

EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580

JAIRO ALEXANDER MORILLO GARCES
DARÍO ALEJANDRO ROMERO BENAVIDES

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO - COLOMBIA
2016

EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus gasserii* ATCC 19992 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580

JAIRO ALEXANDER MORILLO GARCÉS
DARÍO ALEJANDRO ROMERO BENAVIDES

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

Director
HENRY ARMANDO JURADO GÁMEZ
Zoot., Esp., M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO - COLOMBIA
2016

**“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

EDWARD JOHNNY ZAMBRANO MORA. MVZ.
Jurado Delegado

KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO. MV.
Jurado

San Juan de Pasto, 27 de abril de 2016

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. Por darme paciencia para continuar y hacer de mí una mejor persona y valorar todo a mi alrededor. Por permitir que cruce todo obstáculo que en el camino encontré, por no dejarme decaer en momentos de tristeza y nostalgia y ver siempre un nuevo amanecer.

A mi madre Maribel.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, por infundir sus valores en mí, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su gran amor.

A mi padre Héctor.

Por darme su apoyo en los momentos de dificultad, por inducir la disciplina y el valor de la vida y por creer en mí.

A mi hermana Adriana.

Por los ejemplos de perseverancia y paciencia que la caracterizan, por darme el valor para salir adelante y por su amor.

A mi Hijo Julián.

Por ser el motor que guía mi camino para ser un mejor padre y valorar lo bello de la vida y darme esa fuerza para luchar cada día sin detener mi camino.

A mi Familia.

Por darme el apoyo necesario para continuar en momentos de desfallecimiento y ser un ejemplo de vida para querer seguir adelante y ser mejor persona cada día.

A mis amigos.

Por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional, por la constancia en cada una de nuestras caídas y porque hasta ahora, seguimos siendo amigos: Alejandro Romero, Adriana Orbes, Nathaly Mesías gracias por creer y ser una gran ayuda a realizar este trabajo.

¡Gracias totales!

DEDICATORIA

Estando a algunas horas de terminar esta investigación, y con la emoción que ofrece la incertidumbre de no saber lo que puede ocurrir una vez culmine esta etapa de mi vida, me permito dedicar este gran logro a las personas que han estado presentes para ser mi apoyo en los buenos y malos tiempos.

*Dedico este trabajo a quien es para mí, el mejor ejemplo de trabajo incansable y amor infinito. **Dedico este trabajo que ahora le pertenece mi madre. María Benavides.***

*Dedico este trabajo a una persona cálida y bondadosa. **Dedico este trabajo a mi padre. Bernardo Romero.***

*Dedico este trabajo al amigo, al hermano y al hombre más genial en mi vida y espero poder seguir entregándole triunfos. **Dedico este trabajo a mi hermano Gianni Romero Benavides.***

*Dedico este trabajo a una mujer muy inteligente y encantadora, mi soporte y mi niña, con quien deseo continuar en este camino que elegimos. **Dedico este trabajo a Adriana Orbes Villacorte.***

*Dedico este trabajo a las personas que lograron hacerlo divertido y diferente. Fueron muchos los momentos bueno y malos pero a fin de cuenta todos los supimos superar. **Dedico este trabajo mi compañero tesista Alexander Morillo, a mis compañeras tesistas Adriana Orbes y Nathaly Mesías.***

*Y por último dedico este trabajo a los seres que alegran la vida con sus acciones y aunque algunos dirán que es innecesario y no lo entiendan, a fin de cuenta puedo dedicar este trabajo a quien yo quiera. **Dedico este trabajo a mis amigos caninos Simón y Rox.***

AGRADECIMIENTOS

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

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

KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO, Médico Veterinario

EDWARD JHONY ZAMBRANO, Médico Veterinario Zootecnista, Bacteriologo y Laboratorista clínico.

CARLOS ALFREDO BERNAL, Zootecnista, Técnico Laboratorios de Ciencias Pecuarias.

NANCY NINFA GALINDEZ SANTANDER, Bacterióloga

SANDRA ESPINOZA. Ingeniera en Producción Acuícola, Esp., M. Sc.

DIANA MARÍA ORTIZ RUEDA. Zootecnista, Esp., M. Sc.

DAVID ARTURO, Químico, Técnico laboratorio de cromatografía, Universidad De Nariño.

FERNANDO CRIOLLO. Ingeniero Agrónomo. Laboratorista.

Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales. VIPRI

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

Fisiología Etología Animal y Procesos Biotecnológicos aplicados a la producción animal. FISE-PROBIOTEC

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

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
1 DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	26
2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MARCO TEÓRICO	29
4.1 PROBIÓTICOS	29
4.1.1 Características de los probióticos	30
4.1.2 Resistencia al tránsito gastrointestinal	30
4.1.3 Supervivencia en el lugar de acción	31
4.2 GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	33
4.3 GÉNERO <i>Lactococcus</i>	35
4.4 <i>Lactobacillus gasseri</i>	36
4.5 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	37
4.6 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	39
4.6.1 Características Microbiológicas	40
4.6.2 Yersiniosis	40
4.6.3 Patogénesis de la <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	41
4.6.4 Desarrollo de la enfermedad	43
4.6.5 Aspectos sanitarios	43
5 DISEÑO METODOLÓGICO	44
5.1 LOCALIZACIÓN	44
5.2 MATERIALES Y EQUIPOS	44
5.2.1 Materiales	44
5.2.2 Equipos	44
5.2.3 Vidriería	45
5.2.4 Reactivos	45

5.3	RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, VERIFICACIÓN DE PUREZA Y CONSERVACIÓN DE <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	45
5.3.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	45
5.3.2	Reconstitución	46
5.3.3	Siembra	46
5.3.4.1	Producción de gas	46
5.3.4.2	Actividad de catalasa	46
5.4	RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, VERIFICACIÓN DE PUREZA Y CONSERVACIÓN DE <i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	46
5.4.1	<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	46
5.4.2	Reconstitución	46
5.4.3	Siembra	47
5.4.4	Verificación de pureza y conservación	47
5.5	CULTIVO DEL INÓCULO DE <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	47
5.5.1	Elaboración del inóculo	47
5.5.2	Siembra de microorganismos (150 µL)	48
5.6	RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	49
5.6.1	Resistencia de las BAL a 38°C y 45°C	49
5.7	VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH	49
5.7.1	Resistencia a concentraciones de pH 2.5, 3.5, 4.5 y 6	49
5.8	VIABILIDAD FRENTE A CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES Y BILIS VOBINA	49
5.8.1	Resistencia a 3, 4 y 5% de sales biliares	49
5.8.2	Resistencia a 0.5, 1 y 2% de bilis bovina	50
5.9	ESTUDIOS DE INHIBICIÓN	50
5.9.1	Poder de inhibición frente a patógenos y comparación frente a antibioticos	50
5.9.1.1	Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos	50
5.9.1.2	Ensayo de inhibición <i>in vitro</i>	51
5.10	CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN	51

5.10.1	Características de la cinética	51
5.10.2	Conteo de microorganismos viables en placa UFC/150 µL	52
5.10.3	Determinaciones de pH	52
5.10.4	Determinación del porcentaje de ácido láctico	52
5.10.5	Determinación de consumo de azúcares totales	53
5.10.6	Determinación de proteínas	53
5.10.7	Evaluación de la producción de biomasa	54
5.10.8	Identificación de péptidos del sobrenadante y ácido láctico del sobrenadante por HPLC - DAD	55
5.11	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
5.11.1	Modelo matemático	55
5.11.2	Formulación de hipótesis	56
5.11.2.1	Hipótesis nula (Ho)	56
5.11.2.2	Hipótesis alterna (Ha)	56
5.11.3	Variables a evaluar Vi, V2, V3, V4, V5, V6.	56
6.	PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1	DESCRIPCIÓN DE <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> y <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	57
6.1.1	<i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	57
6.1.2	Producción de gas y actividad de catalasa de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	58
6.1.3	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	59
6.2	PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A ANTIMICROBIANOS Y COMPARACIÓN CONTRA PATÓGENOS	59
6.2.1	Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	59
6.2.2	Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	62
6.2.3	Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	63
6.2.4	Ensayos de la acción inhibitoria del sobrenadante de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> frente a	

<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	65
6.3 SUSCEPTIBILIDAD EN DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	68
6.3.1 Viabilidad de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a 38°C y 45° C	68
6.4 VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH	70
6.5 SUSCEPTIBILIDAD EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALES BILIARES Y BILIS BOVINA	74
6.5.1 Viabilidad de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> frente a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina	74
6.6 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN	76
6.6.1 Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/150 µL)	80
6.6.2 Determinación de pH	82
6.6.3 Determinación del porcentaje de ácido láctico	85
6.6.4 Determinación de consumo de azúcares totales	87
6.6.5 Determinación de proteínas	92
6.7 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	94
6.8 DETERMINACION DE ACIDO LÁCTICO POR HPLC- DAD EN EL SOBRENADANTE	96
6.9 IDENTIFICACION DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC- DAD	98
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	100
7.1 CONCLUSIONES	100
7.2 RECOMENDACIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXOS	111

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación Taxonómica.	39
Cuadro 2. Diseño de medidas repetidas para la selección Del medio de cultivo	52

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de los medios de cultivo MRS y PRO 51	
Tabla 2. Producción de gas y actividad de catalasa 58	
Tabla 3. Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	60
Tabla 4. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	62
Tabla 5. Acción inhibitoria de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	64
Tabla 6. Concentraciones (μ l) y halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante de <i>Lactobacillus gasseri</i> frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	66
Tabla 7. Concentraciones (μ l) y halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> frente a <i>Yersinia Pseudotuberculosis</i> .	66
Tabla 8. Viabilidad de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en medio MRS a temperaturas de 38°C Y 45°C (UFC/150 μ L)	68
Tabla 9. Viabilidad de los diferentes tiempos a pH 6, 4.5, 3.5 y 2,5 de <i>Lactobacillus gasseri</i>	70
Tabla 10. Viabilidad de los diferentes tiempos a pH 6, 4.5, 3.5 y 2,5 de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	71
Tabla 11. Viabilidad de <i>Lactobacillus gasseri</i> a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina	74
Tabla 12. Viabilidad de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina. 74	
Tabla 13. Composición nutricional teórica del medio MRS 79	
Tabla 14. Composición nutricional teórica del medio PRO 80	
Tabla 15. Fase exponencial de <i>Lactobacillus gasseri</i> y	

Lactococcus lactis subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO

81

Tabla 16. Efecto del medio de cultivo sobre el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L) *Lactobacillus gasseri* 81

Tabla 17. Efecto del medio de cultivo sobre el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 81

Tabla 18. Efecto de la biomasa (UFC/150 μ L) sobre el pH del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri* 83

Tabla 19. Efecto de la biomasa (UFC/150 μ L) sobre el pH del medio de cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 81

Tabla 20. Efecto de las unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L) sobre el % de ácido láctico del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri* 85

Tabla 21. Efecto de la biomasa (UFC/150 μ L) sobre el % de ácido láctico del medio de cultivo. *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 85

Tabla 22. Regresiones lineales entre el consumo de azúcares mg/L y crecimiento bacteriano (Ln UFC/150 μ L) 88

Tabla 23. Determinación de proteínas en *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 92

Tabla 24. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus gasseri* en los medios MRS y PRO 94

Tabla 25. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO 95

Tabla 26. Analisis de ácido láctico en las muestras de sobrenadante 96

Tabla 27. Antibióticos, sigla y cantidad 115

Tabla 28. Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L 122

Tabla 29. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de *Lactobacillus gasseri* en los medios MRS y PRO 123

