÍREZ, C. Op cit., p. 104

<sup>95</sup> MONTES; SANTACRUZ y SAÑUDO. Op. cit., p. 97.

utilizados como potenciales probióticos es la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal debido a que es un pre requisito para poder colonizar el intestino (Tuomola *et al.*, 2001 citados por León<sup>96</sup>).

Las investigaciones de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas concentraciones de microorganismos (>10<sup>7</sup> UFC/g), ha sido el objetivo fundamental cuando se trabaja con bacterias ácido-lácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como aditivo probiótico para aumentar el valor nutritivo de sus productos. De esta forma, la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda. Mack *et al*<sup>97</sup> plantean que infortunadamente, los métodos de cultivo industrial de probióticos se caracterizan por sufrir de la inhibición del crecimiento celular debido a la producción de ácido láctico, un producto primario de su metabolismo.

Una consideración importante en este sentido que es difícil mencionar son el número específico de microorganismos que deben contener los productos para que sean considerados como probióticos, esto es debido a que cada legislación o cada país cuenta con diferentes normatividades, algunos afirman que deben contar con una población mínima de 10<sup>6</sup> UFC/mL, y otros autores denotan que debe tener la cantidad necesaria para que se ingiera una cantidad de 10<sup>9</sup> UFC/mL (Ouwehand, Salminen e Isolauri<sup>98</sup>).

**Tabla 8. Valores de Ln UFC/mL obtenidos para *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo**

Tipo de bacteria		<i>Lactobacillus casei</i>										
Horas		0	2:24	4:48	7:12	9:36	12:00	14:24	16:48	19:12	21:36	24
Medio de cultivo	MRS	15,07	16,21	17,50	18,89	18,92	19,06	19,66	20,40	19,57	19,34	19,52
	Pro	12,21	13,12	16,49	18,42	18,42	21,49	26,40	21,82	20,44	18,72	18,30

**6.7.2 Determinación de pH.** En la figura 8 se observa como durante la fase exponencial *L. casei* presenta mayor producción de biomasa a pH de 5,94 y 6,01

<sup>96</sup>LEÓN. Op cit., p. 33.

<sup>97</sup>MACK DR.; AHRNÉ, S.; HYDE, L.; WEI, S. y HOLLINGSWORTH, MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. En: Journal of Gastroenterology and Hepatology GUT. January, 2003, vol. 52, no. 6, p. 827–833.

<sup>98</sup>OUWEHAND, A.; SALMINEN, S. y ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. In: Antonie van Leeuwenhoek . August, 2002, vol. 82, no. 1-4, p. 279-289.

en el medio MRS y Pro respectivamente, y finaliza con valores de 5,74 y 5,57 a las 24 horas de la cinética.

Kandler y Weiss<sup>99</sup> consideran que dada la característica de los *Lactobacillus* como microorganismos acidúricos, pueden crecer a pH inferiores a 5. En el estudio no se revelaron valores similares a este pH, ya que los obtenidos estuvieron por encima del referenciado. Esto es reafirmado en estudios realizados por García y Jerez<sup>100</sup> quienes probaron cómo diferentes pH influían sobre el crecimiento de *L. casei*, encontrando que la bacteria probiótica no crece adecuadamente cuando es inoculada en un medio de cultivo a pH de 5, comparada con otros pH de 6 y 7 en donde hubo un mayor crecimiento.

Los mismos autores describen que “esto se puede deber a que el microorganismo solo tolera pH neutros o ligeramente ácidos para su crecimiento y la población acidifica el medio hasta que ocurre una posible inhibición por pH”

Los valores de pH encontrados en los tiempos de cinética favorecen los procesos de fermentación, en la producción de inóculos; entre las cepas que soportan pH de 2,5 se encuentran *Lactobacillus casei* (ATCC 27139, FAGRO 98, FAGRO 98LP) y *Lactobacillus rhamnosus* (FAGRO 36.5 y FAGRO 53.1), indicando que son capaces de sobrevivir al ambiente del tracto gastrointestinal, no son afectadas a pH ácidos y a concentraciones altas de sales biliares (León<sup>101</sup>). Por lo tanto, sería capaz de soportar la acidez que se presenta en el estómago del cuy (alrededor de 4,5), siendo uno de los principales obstáculos para el paso a través del tracto gastrointestinal.

La evolución del pH fue relacionado con el incremento en cada unidad Ln UFC/mL mediante análisis de regresión, siendo el pH la variable independiente que presenta un valor de  $B_1$ , -0.32244 en el medio MRS y de  $B_1$ , -0.15537 en el medio Pro (Anexo P y Q), lo que significa que por cada unidad logarítmica del crecimiento de colonia, el pH disminuye en -0,32244 y -0.15537 unidades de pH para cada medio, notándose una mayor caída del pH en el medio Pro, el cual es

---

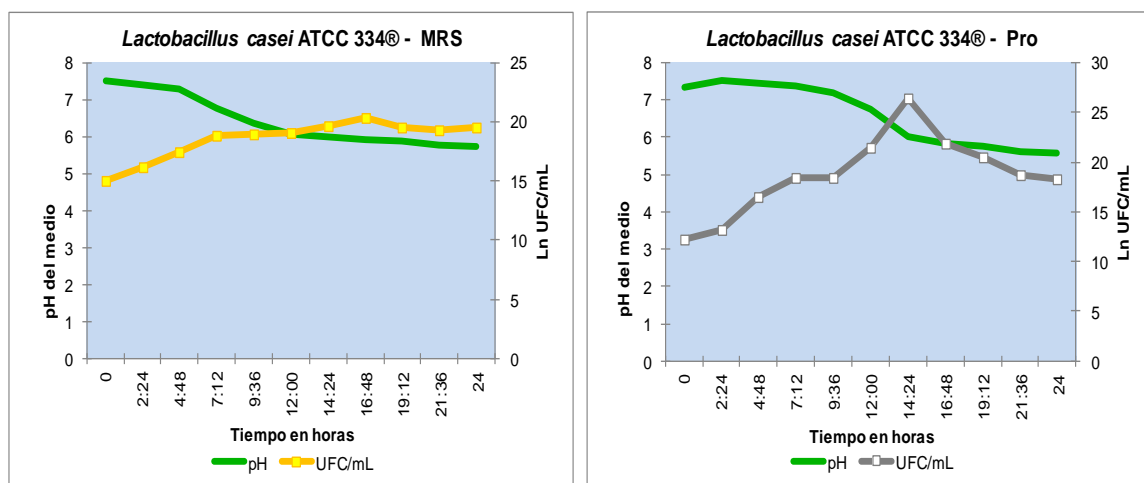
<sup>99</sup>KANDLER, O, y WEISS N. Regular, Nosporing Gram-positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, PH Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt (Eds). Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1986. 1208-1235 p.

<sup>100</sup>GARCÍA, Diego. y JEREZ, Jorge. Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de BLIS del *Lactobacillus casei* y optimización de los parámetros propuestos. Proyecto de grado Ingeniero de Producción Agroindustrial e Ingeniero Industrial. Chia-Cundimarca: Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniera. Ingeniera de Producción Agroindustrial, 2004. 82 p.

<sup>101</sup>LEÓN. Op cit., p. 38.

evidenciado en la mayor producción de ácido láctico tal como se presenta en la tabla 9.

**Figura 8. pH de los medios MRS y Pro y UFC/mL de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas**



**6.7.3 Determinación de consumo de azúcares totales.** El azúcar total en los medios MRS y Pro presentaron valores de 4,36 mg/L y 33,48 mg/L respectivamente a las 16:48 horas y 14:24 horas de efectuada la cinética. Por lo cual, se evidencia como *L. casei* en este tiempo va utilizando este sustrato más eficientemente para crecimiento en el medio Pro que en el medio MRS.

Mediante el análisis de regresión se relacionó el consumo de azúcares totales y la formación de UFC/mL expresadas como logaritmo natural (Ln) hasta la fase logarítmica de crecimiento a través del tiempo durante el proceso fermentativo. La pendiente de la recta ( $B_1$ , -0.4355) en el medio MRS (Anexo R) indica que, en promedio, a cada incremento de una unidad logarítmica de UFC/mL, se consume el azúcar total en 0.4355 mg/L; igualmente sucede en el medio Pro que presenta un valor de  $B_1$ , -1.228 (Anexo S), lo que significa que 1.228 mg/L de azúcar son consumidos por cada unidad Ln UFC/mL.