Tabla 30. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO 123

Tabla 31. Estructura de covarianza <i>L. gasseri</i>	125
Tabla 32. Análisis de varianza <i>L. gasseri</i>	125
Tabla 33. Comparación de medias por Tukey <i>L. gasseri</i>	125
Tabla 34. Estructura de covarianza <i>Lc. lactis</i>	125
Tabla 35. Análisis de varianza <i>Lc. lactis</i>	126
Tabla 36. Comparación de medias por Tukey <i>Lc. lactis</i>	126
Tabla 37. Estructura de covarianza pH <i>L. gasseri</i>	126
Tabla 38. Análisis de varianza pH <i>L. gasseri</i>	126
Tabla 39. Comparación de medias por Tukey pH <i>L. gasseri</i>	127
Tabla 40. Estructura de covarianza pH <i>Lc. lactis</i>	127
Tabla 41. Análisis de varianza por Tukey pH <i>Lc. lactis</i>	127
Tabla 42. Comparación de medias por Tukey pH <i>Lc. lactis</i>	128
Tabla 43. Estructura de covarianza % ácido láctico <i>L. gasseri</i>	128
Tabla 44. Análisis de varianza % ácido láctico <i>L. gasseri</i>	128
Tabla 45. Comparación de medias por Tukey % ácido láctico <i>L. gasseri</i>	128
Tabla 46. Estructura de covarianza % ácido láctico <i>Lc. lactis</i>	129
Tabla 47. Análisis de varianza % ácido láctico <i>Lc. lactis</i>	129
Tabla 48. Comparación de medias por Tukey % ácido láctico <i>Lc. lactis</i>	129
Tabla 49. Varianza y regresión para azúcares totales de <i>L. gasseri</i> en medio MRS	130
Tabla 50. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales <i>L. gasseri</i> en medio PRO	130
Tabla 51. Análisis de varianza y regresión para azúcares	

totales *Lc. lactis* en medio MRS

131

Tabla 52. Análisis de varianza y regresión para azúcares

totales *Lc. lactis* en medio PRO

131

Tabla 53. Valores de pH de *Lactobacillus gasseri*

132

Tabla 54. Valores de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

133

Tabla 55. Porcentaje de ácido láctico de

Lactobacillus gasseri

133

Tabla 56. Porcentaje de ácido láctico de

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

133

Tabla 57. Consumo de azúcares de *Lactobacillus gasseri*

133

Tabla 58. Consumo de azúcares de

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

133

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. a: <i>Lactobacillus gasseri</i> , morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina;	
b: morfología Microscópica.	57
Figura 2. a: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina;	
b: morfología microscópica	58
Figura 3. a. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , morfología macroscópica en agar MacConkey;	
b: morfología microscópica	59
Figura 4. a. Susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Lactobacillus gasseri</i> ;	
b. Susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	60
Figura 5. Susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	63
Figura 6. Discos de agar impregnados de BAL. <i>Lactobacillus gasseri</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	64
Figura 7. Crecimiento (UFC/150 μ L) de <i>Lactobacillus gasseri</i> en los medio MRS Y PRO	77
Figura 8. Crecimiento (UFC/150 μ L) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en los medio MRS y PRO	77
Figura 9. <i>Lactobacillus gasseri</i> , comparación entre UFC/150 μ L vs pH durante la cinética de los medios MRS y PRO	83
Figura 10. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> comparación entre UFC/150 μ L vs pH durante la cinética de los medios MRS y PRO	83
Figura 11. % Ácido láctico de los medios MRS y PRO vs UFC/150 μ L de la cepa <i>Lactobacillus gasseri</i> durante la cinética de fermentación	86
Figura 12. % Ácido láctico de los medios MRS y PRO vs UFC/150 μ L de la cepa <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> durante la cinética.	86
Figura 13. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150 μ L medio MRS de <i>Lactobacillus gasseri</i>	89

Figura 14. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150 μ L medio PRO <i>Lactobacillus gasseri</i>	89
Figura 15. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150 μ L medio MRS <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	90
Figura 16. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150 μ L medio PRO <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	90
Figura 17. Determinación de proteína (mg/L) y crecimiento UFC/mL medio MRS y PRO de <i>Lactobacillus gasseri</i>	92
Figura 18. determinación de proteína (mg/L) y crecimiento UFC/mL medio MRS y PRO de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	93
Figura 19. Cromatograma de <i>Lactobacillus gasseri</i>	99
Figura 20. Cromatograma de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™	112
Anexo B. Reconstitución y manejo general de ampollas para <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	112
Anexo C. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer	113
Anexo D. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos	115
Anexo E. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	115
Anexo F Preparación Medio PRO	119
Anexo G Método de Antrona o Dubois	119
Anexo H. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)	122
Anexo I. Lecturas de absorbancia para los medios MRS y PRO	123
Anexo J. Determinación de Proteínas “método Lowry” modificado	124
Anexo K. Análisis de medidas repetidas en el tiempo, cinética de fermentación, pH, % ácido láctico, <i>L. gasseri</i> y <i>Lc. lactis</i> .	125
Anexo L. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales <i>L. gasseri</i> y <i>Lc. lactis</i> en medios MRS y PRO	130
Anexo M. valores de pH, % de Ácido láctico, consumo de azúcares de <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> durante la cinética de fermentación	131

GLOSARIO

PROBIÓTICOS: microorganismos vivos, no patógenos, los cuales tras ser ingeridos en cantidades adecuadas, pueden mejorar el equilibrio microbiano y producir efectos benéficos en la salud de quienes los ingieren.

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: masa celular que puede ser medida o estimada mediante métodos directos e indirectos.

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 que ejerce un microorganismo hacia otro, mediante la producción de compuestos antimicrobianos, modulación del medio en donde se encuentre y otros los cuales son propios del microorganismo.

FERMENTACIÓN: proceso bioquímico 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.

INHIBICIÓN: disminución de la actividad biológica de un microorganismo por la acción de un agente inhibidor.

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

MICROBIOTA: población homogénea o heterogénea de microorganismos asociados con un tejido o estructura particular.

PATÓGENO: microorganismo o material que produce una malestar enfermedad o muerte.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: tiempo requerido por un microorganismo o población microbiana para duplique su número.

TINCIÓN DE GRAM: método bacteriológico que permite designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias en (Gram negativas) y (Gram positivas). Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): unidad de medida estimada para microorganismos la cual expresa el número de microorganismos viables que pueden duplicarse hasta formar colonias.

RUTA DE EMBDEN MEYERHOFF PARNAS: 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 gilceraldehído 3-fosfato en piruvato.

RESUMEN

La inspección y control sanitario de los animales está directamente relacionado con la garantía de un producto óptimo para el mercado. A partir de ello; en Nariño se ha visto un incompleto estudio para el control de algunas bacterias patógenas que pueden afectar la producción animal, para este estudio se ha identificado que en la producción cuyícola una de las bacterias patógenas es la *Yersinia pseudotuberculosis* implicando afecciones irreversibles para esta especie, para ello se ha visto la necesidad de identificar nuevas posibilidades para el control de esta bacteria como una opción viable frente al uso de antibióticos como principal tratamiento. En este caso, se utilizó bacterias ácido lácticas (BAL), debido a los beneficios que le confiere al hospedero en cuanto a la intervención que se le confiere a sus características bacteriostáticas y bactericidas como una fuente de control y prevención de la bacteria patógena en estudio.

El principal objetivo que se planteó en este estudio fue definir el efecto de dos cepas probióticas, denominadas como bacterias GRAS (Generalmente Reconocida como Segura), *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* sobre la bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis*, como principal fuente de información se realizó las siguientes pruebas: producción de gas, actividad de catalasa, cinética de fermentación, tolerancia a pH (2.5, 3.5, 4.56 y 6%), resistencia diferentes temperaturas (38 °C y 45°C), estudio de viabilidad frente a concentración de sales biliares (3%,4% y 5% p/v) y bilis (0,5%, 1% y 2% p/v), determinación de proteínas por el método de Lowry modificado, consumo de azúcares, ensayos de inhibición *in vitro*, identificación de péptidos del sobrenadante por HPLC – DAD.

Para la determinación de producción de biomasa se utilizó un diseño de medidas repetidas en el tiempo de los dos sustratos; el primero fue el agar comercial MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y el segundo fue un medio preparado a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo (Medio PRO).

En cuanto a la cinética de fermentación en los medios MRS y PRO *L. gasseri*, obtuvo su máximo crecimiento en el tiempo 6 (20:00 horas) y 5 (16:00 horas) con valores de 1.75×10^{12} y 3×10^{12} UFC/150 μ L, un consumo de azúcar en la fase logarítmica de 1.79 mg/L y 2.043 mg/L y un valor de proteína de 0,13 y 0,70 mg/L MRS y PRO. Se encontró ácido láctico en el sobrenadante con valores de 5,70 y 5,30 g/L. y en este mismo se encontró un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,69 mg/ml.

Por otro lado *Lc. Lactis*, presentó su fase exponencial en el tiempo 4 (12:00 horas) en los dos medios evaluados, con valores de 6.4×10^{12} UFC/150 μ L (MRS) y 3×10^{11} UFC/150 μ L.(PRO) un consumo de azúcar en la fase logarítmica de 2,17 mg/L y 1,87 mg/L, se registró un valor de proteína de 0,06 y 0,05 mg/L en los medios MRS y PRO respectivamente, una producción de ácido láctico de 9,95 y 9,00 g/L.

se encontró un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,62 mg/ml. Para las dos cepas hubo resistencia a los pH 3.5, 4.56 y 6% y con menor conteo significativo a un pH de 2.5 además tuvo una fuerte resistencia a las concentraciones de sales biliares y bilis bovina en las menores diluciones.

En la prueba de susceptibilidad antimicrobiana *Y. pseudotuberculosis* presenta resistencia a dicloxacilina, y sensibilidad a penicilina, Ciprofloxacina, Cefalotina y gentamicina. En cuanto a *L. gasserii* presentó resistencia a Cefalotina y gentamicina, mostrando sensibilidad al resto de antibióticos. En cuanto a *Lc. lactis* presentó resistencia a dicloxacilina y sensibilidad al resto de antibióticos. Finalmente sobre los ensayos de inhibición las BAL presentaron características inhibitorias frente a *Y. pseudotuberculosis*, en los métodos de discos impregnados y difusión en cilindro plástico al producir halos de inhibición entre 2 y 3 mm.

Palabras clave: Cinética, Colonia, Inóculo, Viabilidad.

ABSTRACT

The health inspection and monitoring of animals is directly related to the guarantee of an optimal product for the market. From this; in Nariño has been an incomplete study for control of some pathogenic bacteria that can affect animal production, this study has identified that in producing Guinea pig one of the pathogenic bacteria is *Yersinia pseudotuberculosis* involving irreversible conditions for this species, for this has been the need to identify new possibilities for controlling this bacterium as a viable option against the use of antibiotics as the primary treatment. Lactic acid bacteria (LAB) was used in this case because of the benefits it gives the host regarding the intervention confers on its bacteriostatic properties and bactericides as a source of control and prevention of pathogenic bacteria in study.

The main objective set in this study was to determine the effect of two probiotic strains, designated as bacteria GRAS (generally recognized as safe), *Lactobacillus gasseri* and *Lactococcus lactis* on the pathogenic bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*, as the main source of information the following was carried out tests: gas production, catalase activity, fermentation kinetics, tolerance pH (2.5, 3.5 and 4.5), resistance different temperatures (38°C and 45°C), feasibility study versus concentration of bile salts (3%, 4% and 5% w / v) and bile (0.5%, 1% and 2% w/v), protein determination by the Lowry method modified sugars consumption, in vitro inhibition assays, the supernatant peptide identification HPLC - DAD.

To determine biomass production repeated measures design is used in time of the two substrates; the first was the commercial agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) and the second was a medium prepared from sugar, soy milk, milk powder and wheat bran.

As for the fermentation kinetics in the MRS and *L. gasseri* PRO media, obtained its maximum growth over time 6 (20:00) and 5 (16:00) with values 1.75×10^{12} and 3×10^{12} CFU/150uL, sugar consumption in the logarithmic phase of 1.79 mg / L and 2.043 mg / L and a value of 0.13 and 0.70 protein mg / L MRS and PRO. Lactic acid was found in the supernatant with values of 5,70 and 5,30 g/L. and in this, a peptide comprised of an amino acid chain, VAL-TIR-VAL with a concentration of 0,69 mg/ml was found.

On the other side *Lc. Lactis*, presented its exponential phase at time 4 (12:00 hours) in the two media evaluated with values of 6.4×10^{12} CFU/150uL (MRS) and 3×10^{11} CFU/150uL.(PRO) consumption of sugar logarithmic phase of 2,17 mg / L and 1,87 mg/L, a value of 0,06 and 0.05 protein mg/L in the MRS and PRO means respectively a production of lactic acid 9 was recorded, 95 and 9,00 g / L. a peptide comprised of an amino acid chain VAL-TIR-VAL, with a concentration of 0,62 mg / ml was found. For both strains were resistant to pH 3.5, 4.56 and 6% and less

significant count at pH 2,5 also it had a strong resistance to bile salt concentrations and bovine bile in the lower dilutions.

In antimicrobial susceptibility testing *Y. pseudotuberculosis* dicloxacillin presents resistance, and sensitivity to penicillin, ciprofloxacin, gentamicin and Cephalothin. As for *L. gasserii* presented Cephalothin and gentamicin resistance, show sensitivity to other antibiotics. As *Lc. lactis* presented dicloxacillin and sensitivity to other antibiotics resistance. Finally on the inhibition assays the BAL showed inhibitory characteristics against *Y. pseudotuberculosis*, in methods and diffusion disks impregnated plastic cylinder to produce inhibition halos between 2 and 3 mm.

Keywords: Kinetics, Colony, Inoculate, Viability.

INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*), también denominado guinea pig, cobayo, conejillo de Indias entre otros, es un mamífero roedor originario de América y su hábitat se encuentra en países como Chile, Colombia, Cuba, Venezuela, Perú y Bolivia.

En Colombia, la producción de cuy se encuentra focalizada en el departamento de Nariño, Putumayo y Valle del Cauca; práctica ésta difundida de generación en generación entre las familias campesinas. En la actualidad, el desarrollo económico y social de la población, ha permitido que esta producción se convierta en un generador importante de ingresos, aun así, el manejo y control sanitario es insuficiente, de igual forma sucede con el control de bacterias patógenas como *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium piogenes*, *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*. En materia de investigación, se han desarrollado estudios con el propósito de encontrar posibles alternativas para inhibir o controlar las bacterias patógenas presentes en las instalaciones. La *Yersinia pseudotuberculosis* es una bacteria que puede ser portada por animales como: ratones, conejos y pájaros, estos a su vez pueden transmitirla a los cuyes, mediante las heces afectando los animales en cualquier fase productiva.