Comparando los dos valores de las variables independientes, se observa que el valor del medio Pro es mayor comparado con el medio MRS, por lo tanto se considera que el consumo de azúcar es menor en el medio MRS, que en el medio probiótico, donde la concentración de azúcares es más significativa dadas las condiciones de las materias primas utilizadas en la elaboración de este,

permitiéndole a los microorganismos contar con una mayor cantidad de nutrientes, sin que estos lleguen a ser un factor limitante para su crecimiento.

Según Ramírez *et al.*<sup>102</sup>, las BAL requieren para su multiplicación de azúcares como lactosa y glucosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento; la leche constituye un medio especial y satisfactorio para la proliferación de este tipo de bacterias. La mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotéico, ácido fólico) y varios aminoácidos (Ekinci y Gurel, citados por Parra<sup>103</sup>).

En cuanto al uso de las materias primas para el medio probiótico (Pro), inicialmente se sugirió su preparación con suero de leche, azúcar, salvado de trigo y leche de soya, a pesar, se consideró una variación en cuanto al suero de leche que fue reemplazado por leche en polvo, debido a su disponibilidad, características de conservación y composición del mismo. Los componentes que ofrece la leche: proteínas, carbohidratos (lactosa), vitaminas y minerales, la convierten en una materia prima con alto valor nutricional, que pueden ser muy bien aprovechados por los microorganismos durante los procesos de fermentación.

En general, para que *L. casei* se implante y colonice dentro del tracto del animal, es indispensable que disponga de una dieta rica en sustratos prebióticos, algunos de estos son de naturaleza lignocelulósica (oligosacáridos, fructooligosacáridos, fibra, cereales), derivados de la lactosa (galactooligosacáridos, lactulosa, lactitol), inulina entre otros; para este caso la función como prebiótico la cumple el salvado de trigo (fibra insoluble) (Holzapfel citado por Jurado<sup>104</sup>).

La leche de soya es una buena fuente de hidratos de carbono, principalmente sacarosa, rafinosa y estaquiosa, así como proteínas y magnesio; durante la fermentación, más del 60% del contenido inicial de estaquiosa, rafinosa y sacarosa en la leche de soya se metaboliza por las bacterias (Ben *et al.*<sup>105</sup>). El

---

<sup>102</sup> RAMÍREZ, José., ROSAS, Petra., VELÁSQUEZ, Martha., ULLOA, José y ARCE, Francisco. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente Año 2. Abril-Junio, 2011, no. 7, p. 1-16.

<sup>103</sup> PARRA, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. En: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Enero – Junio, 2010, vol. 8, no. 1, 95 p.

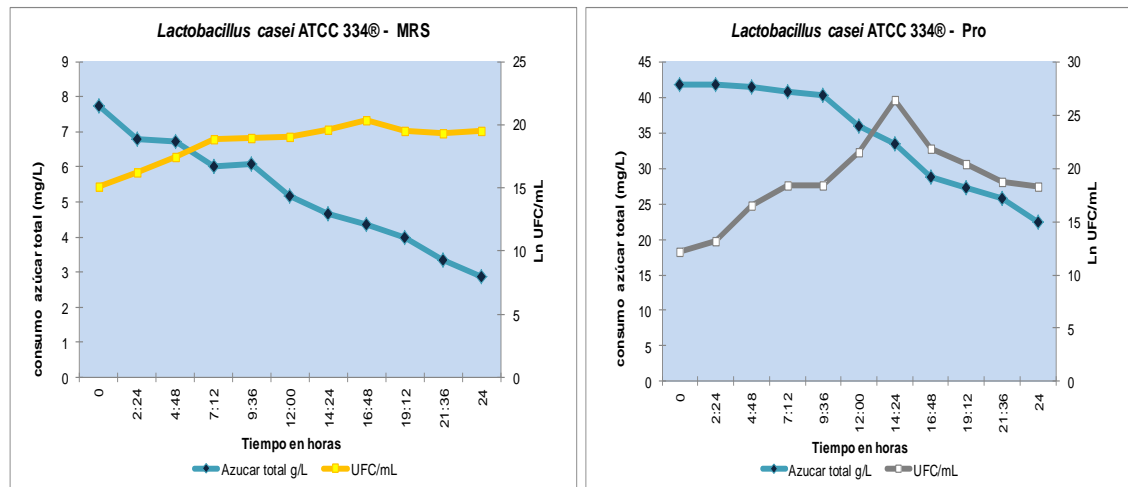
<sup>104</sup> JURADO. Op cit., p. 87.

<sup>105</sup> BEN, W.; CHAMPAGNE, CP.; MAKHLOUFA, J. y BAZINET, L. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. En: Elsevier Science. Septiembre, 2008, vol. 229, no. 1-3, p.192-203.



azúcar es otra fuente importante de carbono, que favorece la producción de energía y la producción del ácido láctico

**Figura 9. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/mL medio MRS y Pro**



**6.7.4 Determinación de producción de ácido láctico.** Las bacterias ácido lácticas corresponden a un grupo amplio de bacterias, entre ellas los dos grandes grupos, las homofermentativas y las heterofermentativas, caracterizándose principalmente por sus productos finales. Para el primer caso, su producto final ácido láctico es generado entre un 80 y 90%, las siguientes en las cuales se ubica la cepa de estudio *Lactobacillus casei* producen al menos un 50% de ácido láctico más otros compuestos tales como el ácido acético, CO<sub>2</sub> y etanol.

La producción de ácido láctico se ve reflejado debido a que pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) como producto de la fermentación. El ácido láctico es considerado un metabolito producto de la fermentación generado por ciertos microorganismos y es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Parra<sup>106</sup>). En respuesta al ensayo el ácido láctico en los medios MRS y Pro presentaron porcentajes de 0,36% y 0,71% respectivamente, datos correspondientes reportados para el tiempo 7 y 6, evidenciando una mayor producción de ácido para el medio Pro (Figura 10). Según, Samaniego y Sosa<sup>107</sup>,

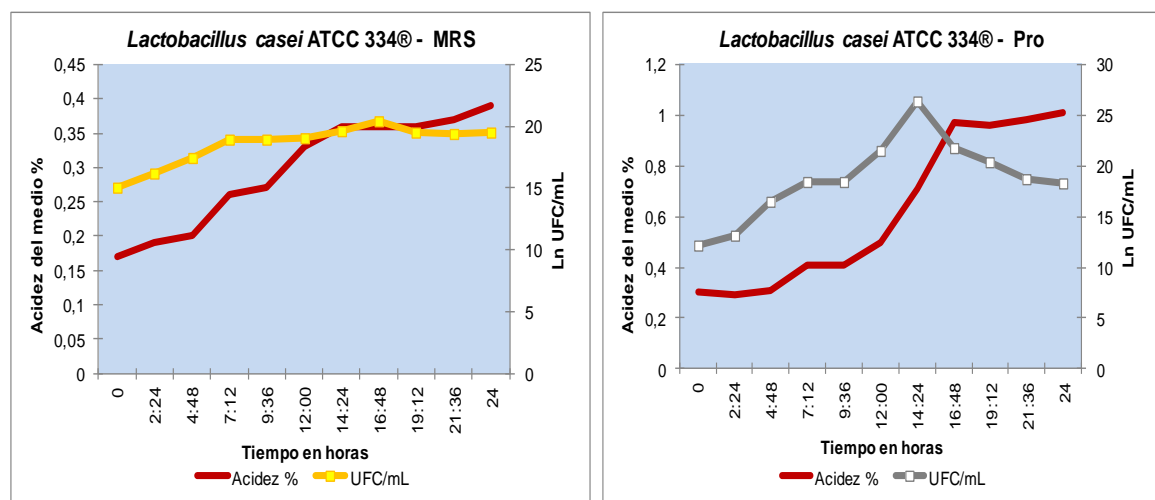
<sup>106</sup>PARRA. Op. cit., p. 98.

<sup>107</sup>SAMANIEGO, Luz y SOSA, Maryla. *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*, Reseña. [online]. [Citado 23 mayo 2012]. Disponible en: <<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>>

esta producción de ácido láctico se da a partir de la fermentación de las hexosas a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff. Además, el potencial de la producción de ácido láctico así como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas principalmente de las cepas probióticas se ve reflejado por su papel bactericida, su acción se da por atacar el metabolismo de las bacterias patógenas o atacar sus estructuras como por ejemplo, la membrana citoplasmática (González, Gómez y Jiménez<sup>108</sup>).

Por otro lado, se puede observar que la producción de ácido láctico se incrementa simultáneamente al consumo de azúcares, su aumento se puede dar hasta el agotamiento del azúcar en el medio, incluso luego del crecimiento celular se continuaría produciendo este metabolito. Savadogo *et al.*, citados por Parra<sup>109</sup> reiteran el uso de carbohidratos fermentables y alcoholes empleados como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico.

**Figura 10. Acidez (%) de los medios MRS y Pro y UFC/mL de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas**



La producción de ácido láctico fue valorada mediante análisis de regresión, en el cual se relacionó la variación del efecto del ácido láctico sobre la producción de microorganismos expresada como Ln UFC/mL, para el medio MRS (Anexo T) la primera variable como fuente dependiente representada como una variación positiva de 0,03846 % de ácido láctico influye de manera positiva sobre la variable dependiente incrementando en una unidad Ln UFC/mL. En el caso del medio Pro

<sup>108</sup> GONZÁLEZ, Blanca; GÓMEZ, Marivel y JIMÉNEZ, Zacarías. Bacteriocinas de probióticos. *En: Revista Salud Pública y Nutrición RESPYN*. Abril-Junio, 2003, vol. 4, no. 2, p. 99-106.

<sup>109</sup> PARRA. *Op cit.*, p. 98.

los resultados fueron similares, por cada incremento en una unidad de Ln UFC/mL la acidez se incrementa en 0,01929%, un estado muy favorable debido al hecho que durante en la cinética tal evento marca cierta diferencia para establecer el punto exacto para la cosecha del cultivo probiótico.

Los resultados de la cinética de crecimiento en relación a: pH final, UFC/mL, azúcar total (mg/L) y ácido láctico (%) para *L. casei* en los medios MRS y Pro utilizados como sustrato aparecen en la tabla 9.

**Tabla 9. Resultados de la cinética comparativa de la cepa *Lactobacillus casei* en los medios seleccionados**

Tiempo Horas	Medio MRS				Medio Pro			
	UFC/mL	pH	% Acido Láctico	Azúcar mg/L	UFC/mL	pH	% Acido Láctico	Azúcar mg/L
T0 (0h)	3,5 x 10 <sup>6</sup>	7,5	0,17	7,74	2,0 x 10 <sup>5</sup>	7,35	0,3	41,81
T1 (2:24h)	1,1 x 10 <sup>7</sup>	7,42	0,19	6,80	5,0 x 10 <sup>5</sup>	7,52	0,29	41,81
T2 (4:48h)	4,0 x 10 <sup>7</sup>	7,31	0,2	6,73	1,5 x 10 <sup>7</sup>	7,45	0,31	41,41
T3 (7:12h)	1,6 x 10 <sup>8</sup>	6,77	0,26	6,02	1,0 x 10 <sup>8</sup>	7,37	0,41	40,86
T4 (9:36h)	1,7 x 10 <sup>8</sup>	6,37	0,27	6,09	1,0 x 10 <sup>8</sup>	7,19	0,41	40,30
T5 (12h)	1,9 x 10 <sup>8</sup>	6,07	0,33	5,16	2,2 x 10 <sup>9</sup>	6,76	0,5	36,02
T6 (14:24h)	3,5 x 10 <sup>8</sup>	5,98	0,36	4,66	3,0 x 10 <sup>11</sup>	6,01	0,71	33,48
T7 (16:48h)	7,3 x 10 <sup>8</sup>	5,94	0,36	4,36	3,0 x 10 <sup>9</sup>	5,84	0,97	28,85
T8 (19:12h)	3,2 x 10 <sup>8</sup>	5,88	0,36	3,98	7,5 x 10 <sup>8</sup>	5,74	0,96	27,29
T9 (21:36h)	2,5 x 10 <sup>8</sup>	5,78	0,37	3,35	1,4 x 10 <sup>8</sup>	5,62	0,98	25,70
T10 (24h)	3,0 x 10 <sup>8</sup>	5,74	0,39	2,86	9,0 x 10 <sup>7</sup>	5,57	1,01	22,44

**6.7.5 Evaluación de la producción de biomasa.** Los resultados de la producción de biomasa, relacionados con la velocidad específica de crecimiento ( $\mu\text{h}^{-1}$ ), fase de latencia (fase lat), fin de la fase logarítmica, tiempo de duplicación celular (minutos), incremento celular total y de la fase logarítmica, consumo de azúcares

totales y de la fase logarítmica, así como el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), aparecen en la tabla 10.

**Tabla 10. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus casei* en dos medios de cultivo**

<i>Lactobacillus casei</i>	Medio	
	MRS	Pro
Fase latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento ( $\mu h^{-1}$ )	0,705	2,187
Fin fase log (h)	16:48	14:24
Tiempo de duplicación (min)	59	19
Incremento cel. Total	3E+08	8,9E+07
Incremento cel. Fin fase log	7,3E+08	3,0E+11
% azúcares consumidos totales (g/L)	62,99	46,32
% azúcares consumidos fin fase log (g/L)	48,52	31,00
$R^2$	0,910	0,938

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética en el medio Pro, resultó ser el más adecuado para la elaboración de inóculos probióticos en posteriores investigaciones *in vivo*, ya que durante el proceso de fermentación efectuado *Lactobacillus casei* alcanzó el valor mayor de  $\mu h^{-1}$ , y por lo tanto, el tiempo de duplicación celular es menor, lo que se ve reflejado al haber alcanzado una mayor concentración celular en la fase logarítmica a las 14:24 horas. Se puede notar en este sentido, una clara diferencia con respecto al medio MRS, por cuanto, en este medio el valor de  $\mu h^{-1}$  fue inferior y con una diferencia muy significativa para *L. casei* que mostró un valor de 0,705 ( $\mu h^{-1}$ ), lo que indica que usar el medio comercial MRS para elaborar inóculo no sería viable debido a que presentaría un tiempo de duplicación celular muy elevado y esto implica que al llegar a la fase logarítmica la concentración celular será mucho menor, con respecto al medio Pro, como se pueden observar en los resultados encontrados.

Por otro lado, se debe tener en cuenta los costos de producción de los dos medios, ya que estos son de gran interés por cuanto es factible el proceso de producción a nivel industrial en la elaboración de inóculos. De acuerdo con Jurado<sup>110</sup>, el costo de 500 gramos del medio comercial MRS es aproximadamente \$ 210.000 (108.46 dólares), y el costo de elaboración de un litro de este medio comercial es de \$ 27.142.86 (14.02 dólares); mientras, que el costo de la materia prima para la producción de un litro de inóculo con un medio a base de azúcar,

<sup>110</sup> JURADO. Op. cit. p. 94.

suero de leche, salvado de trigo, leche de soya es de \$ 1.482.48 (0.77 dólares). En el caso del medio Pro a partir azúcar blanco, leche de soya, salvado de trigo y leche en polvo de acuerdo a la investigación el costo por litro del medio probiótico asciende a \$ 2.775 (1,42 dólares).

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 CONCLUSIONES

Una vez efectuada la cinética de fermentación para *Lactobacillus casei* se determinó el tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica en los medios MRS y Pro, que fue a las 16:48 horas (T7) y 14:24 horas (T6) respectivamente.

El crecimiento bacteriano expresado como UFC/mL demostró valores de  $7,3 \times 10^8$  UFC/mL para MRS y  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL para Pro, este último con índices superiores al medio comercial, convirtiéndose así en una alternativa útil para el cultivo de la cepa probiótica.

En el medio Pro el consumo de azúcar total fue de 33,48mg/L en comparación con el medio MRS de 4,36 mg/L a las 14:24 horas y 16:48 horas de efectuada la cinética. Por lo cual, se evidencia como *L. casei* en este tiempo va utilizando este sustrato más eficientemente para crecimiento en el medio Pro que en el medio MRS.