A partir de esto, han surgido estudios con bacterias ácido lácticas (BAL). Algunas han demostrado prevenir la colonización intestinal por agentes patógenos, aumentar la producción de ácido láctico, sintetizar bacteriocinas y aumentar la flora benéfica, entre otros mecanismos de acción. Con el propósito de continuar con nuevos estudios en relación a los efectos benéficos producidos por los probióticos, se parte desde la evaluación *in vitro* como primer lineamiento de la investigación del *L. gasseri* y *Lc. lactis*.

L. gasseri se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano y ha demostrado su influencia como probiótico al adherirse en los tejidos intestinales, resistir concentraciones de sales biliares y estimular la acción de los macrófagos. Por su parte el *Lc. lactis* es capaz de tolerar altas temperaturas y concentraciones de NaCl y producir cantidades importantes de ácido láctico.

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar las capacidades probióticas de estas cepas lácticas, en cuanto a su aptitud para prevalecer frente a condiciones *in vitro* como la tolerancia a sales biliares, temperatura, pH, entre otras.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Según Calle¹, la importancia de la producción de cuyes en la región andina de Sur América, radica en que se constituye como una fuente importante de sustento económico familiar. De igual forma ocurre en Colombia, en los departamentos de Nariño, Putumayo y Valle del Cauca. Dado que en la actualidad es una alternativa creciente como fuente de alimentación y obtención de ingresos, a nivel familiar y de pequeña y mediana empresa. A medida que la tecnificación de la cadena productiva de cuy aumenta, también lo hace la incidencia de enfermedades y de problemas asociados con pérdidas económicas como las que causan la yersiniosis, causada por la bacteria *Y. pseudotuberculosis*.

Con respecto a la yersiniosis, Amaya afirma², que es una enfermedad infectocontagiosa, la cual causa una alta morbimortalidad en los cuyes. Si bien, la *Y. pseudotuberculosis* es una de las causantes de la pérdida del pie de cría en las producciones cuyícolas, también lo es el deficiente control de la yersiniosis como lo plantea Calle³, cuando menciona que, actualmente las casas comerciales no reportan ni ofrecen biológicos, que permitan el control directo de esta enfermedad. Por lo general, cuando se detecta dicha enfermedad en los planteles; en el mayor de los casos, el mejor manejo que se hace para tratar la enfermedad es recurrir a medicamentos veterinarios propios de otras especies y adaptarlos en cuanto a dosificación.

Dentro de este contexto una alternativa para la prevención y control de la *Y. pseudotuberculosis*, es el uso de BAL, por cuanto algunas investigaciones han demostrado que existe una relación de control sobre ciertos patógenos, como lo afirma Ramírez *et al*⁴, autores que explican que la acción conservadora de las BAL se debe a la inhibición que mantienen sobre un gran número de microorganismos patógenos y dañinos.

¹ AMAYA GARZÓN, María y CALLE LONDOÑO, 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*. Bogotá. 2008, p.39.

² *Ibíd.*, p.14.

³ *Ibíd.*, p.1.

⁴ RAMÍREZ RAMÍREZ, José; ROSAS ULLOA, Petra.; VELÁZQUEZ GONZALES, Marta.; ULLOA, José y ARCE ROMERO, Francisco. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente [online]. Abril – Junio 2011 no. 7 [Citado 23, octubre, 2014], p.2. Disponible en Internet: <<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>>

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Bengmark *et al* citados por García⁵, argumentaron que en los animales se pueden encontrar desequilibrios naturales en el ecosistema microbiano del tracto gastrointestinal, lo que provoca el desarrollo de un estado disbiótico, que favorece el desarrollo de microorganismos patógenos, que suelen provocar trastornos gastrointestinales, afectando la salud animal y el comportamiento productivo.

Por lo general, años atrás se han utilizado antibióticos en las dietas y en consecuencia se presentaron efectos colaterales indeseables. Por esta razón, en la actualidad, se ha incrementado la tendencia a usar probióticos; en este caso se buscó evaluar la capacidad de *L. gasseri* y *Lc. lactis* por el efecto benéfico que se ha demostrado en estudios *In vitro*.

En un intento por determinar de qué forma estas bacterias actúan frente a la bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis* presente en cuyes, se evaluará su acción *in vitro*. Por tanto se ha establecido la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuál será el efecto *in vitro* causado por *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* con propiedades probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*?

⁵ GARCÍA CURBELO, Yanelys; GARCÍA Yaneisy; LÓPEZ Anahí y BOUCOURT R. Probióticos: Una alternativa para mejorar el comportamiento animal. Revista Cubana de Ciencia Agrícola [online]. 2005, vol. 39, no. 2 [citado 10, enero, 2016], p. 129. Disponible en Internet: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017845001>> ISSN electrónico: 2079-3472.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto probiótico *in vitro* de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Establecer el efecto de inhibición del sobrenadante producido por las cepas *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobre la bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Identificar las condiciones óptimas de la cinética de fermentación de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en el medio PRO comparado con el comercial MRS.
- Analizar las condiciones adecuadas para el desarrollo de las bacterias ácido lácticas en la producción de inóculos en el medio seleccionado.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 PROBIÓTICOS

Según Manzano *et al*⁶, los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, que pueden ser utilizados como suplemento alimenticio, los cuales tras ser ingeridos en cantidades adecuadas, pueden mejorar el equilibrio microbiano y producir efectos benéficos en la salud de quienes los ingieren.

Villamil y Martínez⁷ comentó, que el término probiótico se utiliza para describir a un complemento dietario microbiano, que al ser suministrado en el hospedero, este, logre mantenerse vivo dentro del tracto gastrointestinal, y que beneficie la fisiología del hospedero modulando el sistema inmune y también mejore el balance microbiano evitando la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal.

Nova *et al* citados por Manzano *et al*⁸, comentan que los probióticos pueden influir en la respuesta inmune de los animales y no sólo a nivel de la mucosa intestinal, sino también a nivel sistémico, dadas sus propiedades inmunomoduladoras. Además, argumentan que actualmente se estudia su utilidad en el manejo preventivo de enfermedades. De igual forma Lomax citado por Fernández⁹, menciona que existe evidencia de estudios *in vitro*, la cual demuestra que los probióticos poseen propiedades de modulación del sistema inmune.

No obstante Lewis¹⁰, afirma que no todos los probióticos utilizan los mismos mecanismos para aportar beneficios en el huésped ya que algunos mecanismos de acción específicos han sido descubiertos a través de algunas investigaciones; estos incluyen: la protección influida por bacteriocina contra patógenos intestinales, la exclusión competitiva, las interacciones internas entre la mucina y el epitelio intestinal, y la modulación o estimulación del sistema inmune.

⁶ MANZANO, Claudia; ESTUPIÑÁN, Diana; POVEDA, Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista chilena de nutrición*, 2012, vol. 39, no 1, p. 98

⁷ DÍAZ, Luisa Villamil; MARTÍNEZ-SILVA, María Angélica. PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 2009, vol. 38, p. 167

⁸ Nova E, Warnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J, Marcos A. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. Citado por MANZANO. Op. cit., p. 99.

⁹ Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation citado por FERNÁNDEZ, Rándolph Delgado. Probióticos y salud humana Probiotics and human health. *MEDICIEGO*, 2013, vol. 19, no Supl 2.

¹⁰ LEWIS BAUGHER, Jonathan. Characterization of Two Prophages in *Lactobacillus gasseri* ADH and Their Roles in Horizontal Gene Transfer. A thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, 2001. p. 2.

Morrison *et al* citado por Arribas¹¹, aseguran que los probióticos son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o la acción de las bacterias patógenas. Entre los posibles mecanismos se incluye una modificación del pH en el lumen intestinal, debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, principalmente lactato y los ácidos grasos de cadena corta acetato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa sobre la fibra dietética.

Arribas¹², además menciona que mejora la función de la barrera intestinal, formando una barrera física que previene la entrada a de microorganismos potencialmente patógenos.

4.1.1 Características de los probióticos. Delgado¹³, afirma que existen una serie de requisitos que un microorganismo debe cumplir, para que pueda ser reconocido como probiótico. Los lineamientos teóricos para la selección incluyen aspectos como:

- Ejercer algún efecto beneficioso demostrado, para la salud.
- Alcanzar el intestino del huésped en estado viable y a una concentración adecuada; por tal motivo las cepas tendrán que resistir las barreras del TGI.
- Permanecer viable y en número suficiente durante todo el periodo de vida útil en el que se incluyan.
- Las cepas deben retener sus propiedades durante las fases de producción, distribución y almacenamiento.

Sánchez *et al*¹⁴, aseguran que entre las propiedades más importantes está la capacidad de atravesar la barrera digestiva para que se puedan multiplicar y colonizar el intestino, Deben poseer actividad antimicrobiana ya que administrándola en cantidades adecuadas, tengan potencial para generar una barrera frente a los patógenos. Generalmente, la adhesión a células epiteliales está considerada como un factor importante para lograr la colonización y prerrequisito esencial para ejercer una actividad probiótica.

4.1.2 Resistencia al tránsito gastrointestinal. Marteau *et al*, afirman que: “Los microorganismos probióticos a su paso a través del TGI (Tracto Gastro Intestinal) han de resistir la acidez estomacal y la presencia de enzimas gástricas y

¹¹ Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora Citados por: Arribas, M. B. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Diss. Tesis de Doctorado. Granada: Universidad de Granada, 2009. P. 35-36

¹² *Ibid.*, p. 36.

¹³ DELGADO PALACIO, Susana. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Memoria, para optar al Grado de Doctor. Oviedo: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). 2005. p. 28, 29.

¹⁴ SÁNCHEZ, L., VICHI, J., LLANES, M., CASTRO, E., SOLER, D. M., ESPINOSA, I & FERREIRA, C. L. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidato a probióticas. Revista de Salud Animal, 2011, vol. 33, no 3, p. 155

pancreáticas, así como las sales biliares intestinales que presentan una importante actividad antibacteriana.”¹⁵

Dommels *et al*, aseguran que “la concentración y tipo de proteínas, grasas y carbohidratos en el producto son algunas de las factores que influyen en el crecimiento y la supervivencia microbianas en la comida y en el entorno del TGI.”¹⁶

Sumeri *et al*¹⁷, afirman que la supervivencia y funcionalidad de la misma cepa podría variar en presencia de diferentes ingredientes como se encuentra en los prebióticos, así como en diferentes estados fisiológicos de la bacteria.

4.1.3 Supervivencia en el lugar de acción. Con respecto a la supervivencia y posterior permanencia de los probióticos en el intestino Delgado¹⁸, explica que depende, en gran medida de los mecanismos de exclusión competitiva que conserven las cepas y que entre otros, incluyen la capacidad de adhesión al epitelio intestinal y la actividad antimicrobiana que puedan causar. En el momento en que los microorganismos han llegado a su destino, tienen que ser capaces de adherirse a las células de la mucosa intestinal e impedir ser eliminados por las secreciones y los movimientos peristálticos.

Martín *et al*¹⁹, en sus ensayos encontraron que la capacidad de colonización y adherencia a las mucosas, así como su efecto protector frente a patógenos prevalentes en dichas cavidades dependen de los proteoglicanos de la superficie celular eucariótica ya que median la adherencia a estas mucosas, además se han identificado adhesinas bacterianas con las que establecen interacción específica.

Saéz *et al*, afirman que “las adhesinas son proteínas que reconocen estructuras de la superficie de las células del hospedador, generalmente se trata de proteínas o lípidos complejos por glicosilación (glicoproteínas o glicolípidos). Menos frecuentes son las estructuras a base de secuencias de aminoácidos (interacción péptido-péptida). Sin embargo, la adhesividad no siempre implica colonización”²⁰.

¹⁵ MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAr, R., & HUIS, J. H. J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 1997, vol. 80, no 6, p. 1031

¹⁶ DOMMELS, Y. E., KEMPERMAN, R. A., ZEBREGS, Y. E., DRAAISMA, R. B., JOL, A., WOLVERS, D. A.,... & ALBERS, R. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Applied and environmental microbiology*, 2009, vol. 75, no 19, p. 6198

¹⁷ SUMERI, I., ADAMBERG, S., UUSNA, R., SARAND, I., & PAALME, T. Survival of cheese bacteria in a gastrointestinal tract simulator. *International Dairy Journal*, 2012, vol. 25, no 1, p. 36

¹⁸ DELGADO. Op. cit., p. 29.

¹⁹ MARTÍN, A., Córdoba, J. J., ARANDA, E., CÓRDOBA, M. G., ASENSIO, M. A., RODRÍGUEZ, A.,... & Córdoba, J. J. Actividad del Grupo de Bacterias Lácticas de Oviedo. 2011. P. 36

²⁰ SAÉZ TORMO, G., BORREGO OLIVA, S., MONTORO BOTELLA, A., OCETE MOCHÓN, D., & CERDÁ MICO, C. Infecciones quirúrgicas y tiempos. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Su utilidad en las infecciones quirúrgicas. 2009. P. 3.

Savage citado por Rondón *et al*, aseguran que “la capacidad de adherencia de las bacterias al epitelio del tracto digestivo involucra diferentes mecanismos, entre los que se destaca la presencia de adhesinas en la superficie de las células bacterianas. Las adhesinas son mayoritariamente proteínas, que pueden unirse a los carbohidratos que se encuentran en el glicocalix de las células epiteliales. Estos carbohidratos funcionan como sitios receptores o sitios de anclaje para las bacterias”²¹.

Kos *et al* citados por León reportan que “la auto-agregación de las cepas probióticas parece ser necesaria para que se dé la adhesión a células epiteliales del intestino. La adhesión de los probióticos a células intestinales es también considerada muy importante en la estimulación del sistema inmune. La adhesión a las células M o a las Placas de Peyer pueden, así, ser un importante determinante de la estimulación del sistema inmune por parte de los microorganismos probióticos.”²²

Mardones y Durruty aseguran que “el glicocáliz es una capa compuesta por glicoproteínas y proteoglicanos como el heparán sulfato (HSPG), de carga negativa, que le confiere las características de negatividad. La extracción del glicocáliz aumenta la permeabilidad vascular a proteínas, evidenciando que su presencia e integridad impide el paso de macromoléculas”²³.

Como se ha mencionada anteriormente, los probióticos pueden ejercer una actividad antimicrobiana específica sobre un microorganismo en particular o un grupo de microorganismos; tal actividad, puede corresponder a la competición por nutrientes, por sitios de unión al epitelio intestinal o también a la producción de sustancias antimicrobianas. Es así como las bacterias probióticas según Fuller²⁴ tienen una gran influencia en el hospedero, tales como: ejercer una actividad antimicrobiana, Inhibir la invasión bacteriana, disminuir el pH luminal, secretar péptidos antimicrobianos, bloquear la adhesión bacteriana a las células epiteliales, incrementar la función de barrera, aumentar la producción de moco y mejorar la integridad de la barrera.

²¹ SAVAGE, D.C. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse citado por RONDÓN, A. J., FLORIDO, G. M., SAMANIEGO, L. M., SALABARRIA, R. B., SILVA, M. L., SOCORRO, M., & QUINTANA, M. P. efecto de lactobacilos probióticos en la reducción de bacterias patógenas en el tracto digestivo de pollos. P. 4

²² KOS, B; SUSKOVIC, J; VUKOVIC, S; SIMPRAGA, M; FRECE, J; MATOSIC, S. Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Citados por LEÓN REISSIG, María Fernanda. Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado licenciatura en bioquímica. Universidad de la República. Facultad de ciencias. 2012. P. 27

²³ MARDONES, J., & DURRUTY, P. Microalbuminuria como elemento de predicción de nefropatía y riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos. *Endocrinología y Diabetes*, 2010, p. 190

²⁴ AFRC, R. FULLER. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, vol. 66, no 5, p. 360.

En consecuencia Hart y Stagg²⁵ reiteran que los organismos pueden intervenir en el ambiente luminal intestinal, en el sistema inmune de la mucosa y en la barrera epitelial y la función de la mucosa.

4.2 GÉNERO *Lactobacillus*

Kandler *et al*, citados por Montes *et al*, afirman que: “Son típicamente bacilares, variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados que comúnmente forman cadenas, inmóviles, aunque pueden presentar flagelos peritricos”²⁶.

De Man *et al* citados por Montes *et al*²⁷, aseguran que este género comprende especies que son homofermentativas, heterofermentativas y/o microaerófilos y que crecen en medios selectivos sólidos y líquidos como agar y caldo MRS.

Parra²⁸, asegura que el grupo homofermentativo entre los cuales se encuentra el género *lactococcus*, utiliza la ruta Embden Meterhoff Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En cuanto al grupo heterofermentativo producen solamente 50 % de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de Co₂, entre las cuales están el género *lactococcus* y *lactobacillus*, contiene la enzima fosfocetolasa, pero carece de la aldosa y hexosa isomerasa utilizando así las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa producen ácido láctico y otros productos como ácido acético y etanol.

Con respecto a las características microbiológicas Fuenmayor²⁹, cerciora que las bacterias género *Lactobacillus* son Gram positivos y algunas células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no generan esporas y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno. Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con

²⁵ HART, A.L. y STAGG, A.J. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. Inflammatory Bowel Diseases [online], julio 2008, vol. 15. p. 30 [citado 17, noviembre, 2014]. Disponible en Internet: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ibd.20602/pdf>> (Traducido por los autores)

²⁶ KANDLER, O. y WEEIS, N. Regular, nosporting. Gram. Positive rods. Citado por MONTES CEBALLOS, Andrea Del Rocío, SANTRACRUZ BERNAL, Ayda Del Pilar y SAÑUDO DIAZ, Jessie Nadenka. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei*, *subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo con énfasis en Microbiología. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias naturales y matemáticas, 2003. p. 64

²⁷ DE MAN J.C. ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. A médium for the cultivation of *Lactobacilli*, citado por MONTES CEBALLOS, *Ibid*, p 64.

²⁸ PARRA HUERTAS, Ricardo Adolfo. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2010, vol. 8, no 1, p. 96.

²⁹ FUENMAYOR BOBADILLA, Carlos Alberto. Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico. Tesis de Maestría en Ingeniería Química Área de Bioprocesos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería, 2009. p. 36

márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza.

En cuanto a su nutrición y condiciones de crecimiento Jiménez³⁰, menciona que presentan particularidades para cada especie, respecto a los requerimientos nutricionales de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables; requieren no sólo carbohidratos como fuentes de Carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

Stamer citado por Peñaflo y Guerrero, concluye que: “Mientras algunas no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas. Requieren aminoácidos como fuente de nitrógeno, siendo las sales amoniacaes las que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. Esta demanda de determinados nutrientes permite diferenciar algunas especies”³¹.

Madigan *et al*, aseguran que “las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B1), biotina, piridoxina (vitamina B6) y cobalamina (vitamina B12), de aquí su uso en las pruebas microbiológicas para detectar estos compuestos”³².

Bassyouni *et al*³³, menciona que uno de los criterios más importantes para la selección de probióticos de las bacterias ácido lácticas es la resistencia a bajos pH. Pundir *et al*³⁴, al aislar algunas BAL del genero *lactobacillus* encontró que estas eran capaces de crecer a pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.7 y 3.5, pero fueron incapaces de crecer a pH 3,0, 2,0 y 1,0. Sin embargo Hawaz³⁵ asegura que estudios con diferente especie de *Lactobacillus* reportan crecimiento a pH 3.

Villa *et al*³⁶, mencionan que la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones

³⁰ JIMENEZ SERNA, Alaide. Efecto de diferentes fármacos sobre el crecimiento de *lactobacillus casei shirota*. Tesis Doctoral. México D.F. Instituto politécnico nacional de ciencias biológicas. 2010. P. 12-13

³¹ STAMER, J. R. The lactic acid bacteria citado por PEÑAFLO, Nancy Mora; GUERRERO, Andrés García. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de Maestría licenciado en Química en alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2007. P. 18

³² MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122,

³³ RASHA H. BASSYOUNI, WALLA S. ABDEL-ALL, MOSTAFA G. FADL, Saed Abdel-all and ZEINAT kamel. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products in Egypt as a Probiotic. Life Science Journal 2012; 9(4) p. 2925

³⁴ PUNDIR, R. K., RANA, S., KASHYAP, N., & KAUR, A. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. *Journal of Applied pharmaceutical science*, 2013, vol. 3, no 3, p. 90

³⁵ HAWAZ, Estifanos. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, vol. 8, no 13, p. 1422

³⁶ VILLA, K. J. F., ECHEVERRI, I. C. C., LÓPEZ, L. W., & ARIAS, J. A. C. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud*, 2014, vol. 13, no 1, p. 56-57.

excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones, disminuye el pH interno, lo que deriva en la desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo de esta forma con la viabilidad. Por esto, las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajos a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía.

Cárdenas afirma que “Pueden crecer formando filamentos y generalmente son anaerobios o aerotolerantes y acidúricos o acidófilos. El rango de temperatura en el que pueden multiplicarse oscila entre 2 y 53°C, aunque el óptimo generalmente se considera entre 30 y 40°C”³⁷.

4.3 GÉNERO *Lactococcus*

Según Olivera³⁸, el género *Lactococcus* pertenece a la Familia *Streptococcaceae* y afirma que desde el punto de vista morfológico, estas bacterias, son cocos con un diámetro que puede oscilar entre 0,5 y 1 µm. Son en su gran mayoría homofermentativos, aunque existen miembros de este género que son heterofermentativos.

Por su parte Flórez³⁹, afirma que los lactococos son bacterias Gram positivas, homofermentadoras, mesófilas, su morfología es cocoide y producen ácido láctico de tipo L (+); Este incluye las especies *Lactococcus lactis* en donde se reconoce que la subespecies *lactis*, *cremoris* y *hordniae* son las de mayor importancia a nivel industrial.

Dellaglio *et al*⁴⁰, comentan que solo producen ácido láctico L (+), son anaerobias facultativas, microaerófilas, termosensibles y tiene dificultad para crecer en concentraciones de NaCl de 6.5 % o cuando el pH es superior a 9.6.

³⁷ CÁRDENAS CÁRDENAS, Nivia. Estudio de las propiedades tecnológicas de bacterias aisladas de leche materna: aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia 2015. P. 15

³⁸ OLIVERA, Jorge. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Tesis para obtener el título de Lic. en Bioquímica. Universidad de la República. Facultad de Agronomía, 2011. 12 p.

³⁹ FLÓREZ GARCÍA, Ana Belén. Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Memoria, presentada para optar al grado de Doctor. Oviedo 2007. Universidad de Oviedo. Departamento de biología funcional, Área de microbiología. p.13

⁴⁰ DELLAGLIO, F., DE ROISSARD, H., TORRIANI, S., CURK, M. C. y JANSSENS, D Características générales des bactéries lactiques, citado por GARCIA, Juan. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis para obtener el título de: Licenciado en química en

Stiles y Holzapfel, citados por Ramirez *et al*⁴¹, aseguran que las bacterias del género *Lactococcus* son utilizadas de forma frecuente como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos; en cuanto a sus características microbiológicas, el género consiste en células ovoides, Gram positivas, las cuales pueden encontrarse aisladas, formando pares o en cadenas; son homofermentativas, no forman esporas y tampoco poseen flagelos. Para su nutrición necesitan diversos aminoácidos y son también dependientes de diversas vitaminas.

Peñaflor⁴², menciona que suelen encontrarse en parejas o formando cadenas cortas, aunque la longitud de la cadena, está relacionada con la cepa y algunas veces por el medio de cultivo en donde se encuentren. Suelen aislarse con facilidad de diferentes hábitats como la leche cruda, los vegetales y también en la flora ruminal.

Pérez⁴³, explica que el tipo de especie para el género es *Lc. lactis* y en cuanto a su diferenciación con otras BAL, *Lactococcus* tienen una marcada tolerancia al pH, sal y temperaturas en el crecimiento.

4.4 *Lactobacillus gasseri*

Según Kurt y Klaenhammer⁴⁴, *Lactobacillus gasseri* fue descubierto a comienzos de 1970 por Francis Gasser, mientras se realizaron estudios en varios laboratorios con respecto a varias especies de *L. acidophilus*, posteriormente uno de los tres grupos que fueron caracterizados fue nombrado *L. gasseri*.

Según Fakhry *et al* citados por Di Luccia *et al*, afirman que: “*Lactobacillus gasseri* es una especie caracterizada de bacterias Gram positivas bajas en guanina y citosina (GC), conocidas por representar uno de los principales *Lactobacillus* homofermentativo del intestino humano”⁴⁵.

alimentos. Hidalgo: Universidad autónoma del estado de Hidalgo, instituto de ciencias básicas e ingeniería, 2007. 9 p

⁴¹ STILES, M. E. Y HOLZAPFEL, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Citado por RAMIREZ, José Carmen; ROSAS Ulloa, Petra; VELÁZQUEZ, Martha Yanina; GONZÁLES, José Armando y ROMERO, Francisco. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Junio, 2011. Vol, 2. No, 7. p. 2

⁴² PEÑAFLOR MORA, Nancy y GARCÍA GRUERREO, Andrés. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Trabajo de Grado licenciado en química de alimentos. Pachuca de soto, Hidalgo. Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de ciencias básicas e ingeniería. 2007. p. 16

⁴³ PÉREZ, Laura y SÁNCHEZ, Humberto. Inmovilización de *Lactococcus lactis*. En: XVI VERANO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. 2006. Memorias XVI VERANO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA de la UJAT. Villahermosa: UJAT, 2006. 230 p.