Los valores de pH y acidez encontrados en los tiempos de cinética favorecen los procesos de fermentación y producción de inóculos. Al finalizar la cinética después de transcurridas las 24 horas (T10) los valores finales fueron 5.74 y 5.57 para pH y 0.39 y 1.01 para % de ácido láctico en los medios MRS y Pro, respectivamente

Las grandes ventajas del medio probiótico en la preparación de inóculos se ve reflejada en la facilidad de la adquisición de las materias primas, su aprovechamiento y relativo bajo costo de producción. En base a un litro de medio probiótico producido el valor es de \$ 27.142.86 (14.02 dólares) para el medio comercial MRS, mientras que para el medio Pro únicamente es \$ 2.775 (1,42 dólares).

Los ensayos de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* contra *Yersinia pseudotuberculosis* demostraron el gran potencial probiótico de la cepa utilizada, al formarse halos de inhibición entre 2 y 3 mm en la prueba.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana evidenció que la bacteria patógena presenta sensibilidad intermedia a trimetoprim- sulfametoxazol, es resistente a la

cefalotina, cefepima, dicloxacilina y penicilina, y es sensible a ciprofloxacina, enrofloxacin y gentamicina; mientras que para la bacteria láctica es resistente a penicilina y sensible a los otros antibióticos.

La acción inhibitoria por sobrenadantes mediante técnicas de difusión en agar resalta la inhibición efectiva sobre la cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* con halos de formación con medidas entre 2 y 8 mm.

Mediante la prueba de inhibición *in vitro* de la *Lactobacillus casei* sobre la bacteria patógena se demuestra que la cepa tiene un gran potencial probiótico para ser utilizada como mecanismo de prevención de la enfermedad de *Yersinia pseudotuberculosis*.

*Lactobacillus casei* ATCC 334, presentó resistencia tanto a sales biliares y bilis bovina, como a los diferentes pH, y temperaturas, proponiéndola como una cepa potencialmente probiótica.

La utilización de procesos modernos como la biotecnología animal fortalecen los sistemas de estudio, aportando al productor grandes beneficios en sus procesos productivos mejorando el bienestar animal, equilibrio del estado sanitario y mayor aprovechamiento.

## 7.2 RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones *in vivo* en la especie cuyícola que demuestren la actividad de *Lactobacillus casei* como probiótico y como agente benéfico para prevenir la enfermedad de *Yersinia pseudotuberculosis*.

El medio Pro con leche en polvo, salvado de trigo, leche de soya y azúcar se recomienda para el desarrollo, crecimiento y metabolismo de *Lactobacillus casei* por los resultados obtenidos en esta investigación.

El efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* fue positivo sobre el patógeno de *Yersinia pseudotuberculosis*, sin embargo, es conveniente realizar la aplicación de otros métodos de inhibición para tener mayor certeza de los resultados encontrados.

Las pruebas *in vitro* son un gran avance para definir el comportamiento de microorganismos probióticos frente a patógenos, igualmente, se hace necesario adelantar estudios en los cuales se integre directamente el factor animal mediante pruebas *in situ*.

Realizar pruebas para determinar qué tipo de proteínas específicas produce la bacteria láctica *Lactobacillus casei* para definir el efecto microbiano contra la bacteria patógena.

Llevar a cabo pruebas de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) sobre la cepa probiótica con el fin de cuantificar la producción de ácidos orgánicos.



## BIBLIOGRAFÍA

AGUAVIL, Juan. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler. Proyecto de Investigación Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida, 2012. 103 p.

AMAYA, María y CALLE, Liliana. Avances en la producción de una vacuna viva contra *Yersinia pseudotuberculosis* y evaluación de su efectividad mediante un ensayo de infección experimental en *Cavia porcellus*. Trabajo de Grado Medicina Veterinaria. Bogotá D.C: Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria, 2008. 65 p.

BEN, W.; CHAMPAGNE, CP.; MAKHLOUFA, J. y BAZINET, L. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. En: Elsevier Science. Septiembre, 2008, vol. 229, no. 1-3, p.192-203.

CABEZA, Enrique. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. [online]. [Citado 10 mayo 2013] Disponible en:<[http://www.academia.edu/992789/Bacterias\\_acido-lacticas\\_BAL\\_aplicaciones\\_como\\_cultivos\\_estarter\\_para\\_la\\_industria\\_lactea\\_y\\_carnica](http://www.academia.edu/992789/Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_lactea_y_carnica)>

CAI, Yimin; BENNO, Yoshimi; NAKASE, Tasakashi and OH, Tae-Kwang. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. En: Journal Genealogy Applied Microbiology. 1998, vol. 44, p. 311-316.

CAI, Yimin; SUYANANDANA, Puangpen; SAMAN, Premasuda and BENNO, Yoshimi. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: Journal Genealogy Applied Microbiology. 1999, vol. 45, p. 177-184.

CAYCEDO, A.; ZAMORA, A.; ECHEVERRY, S.; ENRÍQUEZ, R.; ORTEGA, E.; BURGOS, M. y CAYCEDO, C. Producción Sostenible de Cuyes. Alternativa Económica para la conservación de Cuencas Hidrográficas en Nariño. Pasto, Colombia, 2011. 238 p. ISBN 978-958-8609-00-3.

CASTRO, Marilce y RODRÍGUEZ, Fernando. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción Animal. En: Revista Corpoica. Enero-Junio, 2005, vol. 6 no. 1, p. 1-8.

CENTRO DE CONTROL DE PRODUCTOS PARA DIANOSTICOS LTDA CECON. [online]. [Citado 2 mayo 2012] Disponible en: <<http://www.ceconsp.com.br/>>

CHEEKE, Peter. Alimentación y nutrición del conejo. Zaragoza (España): Acribia, S.A., 1995, 429 p. ISBN: 84-200-0783-8.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Information Supplement. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Diciembre, 2011, vol. 3, no. 001, 172 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Agricultura limpia. Buenas Prácticas Agrícolas. 16 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Decreto 1840 (3, agosto, 1994). Por el cual se reglamenta el artículo 65 de la Ley 101 de 1993. Diario oficial. Bogotá, D.C.: El Ministerio, 1994. no. 41.473. 11 p.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Resolución 302 (10, diciembre, 2007). Por la cual se establece la política de precios en materia de insumos agropecuarios. Bogotá, D.C.: El Ministerio, 2007. 5 p.

COLLINS, Matthew; PHILLIPS, Brian y ZANONI, Paolo. Deoxyribonucleic acid homologystudies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. paracasei and subsp. tolerans, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. En: International Journal of Sytematic Bacteriology. Abril, 1989, vol. 39, no. 2. p. 105-108.

CORREA, Ramón. Limitante sanitarias en la producción de cuyes en Colombia alternativas de solución. En: Seminario taller sobre nuevos avances en la Cuyecultura Latinoamericana. Memorias. Universidad Mayor de San Simón Proyecto Mejocuy. Cochabamba Bolivia. 1997. 149 p.

CORREA, Ramón. Sanidad en cuyes. En: Memorias del V curso y V congreso Latinoamericano de Cuyicultura y Mesa Redonda sobre Cuyicultura Periurbana. Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela. 1999. 159 p.

CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, 413 p. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

DAHL, Thomas; MIDDEN, W. Robert and HARTMAN, Philip. Comparison of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. En: Journal of Bacteriology. Abril, 1989, vol. 171, no. 4.7 p.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M. y RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria- Potential for control of mouldgrowth and mycotoxins: A review. En: Food Control. Abril, 2010, vol.21, no. 4, p.370-380.

DUBOIS, Michel; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. and SMITH, Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. En: Anal Chem. 1956, vol. 28, p. 350-356.

Drug\_Dosage. [online]. [Citado 04 Febrero 2013] Disponible en: <<http://www.avicenna.ac.ir/Documents/Research/En/Lab/Drug-Dosage.pdf>>

ESCOBAR, Ana. Comportamiento poblacional de *Lactobacillus casei* en un medio a base de suero de leche. Trabajo de Grado Biólogo. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Programa de Biología, 2008. 75 p.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 2.0, valid from 2012-01-01. [online]. [Citado 2 mayo 2012] Disponible en: <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_2.0\\_120221.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf)>

FAO. Sanidad en Cuyes. [online]. [Citado 19 Octubre 2012] Disponible en: <<http://www.fao.org/docrep/W6562S/w6562s07.htm>>

FAO. Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación 85. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina, 2001. 52p. ISBN 92-5-305513-8.