⁴⁴ KURT Selle y TODD R. Klaenhammer. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. En: FEMS Microbiology Reviews. Noviembre, 2013, vol 3, p. 929

⁴⁵ FAKHRY S; MANZO N; D'APUZZO E; PIETRINI L, SORRENTINI I, et al. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. Citado por DI LUCCIA Blanda. MANZO Nicola, BACCIGALUPI Loredana, CALABRÒ Viola, CRESCENZI Elvira, RICCA Ezio Y POLLICE Alessandra. *Lactobacillus gasseri* SF1183 Affects Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. Journal.pone. 2013, vol. 8 no 7. p. 2

Estudios encontrados por Anwar⁴⁶, infiere que *L. gasseri* se asocia con una variedad de funciones probióticas incluyendo la reducción de la actividad de las enzimas fecales mutagénicas, la adhesión a los tejidos intestinales, estimulación de los macrófagos y la producción de bacteriocinas capaces de disminuir organismos patógenos, denominadas como gassericin A según Hathout y Aly⁴⁷ y gassericin T según Arakawa *et al*⁴⁸.

Kurt y Klaenhammer⁴⁹, Afirman que *Lactobacillus gasseri* es un microorganismo el cual ha sido evaluado para la actividad probiótica sobre la adaptación específica a la mucosa humana. Características relacionadas a la cepa de *L. gasseri* pueden contribuir a la colonización nativa que incluye la tolerancia a ambientes de pH bajo, la resistencia a las sales biliares, y la adhesión al epitelio del huésped. En los humanos provoca diversos beneficios para la salud a través de su actividad antimicrobiana, producción de bacteriocina, y regula el sistema inmune, mediante el aumento o la disminución de la capacidad de producir anticuerpos. Existen evidencias fundamentadas en ensayos clínicos que muestran un mantenimiento de la homeostasis vaginal, la mitigación de la infección por *Helicobacter pylori*, y disminuye la diarrea.

Pot *et al*⁵⁰, sostienen que es un microorganismo prolífico autóctono que coloniza el TGI, cavidad oral, y la vagina en las mujeres. *L. gasseri* se clasifica como microorganismo complejo del grupo B. *acidophilus*, y puede ser diferenciado de los miembros del grupo A por la determinación genética y la aparente ausencia de grandes proteínas de la capa superficial (capa S) relacionados con la colonización de la mucosa contribuyendo a potenciar la actividad probiótica.

4.5 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Sánchez *et al*⁵¹, afirman que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tiene una amplia relevancia a nivel industrial por su capacidad de convertir azúcares casi exclusivamente en ácido láctico. Esta característica es muy valiosa, para la

⁴⁶ ANWAR, M. A., KRALJ, S., PIQUÉ, A. V., LEEMHUIS, H., VAN DER MAAREL, M. J., & DIJKHUIZEN, L. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 2010, vol. 156, no 4, p. 1264

⁴⁷ HATHOUT, Amal S.; ALY, Soher E. Role of lactic acid bacteria as a biopreservative agent of Talbina. *Journal of American Science*, 2010, vol. 6, no 12, p. 892.

⁴⁸ Arakawa, K., Kawai, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H., & Saito, T. Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*, in milk-based media. *International dairy journal*, 2009, vol. 19, no 10, p. 612.

⁴⁹KURT y KLAENHAMMER. Op., cit. 915

⁵⁰ POT, B., HERTEI, C., LUDWIG, W., DESCHEEMAER, P., KERSTERS, K., & SCHLEIFER, K. H. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Microbiology*, 1993, vol. 139, no 3, p. 513-517.

⁵¹ SÁNCHEZ, Claudia; NEVES, Ana; CAVALHEIRO, Joao; MOREIRA DOS SANTOS, Margarida; GARCÍA QUINTÁNS, Nieves; LÓPEZ, Paloma and SANTOS, Helena. Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH. *En: Applied and Environmental Microbiology*. 2007, Vol. 74. No. 4. p. 1136

fabricación de alimentos debido a que la acidificación que produce evita su deterioro. Por su parte Salminen *et al* citados por Lee *et al*⁵², comentan que *Lc. lactis* es utilizado ampliamente como una bacteria iniciadora en la fabricación de productos lácteos o cárnicos fermentados, y ha sido clasificado como un organismo probiótico debido a que es seguro cuando se usa en varios alimentos fermentados.

Además de su importancia en la acidificación de leche, Pisano *et al*⁵³, mencionan que *Lactococcus lactis* también contribuye a la formación del sabor en quesos mediante la creación de péptidos y aminoácidos, impide el incremento de bacterias patógenas y participa en la creación de condiciones de maduración óptimas.

Eijsink *et al* citados por Sadiq *et al*⁵⁴, comentan que Las BAL son capaces de producir diferentes bacteriocinas. Por su parte Delvis citado por Sadiq *et al*⁵⁵, infieren que la nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y es la única que es aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y es utilizada como bioconservante ampliamente por más de 50 países. Cheigh *et al* citados por Sadiq *et al*⁵⁶, explican que la nisina es un antibiótico constituido por 34 aminoácidos y se pueden encontrar las variantes A, F, Z y Q que son producidos por *Lc. lactis*. Según Pisano *et al*⁵⁷, las diferencias entre las variantes mencionadas, se fundan en cambios en la cadena de aminoácidos que los componen, la cual podrían interferir con su actividad antimicrobiana.

Con respecto al consumo de glucosa, Serna y Rodríguez⁵⁸ infiere que, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tiene un sistema enzimático que hidroliza el

⁵² SALMINEN, S; VONWRIGHT, A; MORELLI, L; MARTEAU, P, BRASSART, D and DE VOS, W. Demonstration of safety of probiotics a review. Citados por LEE, Kyoung; HAN, Kyoung; SON, Sung; EOM, Su Jin; LEE, Si and PAIK, Hyun. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. En: Food Science and Technology, Vol, 64. July 2015. p. 1036-1037

⁵³ PISANO, Maria Barbara; FADDA, Maria Elisabetta; MELIS, Roberta Maria; CIUSA, Laura; VIALE, Silvia; DEPLANO, Maura y COSENTINO, Sofia. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. En: Food Control. November 2014. Vol, 51. p. 1

⁵⁴ EIJSINK, V; AXELSSON, L; DIEP, D; HAVARSTEIN, L; HOLO, H and NES, I. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria. Citados por SADIQ, Sara; IMRAN, Muhammad; HASSAN, Muhammad, IQBAL, Mazhar; ZAFAR, Yusuf and HAFEEZ, Fauzia. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. En: LWT-Food Science and Technology, 28 (May.,2014); vol. 59, no 1, p. 205

⁵⁵ DELVIS BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. Citados por *ibíd.*, p. 205

⁵⁶ CHEIGH, C; CHOI, H; PARK, H; KIM, S; KOOK, M and KIM, T. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. Citados por *ibíd.*, 205

⁵⁷ Pisano *et al*, *Op. cit.*, p. 57

⁵⁸ SERNA COCK, Liliana y RODRÍGUEZ DE STOUVENEL, Aida. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from sugar cane plants. Electronic Journal of Biotechnology Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile [online]. 1, enero, 2006. vol. 9, núm. 1 [citado 12,

disacárido y luego metaboliza la glucosa, usando la vía glucolítica. En cuanto a su temperatura ideal

Akerberg *et al* citados por Serna⁵⁹, afirman que 33.5°C, es la temperatura óptima, en donde *Lactococcus lactis* produce la mayor cantidad de ácido láctico a partir de glucosa.

En otras investigaciones, se ha estudiado la acción del pH sobre las características del *Lactococcus lactis*, en las cuales Akerberg *et al*, citados por Serna y Rodríguez, encontraron que: “El pH óptimo establecido para el crecimiento y formación de producto está alrededor de 6”⁶⁰.

Kim *et al* citados por Rodríguez⁶¹, explican que *Lactococcus lactis* tiene una buena adaptación a ambientes con altas concentraciones de sacarosa y además puede sobrevivir y replicarse en niveles mayores de estrés, en comparación con otras cepas ácido lácticas. Kim *et al*, reportaron que “las cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* crecieron a 40°C y a un pH 9,2 así como en la presencia de 4% de NaCl”⁶².

4.6 *Yersinia pseudotuberculosis*

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica

REINO	<i>Bacterias</i>
PHYLUM	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gamma proteobacteria</i>
ORDEN	<i>Enterobacteria</i>
FAMILIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
GENERO	<i>Yersinia</i>
ESPECIE	<i>Peudotuberculosis</i>

Fuente: RYAN, KJ. RAY, CG. Sherris Medical Microbiology. Cuarta Ed. Editorial McGraw Hill. 2004. p. 98.

Según Correa, citado por Caycedo⁶³, la *Y. pseudotuberculosis* es la causante del 66% de la mortalidad en cuyes. Por lo general, los animales afectados presentan inapetencia, se aíslan del resto de los animales y permanecen quietos en los rincones; también presentan erizamiento, reseca de pelo y una rápida pérdida

octubre, 2015] p.41. Disponible en Internet:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173314716005>> E-ISSN: 0717-3458

⁵⁹ AKERBERG, Christina and ZACCHI, Guido. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. Citados por *Ibid.*, p. 41.

⁶⁰ *Ibid.* p. 41.

⁶¹ KIM, Woojin S.; REN, Jun and DUNN, Noel W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. Citados por *ibid.*, p. 42.

⁶² *Ibid.* p.58.

⁶³CORREA N. R. Limitantes sanitarias en la producción de cuyes en Colombia, citado por CAYCEDO VALLEJO, Alberto J. Experiencias investigativas en la producción de cuyes. Contribución al desarrollo técnico de la explotación. San Juan de Pasto- Colombia, GRAFICOLOR, 2000. p. 236.

de peso, sumado a una dificultad respiratoria. El curso de la enfermedad está en un intervalo entre 48 a 72 horas, sin embargo, cuando se ataca el aparato respiratorio, la muerte puede ocurrir a las 24 horas.

Según Caycedo: “Esporádicamente se presentan abortos, generalmente cuando las lesiones se extienden al aparato reproductor femenino; los signos nerviosos se han encontrado, cuando el germen ha colonizado el cerebro, cerebelo y médula espinal”⁶⁴.

4.6.1 Características microbiológicas. Según Jiménez⁶⁵, el género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y de las 11 especies conocidas, tres son conocidas como organismos infecciosos importantes para los seres humanos y animales; estas especies son: *Yersinia pestis*, algunos serotipos de *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

Paralelamente, Jiménez⁶⁶, explica que todas las bacterias que pertenecen al género *Yersinia*, son oxidasa negativa, catalasa positiva, anaerobias facultativas, no forman esporas; son cocobacilos que miden de 0.5-0.8 × 3.1µm de tamaño, tienen la capacidad de desarrollarse de 0°C a 4°C y en un rango amplio de pH de 4 a 10 con un óptimo de 7.6.

En cuanto a su morfología, Amaya⁶⁷, comenta que la *Y. pseudotuberculosis*, es un cocobacilo, Gram negativo, pequeño, pleomórfico, aerobio, se tiñe bipolarmente, y no posee cápsula.

Bercovier, Mollaret citados por Jiménez⁶⁸, afirman que la *Y. pseudotuberculosis* es urea positiva y puede diferenciarse de otras especies por su capacidad de fermentar el sorbitol, ramnosa, sacarosa y melibiosa.

Otras características de la *Y. pseudotuberculosis* descritas por Amaya y Calle⁶⁹, se refieren a la temperatura óptima para su desarrollo, la cual es de 25-38°C, presentan movilidad a 25°C y son inmóviles a 37°C, poseen flagelos polares, pueden sobrevivir por largo tiempo en el agua y en el suelo, no producen hemólisis en agar sangre.

⁶⁴ Ibid., p. 237.

⁶⁵ JIMÉNEZ VELÁSQUEZ, Sabrina Del Carmen. Identificación de proteínas de secreción con capacidad inmunogénica de aislamientos de *Yersinia pseudotuberculosis* provenientes de planteles cuyícolas del departamento de Nariño. Trabajo de grado, Magister en Ciencias Biológicas con énfasis en Microbiología Médica. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. 2011. p.11.

⁶⁶ Ibid., p.9

⁶⁷ AMAYA y CALLE. Op. cit., p. 5.

⁶⁸ BERCOVIER y MOLLARET. *Yersinia*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; BURNENS, FREY y NICOLET. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhea disease. Citados por JIMÉNEZ Op.,cit., p.11.

⁶⁹ AMAYA y CALLE. Op. cit., p. 49.

4.6.2 Yersiniosis. Según Kasper y Faud citados por Amaya y Calle:

“Es una zoonosis bacteriana poco frecuente, consiste en la infección por una de las dos especies enteropatógenas, la *Yersinia enterocolitica* o *Yersinia pseudotuberculosis*. De la infección con estas bacterias existen registros de casos, en diferentes países, indicando su distribución mundial. Los reservorios, de estas bacterias son el cerdo y otros animales tanto silvestres como domésticos”⁷⁰.

Estudios relacionados citados por Galindo *et al*⁷¹, Indica que algunos efectos relacionados con la *Yersinia* pueden causar infecciones zoonóticas en una variedad de huéspedes, incluyendo tanto a los animales salvajes, domésticos y aves, además clínicamente, las infecciones normalmente presentan formación de abscesos y diarrea, pero también puede dar lugar a complicaciones secundarias, como la insuficiencia renal aguda en casos raros. Las infecciones en humanos más comunes son ileocolitis linfadenitis mesentérica y el último de los cuales puede afectar el apéndice y confundirse con una apendicitis.