FARINANGO, Héctor. Evaluar la incidencia de la levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) en la fase de recría y engorde del cuy (*Cavia porcellus*). Trabajo de grado Ingeniero Agropecuario. Ibarra- Ecuador: Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Escuela de Ingeniería Agropecuaria, 2010. 9 p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. En: Journal of Applied Bacteriology. Enero, 1989, vol. 66, p. 365-378

GARCÍA, Diego. y JEREZ, Jorge. Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de BLIS del *Lactobacillus casei* y optimización de los parámetros propuestos. Proyecto de grado Ingeniero de Producción

Agroindustrial e Ingeniero Industrial. Chia-Cundimarca: Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniería. Ingeniería de Producción Agroindustrial, 2004. 82 p.

GONZÁLEZ, Blanca; GÓMEZ, Marivel y JIMÉNEZ, Zacarias. Bacteriocinas de probióticos. En: Revista Salud Pública y Nutrición RESPYN. Abril-Junio, 2003, vol. 4, no. 2, p. 99-106.

GREGORET, Verónica. Cepas autóctonas de *Lactobacillus* aisladas de neonatos santafesinos para el desarrollo de alimentos probióticos. Aspectos tecnológicos. Herramientas moleculares para su detección en alimentos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santa Fe-Argentina: Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química, 2011. 171 p.

GUEVARA, Jorge. Probióticos en Nutrición Animal. Revisión bibliográfica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, 2011. 11 p.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Buenas prácticas en el uso de los medicamentos veterinarios y la inocuidad de los alimentos. Bogotá, 2007. 18 p.

IÑIGUEZ, P.; PEREZ, R. y ACEDO, F. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. En: Revista Latinoamericana de Microbiología. Julio-septiembre, 2007, vol. 49, no. 3-4, p. 46-54.

JIMÉNEZ, Sabrina. Identificación de proteínas de secreción con capacidad inmunogénica de aislamientos de *Yersinia pseudotuberculosis* provenientes de planteles cuyícolas del departamento de Nariño. Trabajo de Magíster en Ciencias Biológicas, énfasis Microbiología Médica. Bogotá D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2011. 123 p.

JURADO, Henry. 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. Valle del Cauca: Universidad del Valle. Escuela de ingeniería de alimentos, 2009. 170 p.

KANDLER, O, y WEISS N. Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, PH Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt (Eds). Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1986. 1208-1235 p. 2 ed.

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. 1981, vol. 2, no. 25, p. 1-15.

LEÓN, Ma Fernanda. Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado Licenciatura en Bioquímica. Montevideo-Argentina: Universidad de la República. Facultad de Ciencias, 2012. 54 p.

LILLY, D. M. y STILWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. En: Science. Febrero, 1965, no. 147, p. 747-748.

LÓPEZ, J; OCHOA, A.; SANTOYO, G.; ANAYA, L.; MEDINA, E; MARTÍNEZ, M. Y LOEZA, P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. En: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Julio-septiembre, 2008, vol. 39, no. 3, p. 49-57

LOZANO; María y ARIAS, Diana; Residuos de Fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Febrero, 2008, vol. 21, p 121-135.

MACK DR.; AHRNÉ, S.; HYDE, L.; WEI, S. y HOLLINGSWORTH, MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. En: Journal of Gastroenterology and Hepatology GUT. January, 2003, vol. 52, no. 6, p. 827–833.

MACOUZET, Martín. Prebióticos, componente clave de la producción animal moderna. [online]. [Citado 19 Octubre 2012]. Disponible en: <<http://www.invdes.com.mx/suplemento-noticias/1049-prebioticos-componente-clave-de-la-produccion-animal-moderna?format=pdf>>

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John; DUNLAP, Paul y CLARK, David.Brock. Biología de los microorganismos. 12 ed. Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2009. 1260 p. ISBN: 978-84-7829-097-0.

MENEZES, Mario and GIL, Carlos. Probiotics and immune response. En: Revista Ciencia Rural, Santa María. Julio-agosto, 2004, vol. 34, no. 4, p. 1297-1303.

MENNICKENT, Singrid y GREEN, Karina. Los probióticos y su utilidad terapéutica. En: Ciencia Ahora. Julio-diciembre, 2009, no. 24, p. 31-38.

MOLINA, Mónica. Efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde. Trabajo de grado Ingeniería Agropecuaria. Sangolqui-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida, 2012. 139 p.

MONTES, Andrea; SANTACRUZ, Ayday SAÑUDO, Jessie. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de

*Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias matemáticas y naturales, 2003. 85 p.

MORA, Nancy y GARCÍA, Andrés. Susceptibilidad de Bacterias ácido láctica (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis Licenciado en Química de Alimentos. Hidalgo-México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, 2007. 123 p.

NAVA, GM y DÁVILA, V. Nuevas perspectivas en la selección y evaluación de probióticos. En: Revista Chilena de Nutrición, Santiago. Noviembre, 2004, vol. 31, no. 1, p. 184-185.

NEWMARK, F.; SANTOS, M; CHAVES, A; MORA, J.; ARIAS, J. y ZEA, S. Manual de métodos de bioactividad. [online]. 2005 [Citado 2 mayo 2013]. pp. 1-28. Disponible en: <[www.invemar.org.co](http://www.invemar.org.co)>

ORTIZ, Ana y MARTÍNEZ, Martha. Inocuidad Alimentaria: Panorama en Colombia. En: Conexión Agropecuaria JDC. Julio-Diciembre, 2011, vol. 1, no. 1, p. 37 – 44.

OUWEHAND, A.; SALMINEN, S. y ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. In: Antonie van Leeuwenhoek. August, 2002, vol. 82, no. 1-4, p. 279-289.

PANIAGUA, Gloria; MONROY, Eric; VACA, Sergio y GONZALES, Susana. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. En: Revista Médica del Hospital General de México. Enero-Marzo, 2003, vol. 66, no. 1, p. 13-21.

PARRA, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. En: Facultad de ciencias agropecuarias. Enero – junio 2010, vol. 8, no. 1, p. 93-105.

PATIÑO, Roció; RODRÍGUEZ, José; ORTIZ, Diego; TORO, Rubén; JIMÉNEZ, Gabriel; BOLAÑOS, Marco; VALENCIA, Héctor; CAICEDO, Alberto; BENAVIDES, Janeth; BENAVIDES, Katia y ENRÍQUEZ, Andrea. Caracterización molecular de cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* aisladas de lesiones en *Cavia porcellus* (Cuyes) del departamento de Nariño y su relación epidemiológica con la presentación de *Yersiniosis*. Pasto, Nariño. 2007. 74 p.

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE (PNUMA). Manual de Producción más Limpia: Un paquete de recursos de capacitación. [online]. [Citado 23 octubre 2012]. Disponible en: <[http://www.pnuma.org/industria/produccionlimpia\\_manual.php](http://www.pnuma.org/industria/produccionlimpia_manual.php)>

RATTANACHAIKUNSOPON, P. y PHUMKHACHORN, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. En: Annals of Biological Research. 2010, vol. 1, no. 4, p. 218-228.

RAMÍREZ, José; ROSAS, Petra; VELÁSQUEZ, Martha; ULLOA, José y ARCE, Francisco. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente Año 2. Abril-Junio, 2011, no. 7, p. 1-16.

RAMÍREZ, María. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis Licenciado Químico en Alimentos. Pachuca de Soto, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, 2005. 86 p.

RAMÍREZ, Cristina. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos. Curitiba: Setor de Tecnologia, Universidad Federal do Paraná, 2005. 173 p.

REVELO, Alex y TOBAR, Mario. Estudio de los principales medicamentos utilizados en las explotaciones cuycólicas del municipio de Pasto. Tesis de grado Médico Veterinario. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2009. 82 p.

RICHARDSON, V.C.G. Diseases of domestic guinea pigs. 2da ed. USA: Blackwell Science Ltda., 2000. 154 p. ISBN 0-632-05209-0.

RODRIGUEZ, L.; BUENO, G.; RODRÍGUEZ, DE; DELGADO, G.; SERRANO, P. and BRIZUELA, MA. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. En: New Horizons Biotechnology. 2003, p. 163-172

ROISSART, H. de, y LUQUET, F. Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques. Vol. 2 France: Ed. Loriga, 1994. 614 p. ISBN 2950747701.

ROSMINI, M.; SEQUEIRA, G.; GUERRERO, I.; MARTI, L.; DALLA, R.; FRIZOO, L. y BONAZZA, J.C. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. En: Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2004, vol.3, no 002, p.181-191

RUALES, Bertha, y VALLEJO, Vladimir. Producción de Biomasa de *Lactobacillus casei* empleando diferentes tipos de sustratos. Tesis de Grado Ingeniería Agroindustrial. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial, 2007. 147 p.

SAMANIEGO, Luz y SOSA, Maryla. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora, Reseña. [online]. [Citado 23 mayo 2012]. Disponible en: <<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>>

SANTACRUZ, Yolanda. Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana. Tesis de Maestría en Biotecnología. Cholula-Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias, Departamento de Química y Biología, 2004. 94 p.

SECRETARIA DE AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE DE NARIÑO. Consolidado Agropecuario Nariño 2010. San Juan de Pasto. 2010. 121 p.

SIEGRIST, Jvo. Genus *Yersinia*. Detection, identification, differentiation and cultivation of *Yersinia* species. En: MicrobiologyFocus. 2010, vol. 23, 8 p.

SUMANO, Héctor y OCAMPO, Luis. Farmacología Veterinaria. 3 ed. España, Madrid: McGraw-Hill, 2006. 1082 p. ISBN: 9789701056967.

SWAFFHAM, Soulsby de, Lord. El uso de antibióticos en producción animal y la resistencia antimicrobiana. En: Reunión Interamericana en Salud Animal a Nivel Ministerial (11: 13-15, abril: Washington D.C.). Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 1999. 18 p.

TAGG, J. y McGIVEN, A. Assay system for Bacteriocins. En: Applied Microbiol. Mayo, 1971, vol. 21, no. 5, 943 p.

TOIT, M.; FRANZ, CM.; DICKS, LM.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F. and HOLZAPFEL, WH. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. En: Journal Food Microbiology. 1998, vol. 40, p. 93-104.

VERGIO, F. Anti-Und Probiotika. Hipócrates. 1954, no. 13, p. 1103-1108.

WILLEY, Joanne; SHERWOOD, Linda y WOOLVERTON, Christopher. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7 ed. Aravaca, Madrid McGraw Hill-Interamericana de España, S.A.V., 2008. 582 p. ISBN: 978-0-07-299291-5.

ZAMUDIO, Karín, y ZAVALETA, Amparo. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. En: Ciencia e Investigación. 2003, vol.6, no. 1, p. 30-35.



ZAPATA, Sandra; MUÑOZ, Juliana; RUIZ, Orlando; MONTOYA, Olga y GUTIÉRREZ, Pablo. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. En: VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Enero, 2009, vol. 16, no. 1, p. 75-82.

# **ANEXOS**

## ANEXOS

### **Anexo A. Manejo general de ampollas para *Yersinia pseudotuberculosis***

El manejo general de las ampollas es importante, por eso se debe tenerse cuidado al abrir la ampolla así como de los contenidos en el vacío. Para una correcta utilización del contenido del material se debe seguir las siguientes indicaciones:

- Marcar la ampolla (un marcador de diamante es ideal) cerca de la mitad de la clavija de algodón y aplicar una varilla de vidrio al rojo vivo para romper el vidrio.
- Dejar un tiempo para que el aire se filtre por el tapón hasta la ampolla, luego retirar suavemente la parte superior acentuada. (Si la parte puntiaguda se desprende súbitamente el tapón se sentirá atraído por un extremo y la apertura puede liberar partículas finas de organismos secados al aire del laboratorio. El tapón puede ser impregnado de cultivo y debe ser considerado como peligroso el cual se debe manejar y eliminar con pinzas).
- Flamear el extremo abierto del tubo y sacar el tapón de algodón estéril. El tapón y el extremo puntiagudo de la ampolla se deben tratar como infectados y deben ser esterilizados.
- Con una pipeta Pasteur, añadir cerca de 0,5 ml de caldo nutritivo (agua para hongos) a la ampolla y mezclar el contenido con cuidado para evitar la formación de espuma o la creación de aerosoles. La viabilidad del cultivo, a veces puede mejorarse, dejando el contenido rehidratarse durante unos minutos antes de transferir la suspensión de la ampolla.
- Según los requisitos de gases y de crecimiento, la suspensión del caldo debe ser resembrado en un medio adecuado o medio elegido preferentemente incluir un medio sólido, tanto para obtener colonias individuales y para detectar contaminantes aéreos que se pueden introducir durante la apertura de la ampolla.
- Los medios utilizados deben ser no-selectivos y la temperatura óptima de crecimiento debe ser utilizada para mejorar la recuperación de los contenidos de la ampolla.
- Una vez que se cuente con crecimiento del microorganismo se puede realizar un cultivo a medios selectivos y llevar a incubación a temperaturas apropiadas para el organismo.

## **Anexo B. 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 C. Evaluación de la acción inhibitoria de *Lactobacillus casei* sobre *Yersinia pseudotuberculosis***

Previo a la realización de la prueba se sembró y verifico la pureza de las bacterias a utilizar de acuerdo a lo requerido. En el caso de *Lactobacillus casei*, fue sembrada a partir de bacterias lácticas que fueron cultivadas en caldo MRS por 24 horas. Luego se ajustó a escala Mac Farland 0.5 y sembró en cajas petri con agar MRS y azul de anilina a diferentes cantidades de 25µl, 50 µl, 100 µl y por estría y se llevó a incubar por 24 horas/32°C.

La bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis* se cultivó de un medio sólido a medio líquido para lo cual se utilizó caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) llevándose a incubación por 24 horas /37°C.

- Posterior al cultivo de las bacterias, se procedió primero a tomar la bacteria patógena y se la ajustó a escala Mac Farland 0.5 ( $1,5 \times 10^8$  bact/mL) y sembró en cajas petri con agar Mueller Hinton y agar TSA (Tryptona Soja Agar)
- A continuación de la bacteria láctica sembrada a diferentes cantidades se procedió a tomar discos de agar impregnados y se los colocó en el agar Mueller Hinton y TSA previamente impregnado con la bacteria patógena. Los discos se los tomó con un asa estéril y así se retiró los discos de agar impregnados con la bacteria láctica.
- Posteriormente se llevó las cajas de petri sembradas con la bacteria patógena y los discos de agar con la bacteria láctica a incubar a 32°C/12 horas
- Trascorridas las 12 horas se procedió a realizar la lectura de los halos formados. La distancia se midió desde el borde de la bacteria láctica hasta el borde o extremos del halo.

#### **Anexo D. Discos de antibióticos para antibiograma**

**Descripción:** ANTIBIOTIC DISC son discos de papel, con características especiales, impregnadas con antibiótico, utilizados para el test de susceptibilidad según el test de antibióticos de Kirby –Bauer. Los ANTIBIOTIC DISC están previstos en una ancha variedad de configuraciones, para este caso disponible en la variante de 50 test.

**Contenido de los estuches:** La variante de 50 test contiene: 1 cartucho con 50 discos empaquetado en un “blíster” en presencia de un desecador.

**Principio del método:** Los discos se aplican en la superficie de un terreno de cultivo, inoculado con el caldo de cultivo, preparado con colonias puras del microorganismo en examen. Después de la incubación, se examinan las placas, se miden los halos de inhibición alrededor de cada disco y se comparan con los diámetros de los halos de inhibición estándar: de esta manera los microorganismos se definen sensibles, intermedios o resistentes a los agentes antimicrobianos testados.

**Composición:** Los discos están preparados con papel de alta calidad en conformidad con las especificaciones dictadas por la OMS y la FDA. Cada disco está impregnado con cantidades estandarizadas de antibiótico.

**Recolección y conservación de las muestras:** Las colonias que se van a someter al antibiograma se toman de los terrenos de cultivo aplicados precedentemente con la muestra en examen.

En caso de colonias mixtas es necesario proceder a la purificación de las cepas bacterianas antes de la aplicación en las placas para el antibiograma.