4.6.3 Patogénesis de la *Yersinia pseudotuberculosis*. Viboud citado por Gillenius⁷² menciona que *Y. pseudotuberculosis* migra a través de las células M (células epiteliales) a los tejidos linfoides más profundos conocidos como placas de Peyer (PP). Aquí las bacterias pueden combatir las células inmunes mediante la expresión de la secreción del sistema tipo III (SSTT). Bolin *et al*⁷³, aseguran que este sistema se codifica en forma de plásmidos (anillos de ADN) que codifica varias proteínas que se acumulan en una estructura delgada que alcanza a través de la membrana externa de *Y. pseudotuberculosis* en estrecho contacto con las células inmunes del huésped, estas proteínas bacterianas son conocidos como Yops (*Yersinia* outer proteins), donde se pueden transportar a través del citoplasma de las células inmunes e inhibir la señalización necesaria para la fagocitosis o inducir apoptosis en macrófagos.

Pujol y Bliska afirman que “se propaga por los ganglios linfáticos mesentéricos, característica común de la infección intestinal de la *Yersinia*. La bacteria después de 12 días de infección puede formar agregados extracelulares dentro de abscesos en donde puede resistir a la fagocitosis por los neutrófilos y provocar apoptosis (muerte celular) en macrófagos. La bacteria puede entrar en el torrente sanguíneo y causar septicemia, muy rara vez en el hombre, sin embargo, se

⁷⁰ KASPER, Braunwald; FAUD, Harrison; Principios De Medicina Interna, citado por ibíd., p. 7

⁷¹ GALINDO, C. L., ROSENZWEIG, J. A., KIRTLEY, M. L., & CHOPRA, A. K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Journal Of Pathogens*, 2011, vol. 2011. P. 2

⁷² Viboud GI, Bliska JB. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis citado por GILLENIOUS, Erik; URBAN, Constantin F. The adhesive protein invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* induces neutrophil extracellular traps via β 1 integrins. *Microbes and infection*, 2015, vol. 17, no 5, p. 327

⁷³ Bolin I, Norlander L, Wolf-Watz H. Temperature-inducible outer membraneprotein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 1982; 37:506e12. Citados por Ibíd., p. 327

puede diseminar desde el tracto intestinal a los principales órganos linfáticos como el bazo, el hígado y los pulmones, lo cual ocurre de manera muy eficiente en los roedores, dentro de las 18 a 24 horas después de la infección”⁷⁴.

Isberg y Barnes citados por Jiménez afirman que “En el lumen intestinal y en los ganglios linfáticos, la bacteria se mantiene unida al exterior de las células inmunes probablemente a través de la invasina y YadA (Yersinia adherence) que se unen a los glicosfingolípidos; es necesario la adhesión de cualquiera de estas proteínas para la formación del canal de translocación de proteínas entre la bacteria y la célula de huésped. Una vez internalizada por las células M, la bacteria es transportada a través de la barrera epitelial y es expulsada desde lado basolateral de las células M; la región sobre folículo asociado al epitelio se encuentra poblada por las células dendríticas, macrófagos y linfocitos.”⁷⁵

El mismo autor se infiere que la bacteria permanece estructuralmente intacta dentro de los fagosomas este mecanismo lo utiliza el microorganismo para sobrevivir dentro de los fagocitos como los macrófagos alveolares donde la bacteria se encuentra ilesa dentro de las células monocíticas presentes en las PP.

Viboud y Bliska citado por Jiménez manifiestan que “la translocación de Yersinia dentro de las PP en el intestino en el cual las bacterias se unen al epitelio intestinal, en las células M que recubren las PPs. Después de atravesar a las células M, las bacterias se encuentran con las células dendríticas y otros fagocitos. La bacteria unida a los fagocitos se localiza extracelularmente. Los fagocitos con las bacterias migran a los centros germinales, en donde las bacterias se replican y diseminan.”⁷⁶

Viboud y Bliska⁷⁷ señala que: en el lumen intestinal y en los ganglios linfáticos, la bacteria se mantiene unida al exterior de las células inmunes probablemente a través de la invasina puesto que es necesario la adhesión de esta proteína para la formación del canal de translocación de proteínas entre la bacteria y la célula del huésped.

Fujimura *et al* Citados por Grabenstein, *et al*⁷⁸, Basándose en el análisis histológico de las placas de Peyer de conejos infectados con Y.

⁷⁴ PUJOL, Céline; BLISKA, James B. Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clinical Immunology*, 2005, vol. 114, no 3, p. 220.

⁷⁵ ISBERG R and BARNES P. Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia. Citados por JIMÉNEZ Op.,cit , p. 36.

⁷⁶ VIBOUD G and BLISKA J. Yersinia Outer Proteins: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. Citados por *Ibíd.*, p. 37.

⁷⁷ *Ibíd.*, p. 38.

⁷⁸ Fujimura, Y., T. Kihara, and H. Mine. Membranous cells as a portal of Yersinia pseudotuberculosis entry into rabbit ileum citados por Grabenstein, J. P., Marceau, M., Pujol, C., Simonet, M., & Bliska, J. B. I. The response regulator PhoP of Yersinia pseudotuberculosis is important for replication in macrophages and for virulence. *Infection and immunity*, 2004, vol. 72, no 9, p. 4973-4984.

pseudotuberculosis ha demostrado que las bacterias pueden ser interiorizadas por macrófagos intraepiteliales en las primeras etapas de la infección por lo tanto, la supervivencia y replicación en macrófagos podrían desempeñar un papel importante en el proceso de infección de la *Y. pseudotuberculosis*.

4.6.4 Desarrollo de la enfermedad. Según Chauca citado por Amaya y Calle asegura que: “La infección en explotaciones de cobayos se produce por contaminación fecal de la comida a partir de roedores salvajes. En los cobayos se han identificado tres formas: la septicemia aguda, con muerte violenta a causa de la ruptura de un linfonódulo mesentérico; la septicemia crónica, con decaimiento progresivo y muerte en 3-4 semanas; y la afección congénita o inmediatamente después del nacimiento”⁷⁹.

4.6.5 Aspectos sanitarios. Con el crecimiento de los planteles de producción y de la misma forma el aumento del pie de cría, también aumenta la incidencia de enfermedades según Jiménez Velázquez: “El aumento en las explotaciones cuyícolas, deficiencias en la calidad sanitaria de la producción asociado a otras condiciones higiénicas, representan una limitante de salud en los sistemas de producción cuyícolas, de origen infeccioso. En Colombia reportes realizados en el Departamento de Nariño señalan a la Yersiniosis, causada por *Yersinia pseudotuberculosis* como la principal limitante de tipo infeccioso”⁸⁰.

Caycedo *et al*⁸¹, afirman que en Nariño, se ha identificado una cepa de *Y. pseudotuberculosis* presente en las producciones pecuarias, la cual se ha reportado, como causante de la enfermedad en el hombre y en diferentes especies animales. Además, el mismo autor comenta que por lo general, no se realiza el periodo de cuarentena, no existen barreras a la entrada del galpón y no se verifica el estado sanitario de los animales de remplazo, permitiendo que la persistencia de la Yersiniosis en las producciones cuyícolas, se deba especialmente a las prácticas inadecuadas de manejo de los animales.

Sumado a esto, Caycedo *et al*⁸², explica que la bacteria puede estar presente en pájaros, conejos, ratas y ratones sin ocasionarles daño, pero las excretas de los mismos puede llegar a los pastos, utensilios y alimentos de los cuyes.

⁷⁹ CHAUCA, Lilia. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. citado por Op.,cit 10 p.

⁸⁰ JIMÉNEZ VELÁSQUEZ. Op, cit., p. 4.

⁸¹ CAYCEDO VALLEJO Alberto J; ZAMORA BURBANO Ángel; ECHEVERRY POTOSI Sandra; ENRRIQUEZ CHAMORRO Rosa; ORTEGA DAVID Eduar; BURGOS VELASCO Marly y CAYCEDO EGAS Mario Andres. Producción sostenible de cuyes. Alternativa económica para la conservación de cuencas hidrográficas en Nariño. Pasto, Centro de publicaciones de la universidad de Nariño, 2011. p. 161.

⁸² CAYCEDO, *et al*. Op. cit., p. 160.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del grupo de investigación FISE – PROBIOTEC, ubicado en los laboratorios de Ciencias Pecuarias y en los laboratorios especializados – sección de cromatografía de la Universidad de Nariño sede Torobajo, Municipio de Pasto, departamento de Nariño.

5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

5.2.1 Materiales.

- Juego de antibióticos con 50 sensidiscos cada uno
- Cepa de *Lactobacillus gasseri* ATCC® 19992™
- Cepa de *Lactococcus lactis* ATCC® 11454™
- Cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580
- Agar cultivo MRS
- Agar Mueller Hinton
- Agar nutritivo
- Agar McConkey
- Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)
- Caldo MRS
- Agua peptonada buferada
- Tubos eppendorf
- Sales biliares y bilis bovina
- Salvado de trigo
- Leche de soya natural
- Leche en polvo
- Azúcar blanco refinado

5.2.2 Equipos.

- Autoclave
- Balanza analítica
- Incubadora

- Cámara de flujo laminar
- Espectrofotómetro uv-vis lambda 11
- Microscopio
- pH metro
- Crio centrífuga
- Shaker
- Estufa de luz
- Vortex
- Micropipetas volumen variable de 10-100µL y 100-1000µL

5.2.3 Vidriería

- Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000 ml
- Beakers de 50ml, 100ml y 300ml
- Pipetas volumétricas de 1ml, 5ml, 10ml
- Cajas Petri desechables
- Cajas Petri de vidrio
- Balones aforados de 250 ml
- Tubos de ensayo tapa rosca
- Perlas de vidrio
- Probetas de 50ml, 100 ml y 500ml
- Campanas Durham

5.2.4 Reactivos

- Reactivos para HPLC – Ácido láctico
- Peróxido de hidrógeno H₂O₂ 30% y 3,6%
- Ácido tartárico
- Glucosa anhidra
- Azul de anilina Reactivos tinción de Gram
- Fenolftaleína
- Antrona
- Hidróxido de sodio NaOH 0,2 N
- Ácido sulfúrico 95-97%

5.3 RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, VERIFICACION DE PUREZA Y CONSERVACIÓN DE *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

5.3.1 *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Las BAL, *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, pertenecen a una cepa de colección American Type Culture Collection ATCC® 19992™*- KS2C y ATCC® 11454™*- KS2D obtenidas mediante un laboratorio proveedor registrado ante la Universidad de Nariño.

Las cepas *L. gasseri* y *Lc. lactis*, se recibieron en dispositivos KWIK-Stik™, los cuales incluyeron una cepa de microorganismos en una sola pastilla liofilizada, un depósito de fluido hidratante, y un bastoncillo de inoculación.

5.3.2 Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (anexo A) en cámara de flujo laminar.

5.3.3 Siembra. Las BAL reconstituidas fueron sembradas en cajas de agar MRS con azul de anilina, utilizando un asa bacteriológica de argolla para esparcirlas sobre la superficie del medio de cultivo mediante la técnica de agotamiento. El tiempo de incubación se mantuvo en rangos de 24 a 48 horas, a una temperatura de 37°C.

5.3.4 Verificación de pureza y conservación. Se utilizó la tinción diferencial de gram para observar mediante microscopio la morfología y pureza de las BAL, posteriormente se procedió a realizar repiques de las cepas cada 8 días en cajas de agar MRS con azul de anilina y también en tubos con caldo MRS para mantener un stock vigente. Por último, se realizó la criopreservación de las bacterias en tubos eppendorf con glicerol al 25% a una temperatura de -20°C.

5.3.4.1 Producción de gas. Para verificar la producción de gas se utilizó caldo MRS enriquecido con 5% de glucosa en tubos con campanas Durham, se inóculo la bacteria con un patrón en la escala de McFarland de 4 (1.2×10^9 UFC/ml) realizando cinco replicas las cuales fueron incubadas por 24 horas a temperatura de 37°C. Para verificar la presencia de gas se utilizó la metodología de Cai *et al*⁸³. La prueba fue interpretada como positiva o negativa de acuerdo a la presencia o ausencia de gas respectivamente.

5.3.4.2 Actividad de catalasa. Con un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia de cultivo de 18 a 24 horas de incubación. Se colocó la colonia sobre una lámina portaobjetos y luego se dejó caer una gota de peróxido de hidrógeno sobre la colonia de la bacteria láctica seleccionada, para su interpretación como catalasa positivo o negativo se observa si hubo o no la formación de burbujas según lo afirman Dahl, Midden, y Hartman citados por Chaspuengal⁸⁴.

5.4 RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, VERIFICACION DE PUREZA Y CONSERVACIÓN DE *Yersinia Pseudotuberculosis*

⁸³CAI *et al*, Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Citados por *Ibid.*, p. 178

⁸⁴DAHL, Thomas; MIDDEN, W. Robert and HARTMAN, Philip. Comparison of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. Citados por *Ibid.* p. 47.

5.4.1 *Yersinia Pseudotuberculosis.* La bacteria patógena *Y. pseudotuberculosis*, pertenece a una cepa de colección National Collection of Type Cultures NCTC 8580 obtenida mediante un laboratorio proveedor registrado ante la Universidad de Nariño.

5.4.2 Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (anexo B) en cámara de flujo laminar.

5.4.3 Siembra. La bacteria patógena una vez reconstituida, fue sembrada en cajas petri con agar Mac Conkey debido a que es un medio específico para bacterias gram negativas; se manipulo la bacteria con un asa bacteriológica de argolla para esparcirlas sobre la superficie del agar mediante el método de siembra por agotamiento y se incubaron de 24 a 48 horas, a una temperatura de 37°C.

5.4.4 Verificación de pureza y conservación. Se empleó la tinción diferencial de gram para observar mediante microscopio la morfología y pureza de la bacteria patógena; posteriormente se procedió a realizar repiques cada 8 días en cajas de agar McConkey para mantener un stock vigente. Por último, se realizó la criopreservación de las bacterias en tubos eppendorf con glicerol al 25% a una temperatura de -20°C.

5.5 CULTIVO DEL INÓCULO DE *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

5.5.1 Elaboración del inóculo. Este proceso se realizó de forma metódica con las BAL antes de iniciar cada una de las pruebas de la siguiente forma: con el asa bacteriológica se tomó una azada de una de las cepas sembradas con anterioridad, en cajas de agar MRS con azul de anilina y fue transferida a un erlenmeyer 1, que contuvo 40 ml de caldo MRS estéril; posteriormente fue llevado a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Trascorridas las 24 horas, con una pipeta de 5 ml, se transfirieron 4 ml del contenido del erlenmeyer 1, a un erlenmeyer 2 que contuvo 40 ml de caldo MRS y se incubo por 24 horas a 37°C

Según Crueger y Crueger⁸⁵, es necesario que el porcentaje de inóculo se ajuste al 10% v/v, para iniciar la fermentación. Luego de este tiempo se calcula el número de bacterias por ml.

Con la ayuda de una pipeta, se tomó 1 ml del contenido del Erlenmeyer 2 y se procedió a hacer la lectura en espectrofotómetro a 625 nm. El patrón en la escala

⁸⁵ CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

de McFarland a la cual se ajustó la población bacteriana fue de 4, el cual equivale a $1,2 \times 10^9$ UFC/ml. En los casos en que se presentó mayor población de la establecida, se adiciono caldo MRS estéril teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad de acuerdo a Guerrero citado por Montes *et al*⁸⁶.

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar

M_2 = Densidad óptica, densidad utilizada primera fermentación

V_1 = 1 ml volumen proveniente del inóculo total.

X_1 = cantidad que contiene M_2

V_2 = lo que se agrega a 1 ml para ajustar a M_2 .

V_3 = cantidad total del inóculo

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

Se encuentra entonces X_1

$$\begin{array}{l} M_1 \text{ -----} M_2 \\ M_2 \text{ -----} X_1 \end{array}$$

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

Se encuentra entonces V_2

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2

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

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

⁸⁶ GUERRERO FLOREZ, Gladys Milena; GUZMAN SALAZAR, Sandra Sofía y YANDAR BARAHONA, Nubia Yadira. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado de tracto intestinal humano sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA *in vitro*, citados por MONTES CEBALLOS, Op cit., p. 87.

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_2}{V_1} \right)$$

5.5.2 Siembra de microorganismos (150 µL). El volumen de siembra en caja petri más azul de anilina, para las pruebas de temperatura, sales biliares y bilis bovina, pH y cinética de crecimiento fue de 150 µL, con el propósito de analizar la cantidad de UFC/150 µL presente en un volumen diferente al convencionalmente utilizado que es de UFC/ml.

5.6 RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

5.6.1 Resistencia de las BAL a 38°C y 45°C. Siguiendo la metodología de Cai *et al* citados por Calpa y Chaspuengal⁸⁷, se realizaron pruebas de crecimiento de las BAL seleccionada a temperaturas de 38 y 45°C. Inicialmente, se ajustó el inóculo de las BAL, al patrón 4 según la escala de McFarland en tubos con caldo MRS por 24 horas en incubadora. Al término de las 24 horas se procedió a sembrar 150 µL del caldo MRS en cajas petri de agar MRS con azul de anilina; en este paso se utilizaron perlas de vidrio para distribuir la alícuota eficientemente en las cajas petri. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 24 a 48 horas y finalmente se realizó el conteo de microorganismos en placa en donde fueron seleccionadas las cajas con conteos entre 30 y 300 UFC/150µL y valores de dilución iguales o superiores a 10⁷ UFC/mL

5.7 VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH

5.7.1 Resistencia a concentraciones de pH 2.5, 3.5, 4.5 y 6. Una importante característica probiótica, para la sobrevivencia y crecimiento de las bacterias en el TGI es la tolerancia a diferentes pH, según afirma Cai *et al*⁸⁸. Del mismo modo Sanz *et al*⁸⁹, reitera que la resistencia a la acidez gástrica es una situación de estrés que constituye una barrera limitante para su supervivencia en un ecosistema y por lo tanto debe ser evaluada de forma *in vitro* para la selección de probióticos.

Según Calpa y Chaspuengal citados por Toit *et al* “La acidez en el estómago de monogástricos puede alcanzar valores hasta de pH 2.0”⁹⁰. Por tal razón, el estudio

⁸⁷ CAI *et al*. Specific probiotic characterization of Weissella hellenica DS-12 isolated from flounder intestine. Citados por CALPA Y CHASPUEGAL Op. cit., p. 48.

⁸⁸CAI *et al*, Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Citados por Ibid. p. 47.

⁸⁹ SANZ, Y. COLLADO, M y DALMAU, J. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Citados por ALVARADO RIVAS, Carmen y DÍAZ RIVERO, Cándida. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. En: Rev Fac Farm, Agosto, 2009. p. 9

⁹⁰TOIT, 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

requerirá probar la viabilidad de la cepa seleccionadas frente a concentraciones de pH 2.5, 3.5, 4.5 y 6.

5.8 VIABILIDAD FRENTE A CONCENTRACIÓN DE SALES BILIARES Y BILIS BOVINA

5.8.1 Resistencia a 3, 4 y 5% de sales biliares. Para estudiar la viabilidad de *L. gasseri* y *Lc. lactis* frente a diferentes concentraciones de sales biliares se empleó el método recomendado por Cai *et al*⁹¹ y Cai *et al*⁹². La cepa se incubó en caldo MRS durante 24 y 48 horas probando concentraciones del 3%, 4% y 5% de sales biliares p/v, y posteriormente se efectuará la prueba de viabilidad.

La variable estudiada consistió en determinar esta viabilidad de la bacteria láctica seleccionada expresada en concentraciones iguales o mayores de 10⁹ UFC/ml. La presencia de sales biliares y su actividad enzimática inhibe un buen porcentaje de microorganismos durante el paso por el tracto digestivo.

5.8.2 Resistencia a 0.5, 1 y 2% de bilis bovina. Para estudiar la viabilidad de la cepa seleccionada frente a diferentes concentraciones de bilis bovina se empleó el método recomendado por Cai *et al*⁹³ y Cai *et al*⁹⁴. La cepa se incubará en caldo MRS durante 24 y 48 horas probando concentraciones del 0,5%, 1% y 2% de bilis bovina y posteriormente se efectuará la prueba de viabilidad.

Según lo expresa Menezes y Gil⁹⁵ con la verificación de la viabilidad de los microorganismos después de ser sometidos a diferentes concentraciones de sales biliares, sería posible predecir si son resistentes a las condiciones de circulación por el tracto digestivo.

5.9 ESTUDIOS DE INHIBICIÓN

and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Citados por CALPA Y CHASPUENGAL Op cit., p. 47.

⁹¹CAI, Yimin; BENNO, Yoshimi; NAKASE, Tasakashi and OH, Tae-Kwang. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. Citados por CALPA Y CHASPUENGAL Op cit., p. 46.

⁹²CAI, Yimin; SUYANANDANA, Puangpen; SAMAN, Premsuda and BENNO, Yoshimi. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Citados por Ibid. p. 46.

⁹³CAI, Yimin; BENNO, Yoshimi; NAKASE, Tasakashi and OH, Tae-Kwang. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. Citados por CALPA Y CHASPUENGAL Op cit., p. 46.

⁹⁴CAI, Yimin; SUYANANDANA, Puangpen; SAMAN, Premsuda and BENNO, Yoshimi. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Citados por Ibid., p. 46.

⁹⁵ MENEZES, Mario and GIL, Carlos. Probiotics and immune response. Citados por Ibid., p. 47.

5.9.1 Poder de inhibición frente a patógenos y comparación frente a antibióticos.

5.9.1.1 Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos. Las BAL *L. gasseri* y *Lc. Lactis*, y la bacteria patógena *Y. Pseudotuberculosis*, fueron sometidas a ensayos de inhibición frente a los siguientes antibióticos: penicilina P 10 IU, cefalotina KF 30 µg, ciprofloxacina CIP 5 µg, gentamicina CN 10 µg, dicloxacilina DCX 1 µg mediante la metodología de a Bauer *et al*⁹⁶, (Anexo C) con el propósito de evaluar y compara su nivel de sensibilidad o resistencia. (Anexo D)

5.9.1.2 Ensayos de inhibición *in vitro*. La inhibición de *Y. Pseudotuberculosis* ATCC 8580, se determinó por el método similar al de Bauer *et al*⁹⁷, donde fue tomados discos de la bacteria láctica sembrada en masa en agar MRS con azul de anilina y se colocaron en una caja petri con la bacteria patógena sembrada con antelación. El tamaño del halo, fue medido desde el borde del disco de agar hasta el extremo del halo producido por la inhibición de la bacteria patógena. El tamaño crítico del halo para determinar si hubo inhibición fue igual o superior a 2 mm. Además de esta prueba se sometió la bacteria patógena a diferentes ensayos de los cuales se encuentran la técnica por difusión en agar con discos impregnados, método de difusión en cilindro plástico y el método de difusión en pozos con doble capa modificado (Anexo E).

5.10 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

5.10.1 Características de la cinética. Se realizaron pruebas en los medios de cultivo MRS y Medio PRO (Anexo F, tabla 1) en donde se analizaran cuáles son las condiciones para la producción de biomasa de las cepas seleccionadas.

Tabla 1. Composición de los Medios de cultivo MRS y PRO

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: CALPA YAMÁ Fredy Yesid y CHASPUENGAL TULCÁN Aura Magdalena. Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. Trabajo de pregrado Zootecnista. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. 2013. p. 8.

⁹⁶ BAUER, A. W., Kirby, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology, 1966, vol. 45, no 4, p. 493.

⁹⁷ Ibid p. 493.

La cinética de fermentación se efectuó inoculando la bacteria probiótica en un erlenmeyer con el medio ajustada por espectrofotometría a 625 nm en incubación a 37°C en agitación constante en un shaker a 100 rpm, se tomaron asépticamente 20 mL de sustrato en siete (7) tiempos que corresponden a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas de fermentación (el tiempo 0 perteneció a las condiciones iniciales del sustrato). Las variables que se evaluaron fueron: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), determinación de pH, % de ácido láctico por titulación, determinación de consumo de azúcar totales, determinación de proteína, determinación de producción de ácido láctico por HPLC y evaluación de la producción de biomasa.

Cuadro 2. Diseño de medidas repetidas para la selección del medio de cultivo.

Tipo de bacteria		<i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
Horas		0	4	8	12	16	20	24
Medio de cultivo	MRS							
	PRO							

5.10.2 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/150 µl. La técnica de conteo en placa proporciona 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 tomó 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1% y se hicieron diluciones decimales; de las diluciones comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-12} se hizo la siembra en cajas de Petri con agar MRS y azul de anilina. Las cajas fueron incubadas a temperatura entre 37°C y fueron observadas entre las 24 y 48 horas. Se consideraron las cajas de Petri con conteos de UFC/ml entre 30 y 300 colonias. Según Lanara: “El número de colonias será multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/ml formadas”⁹⁸.

5.10.3 Determinación de pH. La evolución del pH se verificó mediante la medición con un pH metro.

5.10.4 Determinación % ácido láctico. La acidez total se expresa en porcentaje de ácido en 100 ml o en 100 g de muestra. Se realizó aplicando el método de titulación con Hidróxido de sodio 0,1N.

⁹⁸LANARA, 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; 2 (25): 1-15.

Se mezcló cuidadosamente la muestra y se transfirió con una pipeta volumétrica de 9 ml a una cápsula de porcelana. Se emplearon 3 gotas de solución alcohólica de fenolftaleína como indicador y se valoró con solución NaOH 0.1 N, hasta la aparición de una coloración rosa.

Los resultados de acidez se expresaron 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:

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

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

5.10.5 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 Dubois⁹⁹ (Anexo G), conocido por el método de Antrona. Se prepararon 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 realizó una gráfica de la concentración en mg/L para obtener la ecuación de la recta.

La dosificación de los azúcares presentes en las muestras en estudio fue efectuado sobre 2.5 ml de muestra previamente diluida en agua destilada y adicionados 5 ml de Antrona preparada en ácido sulfúrico. Los valores obtenidos de las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y multiplicados por el factor de dilución.

5.10.6 Determinación de proteínas. Método de Lowry modificado. La determinación se realizó según el método de Lowry (Anexo H).