## **Antibióticos**

### **CEFEPIMA FEP**

#### **Características del Producto**

Producto	CEFEPIME
Sigla	FEP 30 µg
Contenido de disco antimicrobiano	Cefepime 30 µg

### **CEFALOTINA KF**

#### **Características del Producto**

Producto	CEPHALOTHIN
Sigla	KF 30 µg
Contenido de disco antimicrobiano	Cephalothin 30 µg

### **CIPROFLOXACINA CIP**

#### **Características del Producto**

Producto	CIPROFLOXACIN
Sigla	CIP 5 µg
Contenido de disco antimicrobiano	Ciprofloxacina 5µg

### **DICLOXACILINA DCX**

#### **Características del Producto**

Producto	DICLOXACILLIN
Sigla	DCX 1 µg
Contenido de disco antimicrobiano	Dicloxacillin 1 µg

## GENTAMICINA CN

### Características del Producto

Producto	GENTAMICIN
Sigla	CN 10 µg
Contenido de disco antimicrobiano	Gentamicin 10 µg

## PENICILINA G

### Características del Producto

Producto	PENICILLIN G
Sigla	P 10 IU
Contenido de disco antimicrobiano	Penicillin 10 IU

## Anexo E. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer

Los microorganismos evaluados *Lactobacillus casei* y *Yersinia pseudotuberculosis*, fueron identificados y sembrados en cultivo puro con un día de antelación, así mismo, se preparó el agar Mueller Hinton en el cual se iba a inocular las bacterias para la realización del antibiograma.

### Procedimiento

#### Preparación del inóculo

**Método de crecimiento:** Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionaron de un agar de cultivo. Se tocó la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfirió a un tubo con 1 ml de agua destilada. Los tubos se incubaron a 35°C hasta que alcanzó la turbidez ópticamente comparable del estándar de 0.5 McFarland (aproximadamente 5 minutos). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UCF/mL.

**Inoculación de las placas:** Después de ajustar la turbidez el inóculo se transfirió a las cajas con agar Mueller Hinton y se distribuyó completamente sobre ella utilizando un hisopo de algodón, el inóculo sobrante se desechó.

**Aplicación de los sensidiscos a las placas inoculadas:** Con una pinza se tomó cada disco de antibiótico y se colocó en el centro de cada caja con agar Mueller Hinton, se debe procurar que quede bien sujeto. Las cajas se invirtieron para evitar la acumulación excesiva de humedad y se llevaron a incubación a 35°C por 18 horas.

**Lectura de las placas:** Trascurrido este tiempo se realizó la lectura con una hoja milimetrada, para lo cual se mide el diámetro formado por cada sensidisco.

#### **Anexo F. Obtención del sobrenadante (bacteriocinas) de *Lactobacillus casei***

A partir de la bacteria láctica *Lactobacillus casei*, se procedió a realizar la obtención del sobrenadante de la siguiente manera.

- Se sembró la bacteria de acuerdo a lo recomendado por Crueger y Crueger y se ajustó a una concentración de  $3,0 \times 10^8$  bact/ml, correspondientes a un patrón 1 en la escala de McFarland, a una longitud de onda de 625 nm.
- A partir de la bacteria láctica previamente sembrada y ajustada, se tomaron 1,5 ml de la muestra y se los depositó en tubos eppendorf de 1,5 ml, y se los llevo a centrifugar en una microcentrifuga refrigerada a una temperatura controlada de 4°C, y velocidad de 10.000 rpm/15 minutos. Después de centrifugada la bacteria láctica se observó que se separó en dos fases el sobrenadante y el precipitado (en este caso es la biomasa de las bacterias lácticas)
- Con el sobrenadante ya obtenido, se procedió inmediatamente tomar una muestra cruda del sobrenadante, es decir sin filtrarlo, las demás muestras se procedieron a filtrarlas de la siguiente manera:
  - Usando papel filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un dispositivo para colocar el filtro, y con una jeringa de 5 ml, se extrajo el sobrenadante y se lo filtro en un recipiente plástico estéril para recibir el sobrenadante ya filtrado.
  - Una vez filtrado los sobrenadantes se tomó una muestra y se la neutralizo a pH 6 y otra muestra se sometió a calentamiento a 80°C por 10 minutos.
- Una vez filtrado los sobrenadantes se procedió a guardarlos en nevera a 4°C hasta su posterior uso. Estos sobrenadantes constituyen las posibles llamadas bacteriocinas crudas.

#### **Anexo G. Método modificado por difusión en agar con discos impregnados con el sobrenadante**

Tomando como referencia el método Kirby Bauer, se le realizaron algunas modificaciones para el uso de los discos impregnados de la siguiente manera:



Se recortaron discos de papel pads esteriles utilizados para absorber medios de cultivo con un diámetro de 6 mm y fueron esterilizados durante 15 minutos a 121°C y 15 psi y antes de usar los discos, se esperó a que estos estuvieran a temperatura ambiente y completamente secos.

En cámara de flujo laminar se dispense sobre cada disco 50, 75 y 100 µl de la bacteriocina y se dejó secar durante una hora y así se obtuvo los discos impregnados del sobrenadante.

Luego se siguió el mismo procedimiento que en el método Kirby Bauer para lo cual con un asa se tomó de cuatro a cinco colonias de la bacteria patógena en 1 ml de agua destilada, se incubó por 5 minutos para lograr la turbidez igual al estándar 0.5, con un hisopo de algodón se distribuyó en cajas con agar Mueller Hinton, luego se colocaron los discos impregnados con las diferentes cantidades de sobrenadante con pinzas estériles. Las cajas petri sembradas se incubaron a 35°C por 18 horas. Transcurrido este tiempo se midió el radio del halo formado en milímetros. Un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena

#### **Anexo H. Método de difusión en cilindro plástico**

- Con la bacteria patógena ajustada a escala 0.5 y sembrada en cajas petri con agar Mueller Hinton, se colocó cilindros plásticos estériles de 6mm de diámetro.
- En seguida se procedió a depositar dentro de los cilindros plásticos diferentes cantidades del sobrenadante a razón de 50, 75 y 100 µl.
- Finalmente y sin invertir las cajas se dejaron incubar por 18 horas a 35°C para realizar la lectura, la cual se basa por el tamaño del halo de inhibición formado: un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

#### **Anexo I. Método de difusión en pozos con doble capa modificado**

- En cajas preparadas con agar Mueller Hinton se realizaron 3 pozos empleándose la boca de una punta estéril de 6 mm de diámetro.
- En la base de cada pozo se selló con 0,05ml (50 µl) de agar nutritivo derretido.

- Luego en cada pozo se añadió las respectivas cantidades de bacteriocina indicada (50, 75, 100 µl).
- Aparte se ajustó la bacteria patógena a escala 0,5 McFarland, se mezcla con agar nutritivo derretido a razón del 10% y se vertió sobre el agar formándose una doble capa.
- Las cajas se llevaron a incubar 32°C por 18 horas, tiempo transcurrido donde se midió el radio del halo formado en milímetros, un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

## **Anexo J. Preparación del medio probiótico (Medio Pro)**

### **Reactivos y materiales**

- Leche de soya
- Leche en polvo
- Salvado de trigo (molido finamente)
- Azúcar blanco refinado
- 2 Erlenmeyer de 500 ml cada uno
- Balanza analítica
- Espátula
- Probeta
- Agua destilada
- Autoclave
- Papel aluminio
- Mechero

### **Procedimiento**

- Para la preparación del inóculo probiótico se tuvo en cuenta las siguientes relaciones:
  - Azúcar blanco 10 g/L
  - Leche de soya 15 g/L
  - Leche en polvo; 150 g/L
  - Salvado de trigo 15 g/L
  -
- Establecida la cantidad a preparar se procedió a pesar las materias primas y se depositaron en erlenmeyers con la mitad del volumen total de agua destilada en cada uno, mezclando salvado de trigo - azúcar blanco y leche de soya – leche en polvo.

- La primera mezcla salvado de trigo - azúcar blanco se auto clavó durante 15 minutos a 121°C. La segunda leche de soya – leche en polvo ya disuelta en agua destilada correspondiente se esterilizó a 121°C por 1 minuto.
- Posteriormente se mezclaron en un solo recipiente evitando contaminación y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C.

## **Anexo K. Método de antrona o Dubois**

**Fundamento:** la reacción de antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexouronicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra una absorbancia máxima a 625 nm.

### **Reactivos:**

- Antrona
- Ácido sulfúrico 10% y 96%
- Glucosa anhidro

**Lavado de vidriería con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%.** La vidriería para las dosificaciones como para las diluciones deben estar previamente lavadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, se dejan en remojo los tubos con el mismo ácido 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 transferir 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**

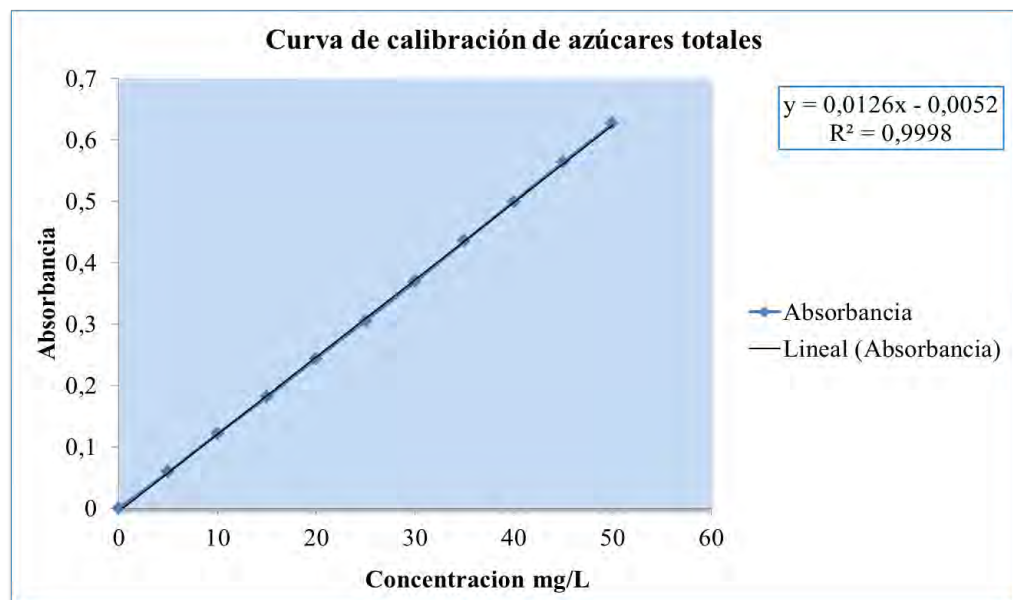
- Se depositan 5 ml de la solución preparada en cada dilución (3 tubos) de los diferentes tubos. Estos tubos se colocan perpendiculares en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex continuamente hasta homogenizar la solución.
- 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 D.O.
- 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 L. 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
1	5	0,059
2	10	0,121
3	15	0,181
4	20	0,244
5	25	0,305
6	30	0,369
7	35	0,435
8	40	0,499
9	45	0,564
10	50	0,627

### Anexo M. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de los medios MRS y Pro

Tiempo (horas)	Medios de cultivo			
	MRS		Pro	
	X	Y	X	Y
0	7,74	0,98	41,81	0,532
2:24	6,80	0,862	41,81	0,532
4:48	6,73	0,853	41,41	0,527
7:12	6,02	0,764	40,86	0,52
9:36	6,09	0,773	40,30	0,513
12:00	5,16	0,655	36,02	0,459
14:24	4,66	0,592	33,48	0,427
16:48	4,36	0,555	28,85	0,369
19:12	3,98	0,507	27,29	0,349
21:36	3,35	0,427	25,70	0,329
24	2,86	0,366	22,44	0,288

X: Concentración de azúcar (mg/L)

Y: absorbancia del medio MRS y Pro

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

m=0,0126 y b=0,0052

Dilución: Medio MRS 1/100

Medio Pro 1/1000

## Anexo N. Determinación de la acidez por titulación con NaOH 0.1 N.

**Fundamento:** La acidez es el poder de combinación de un ácido con una base. La acidez total se expresa en porcentaje de ácido en 100 mL o en 100 g de muestra.

### Materiales

- Capsula de porcelana.
- Bureta de 10 a 50 mL.
- Pipeta volumétrica de 9 o 17.6 mL.
- Agitador.

### Reactivos

- Solución de NaOH 0.1 N y solución alcohólica de fenolftaleína al 1%.

### Método.

- Se mezcla cuidadosamente la muestra y se transfiere con una pipeta volumétrica de 9 mL a una cápsula de porcelana. Se emplean 3 gotas de solución alcohólica de fenolftaleína como indicador y se valora con solución NaOH 0.1 N (N/10), hasta la aparición de una coloración rosa. Dicha coloración desaparece gradualmente, pero se considera obtenido el punto final cuando el tinte rosa persiste unos 30 segundos.
- Los resultados de acidez se expresan en peso de ácido láctico por 100 mL de la muestra, siempre que se tomen 9 mL de muestra; para obtener dicho resultado se divide entre 10 el número de mL de NaOH gastados en la titulación, o utilizando la siguiente ecuación:

$$\%acidoláctico = \frac{mLNaOHgastados \times NormalidadNaOH \times eq.gác.lactico}{(mg)ó(g)muestra}$$

$$eq.g = 0,09 \text{ (P.M. ácido láctico = } 90/1000 \text{ g = } 0.09 \text{ g)}$$

**Anexo O. Análisis de varianza para Ln UFC/mL y prueba de significancia de Tukey**

Fuente variación	DF	Suma de Cuadrados	Cuadro de la media	F-Valor	Pr > F
Medio	1	5,147647	5,147647	2,13	0,1542
Hora	10	211,580221	21,15802	8,76	<0,0001
Error	32	77,326567	2,4164		
Total correcto	43	294,05443			

R- cuadrado	Coef Var	Ln media
0,7370	8,2846	18,7634

Tukey	Media	Nº de observaciones	Medio
A	19,1055	22	1 MRS
A	18,4214	22	2 Pro

**Anexo P. Análisis de varianza y regresión para pH y Ln UFC/mL en el medio MRS**

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadro de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	3.70584	3.70584	30.71	0,0004
Error	9	1.08598	0.12066		
Total correcto	10	4.79182			

R- cuadrado	Coef Var
0.7734	5.40001

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	12.39820	1.08513	11.46	<.0001
UFC_LN1	1	-0.32244	0.05818	-5.54	0.0004



**Anexo Q. Análisis de varianza y regresión para pH y Ln UFC/mL en el medio Pro**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadro de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	1	2.41520	2.41520	9.15	0.0144
Error	9	2.37661	0.26407		
Total correcto	10	4.79182			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>
0.5040	7.98846

<b>Variable</b>	<b>DF</b>	<b>Estimador del parámetro</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor t</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
Intercepto	1	9.41928	0.99961	9.42	<.0001
UFC_LN2	1	-0.15537	0.05137	-3.02	0.0144

**Anexo R. Análisis de varianza y regresión para azúcar total y Ln UFC/mL en el medio MRS**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadro de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	1	3.649	3.649	16.24	0.0157
Error	9	0.899	0.224		
Total correcto	10	4.548			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>
0.8024	3.375

<b>Variable</b>	<b>DF</b>	<b>Estimador del parámetro</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor t</b>	<b>Pr &gt; t </b>
Intercepto	1	17.987	0.9974	18.03	<.0001
UFC_LN	1	-0.4355	0.1080	-4.03	0.0157

**Anexo S. Análisis de varianza y regresión para azúcar total y Ln UFC/mL en el medio Pro**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadro de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	1	86.091	86.09	33.32	0.0045
Error	9	10.336	2.584		
Total correcto	10	96.427			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>
0.8928	3.8609

<b>Variable</b>	<b>DF</b>	<b>Estimador del parámetro</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor t</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
Intercepto	1	53.653	2.1832	24.58	<.0001
UFC_LN	1	-1.228	0.2129	-5.77	0.0045

**Anexo T. Análisis de varianza y regresión para %ácido láctico y Ln UFC/mL en el medio MRS**

<b>Fuente variación</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadro de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	1	0,05273	0,05273	23,82	0,0009
Error	9	0,01992	0,00221		
Total correcto	10	0,07265			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>
0,7258	16,02315

<b>Variable</b>	<b>DF</b>	<b>Estimador del parámetro</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor t</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
Intercepto	1	-0,41796	0,14649	-2,85	0,0190
UFC LN	1	0,03846	0,00788	4,88	0,0009

**Anexo U. Análisis de varianza y regresión para %ácido láctico y Ln UFC/mL en el medio Pro**

<b>Fuente variación</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadro de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	1	0,03724	0,03724	9,46	0,0132
Error	9	0,03542	0,00394		
Total correcto	10	0,07265			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>
0,5125	21,3642

<b>Variable</b>	<b>DF</b>	<b>Estimador del parámetro</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor t</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
Intercepto	1	-0,07719	0,1220	-0,63	0,5428
UFC LN	1	0,01929	0,0062	3,08	0,0132