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul, (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm. Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

⁹⁹DUBOIS, 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.

Se ajustó 1 ml de patrones de la curva estándar y se efectuaron muestras por duplicado. Se adiciona 0.5 ml de NaOH 2 N a todos los tubos, se colocan en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos, se dejaron reposar en baño de agua fría, se agregan 0.5 ml de H₂SO₄ 2.6 N. posteriormente se agregaron 0.9 ml de solución A, se lleva por 10 minutos a baño María a 50°C, se dejó Reposar en baño de agua fría. Posteriormente se añade 0.1 ml de solución B, Colocar por 10 minutos en la oscuridad, en el instante se preparó la solución C y consecutivamente se adicionaron 3 ml según Romero¹⁰⁰.

Se prepararon las soluciones de la siguiente manera:

Solución A: se diluyeron 0.5 gr de tartrato de sodio potasio, 25 gr de carbonato de sodio, 125 ml de hidróxido de sodio 1 N en 125 ml de agua destilada.

Solución B: se disolvieron 2 gr de tartrato de sodio y potasio, 1 gr de sulfato de cobre en 10 ml de hidróxido de sodio 1 N y se adiciono 90 mL de agua destilada.

Solución C: se preparó una solución de agua destilada y reactivo de Folin Cicolteu en proporción 14:1. (Preparar al momento de usar). Se adiciona 3 mL de esta solución a la muestra problema.

Solución estándar de seroalbumina bovina: se disolvió la seroalbumina en 15 mg en 50 ml de agua destilada el resto se almaceno en congelador. Concentración final 300 mg/mL

5.10.7 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 definidos por Crueger¹⁰¹ y Rodríguez *et al*¹⁰². La velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación tiempo de duplicación celular.

Velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación

¹⁰⁰ ROMERO, Nalda. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. Capítulo 15. FAO. p. 171.

¹⁰¹CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Citados por CALPA y CHASPUENGAL. Op cit., p 50.

¹⁰²RODRÍGUEZ, L.; BUENO, G.; RODRÍGUEZ, DE.; DELGADO, G.; SERRANO, P. and BRIZUELA, MA. True and apparent yields, maintenance coefficient, and their significance on fermentation kinetics. Citados por Ibid., p 50.

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

Tiempo de duplicación celular:

$$td = \frac{\ln 2}{v}$$

5.10.8 Identificación de péptidos y ácido láctico del sobrenadante por HPLC - DAD. La muestra para análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se preparó de la siguiente forma:

Se cultivó la cepa en caldo MRS por 24 horas a temperatura entre 37°C, posteriormente se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica 1.00 en escala McFarland patrón 4 equivalente a una concentración de 1.2×10^9 bacterias/ml. Luego se transfirieron muestras en tubos eppendorf y se centrifugaron a 13.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos a 4°C. Por último el sobrenadante se filtró utilizando membranas PVDF de 0,2 micras

En cuanto a la determinación de ácido láctico del sobrenadante de cada muestra se filtra, posteriormente se adiciono 100 microitros de ácido nítrico 0.1N a 1,5 mL del filtrado el cual se centrifugo a 1500 rpm durante 30 minutos a 4°C y se llevó a lectura mediante cromatografía con las siguientes especificaciones.

- Equipo: Cromatógrafo Líquidos HPLC Waters – Bomba Binaria 1525 3.2
- Columna: C18 300Å (Júpiter, Phenomemex 150mm x 4,6 mm) 3.3
- Detector: PDA 2998 a 214 y 280nm Scan (200-350nm) 3.4
- Inyector: Rheodyne Loop de 20µL

5.11 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.11.1 Modelo matemático. Para establecer el efecto del medio MRS Y el medio PRO sobre las variables *Lc. lactis* y *L. gasseri*, se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, utilizando el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico de SAS teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5% (p menor 0.05)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = Valor de la respuesta medida para el tiempo k en el sujeto j asignado al tratamiento i .

μ = Media general.

$\alpha_i + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik}$ = Media para el tratamiento i en el tiempo k , asociado con los efectos fijos tratamiento (α_i), tiempo (τ_k) y la interacción tratamiento por tiempo ($\alpha\tau)_{ik}$.

e_{ijk} = Error aleatorio asociado al sujeto j asignado en el tratamiento i para el tiempo k .

5.11.2 Formulación de hipótesis

5.11.2.1 Hipótesis nula (H₀): Las bacterias del género *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* no tendrá ningún efecto inhibitorio sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

5.11.2.2 Hipótesis alterna (H_a): Las bacteria del género *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tendrá efecto inhibitorio sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

5.11.3 Variables a evaluar.

- **Variable 1.** Conteo de microorganismos. Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L), para *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.
- **Variable 2.** Determinación de pH.
- **Variable 3.** Determinación de producción de ácido láctico
- **Variable 4.** Cuantificación de azúcar para el crecimiento de la bacteria que permita establecer la relación de consumo/crecimiento celular.
- **Variable 5.** Cuantificación de proteína para el crecimiento de la bacteria que permita establecer la relación de consumo/crecimiento celular.
- **Variable 6.** Producción de biomasa de las cepas probiótica en términos de tiempo.

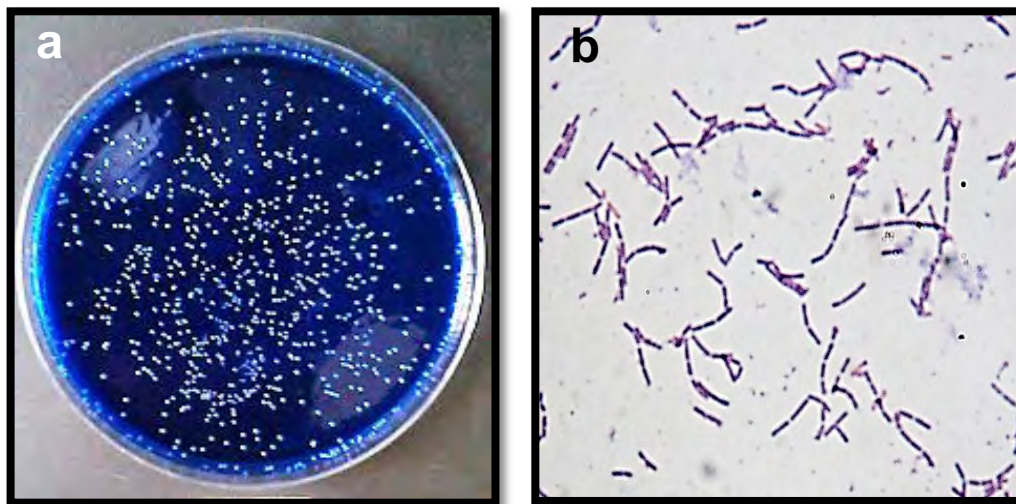
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Yersinia pseudotuberculosis*

6.1.1 *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Una vez que las cepas probióticas fueron reconstituidas y cultivadas, se realizó la tinción de Gram, para poder descartar microorganismos contaminantes que afecten os resultados.

En la figura 1 se puede observar la morfología de *L. gasseri* bajo el lente del microscopio a 100X, en donde se puede observar su morfología, la cual corresponde a estructuras bacilares delgadas, Gram positivas, algunos se encuentran solos y otros están formando pequeñas cadenas, lo cual concuerda con lo reportado por Azcarate *et al*¹⁰³, cuando menciona que *L. gasseri* está formado por pequeñas varillas con extremos redondeados de 0,6 a 0,8 por 3 a 5 μm de tamaño.

Figura 1. a: *Lactobacillus gasseri*, morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina; b: morfología microscópica.



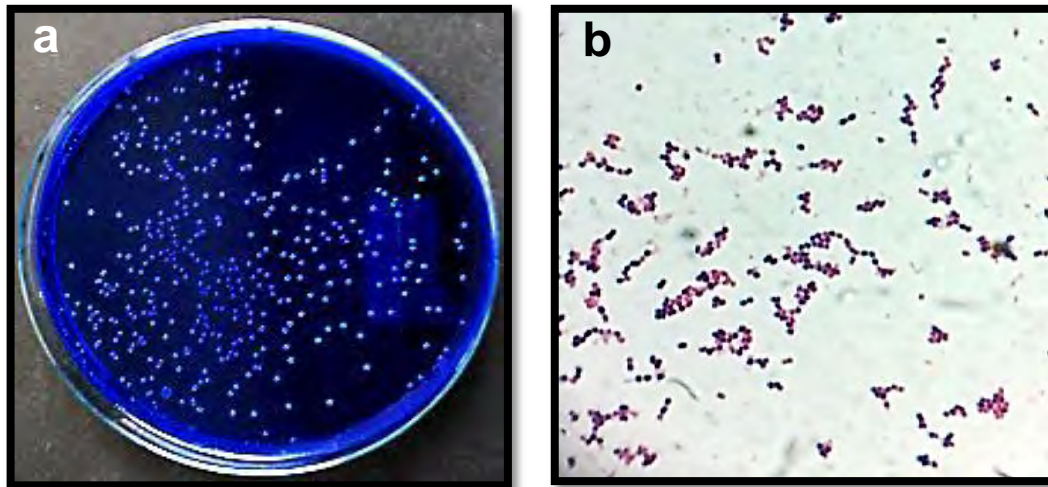
En la figura 2 se observada la morfología para *Lc. lactis*, de la cual se pude inferir que son cocos, Gram positivos, que pueden estar aislados o formando grupos. Esta información concuerda con lo reportado por Peñaflor y García¹⁰⁴ quien afirma

¹⁰³ AZCARATE PERIL, Andrea; ALTERMANN, Eric; JUN GOH, Yong; TALLON, Richard; SANOZKY DAWES, Rosemary; PFEILER, Erika; O'FLAHERTY, Sarah; BUCK, Logan; DOBSON, Alleson; DUONG, Tri; MILLER, Michael; BARRANGOU, Rodolphe and KLAENHAMMER. Analysis of the Genome Sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 29 (Feb., 2008); Vol. 74, no. 15, p.4616.

¹⁰⁴ PEÑAFLOR y GARCÍA, Op.,cit p. 16

que el *Lc. Lactis* subsp. *lactis* es un coco, inmóvil el cual se encuentra en parejas o formando cadenas cortas

Figura 2. a: *Lactococcus lactis*, morfología macroscópica en agar MRS con azul de anilina; b: morfología microscópica.



6.1.2 Producción de gas y actividad de catalasa de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. La producción de gas para *L. gasseri* y *Lc.* fue negativa ya que no se observó la presencia del mismo al interior de los tubos Durham. En cuanto al ensayo de actividad de catalasa, las BAL estudiadas demostraron ser catalasa negativa, ya que no se encontraron burbujas ni efervescencia (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de gas y actividad de catalasa.

Bacteria	Producción de gas	Actividad de catalasa
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Negativa	Negativa
<i>Lactococcus lactis</i>	Negativa	Negativa

Según Peñaflor y García¹⁰⁵ la enzima catalasa, degrada el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y para poder hacerlo requiere de un grupo porfirinico (citocromo), mismo que las BAL no pueden sintetizar; por tal motivo las BAL no poseen catalasa y esto permite identificarlas como catalasa negativas. Con respecto a la producción gas, Agüero *et al*¹⁰⁶, comenta que la ausencia de gas de una bacteria probiótica es

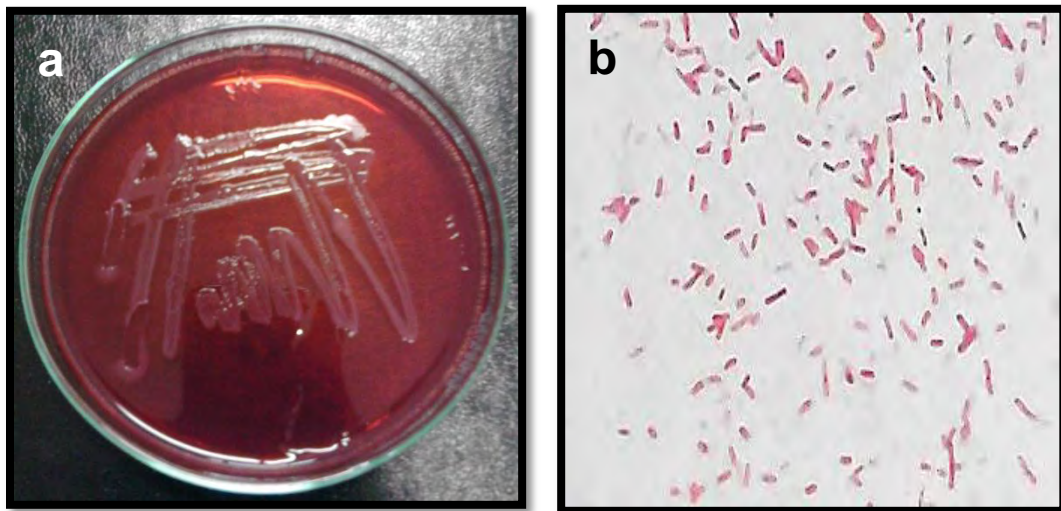
¹⁰⁵ *Ibíd.*, p.4

¹⁰⁶ AGÜERO, Nadia de Lourdes; ALBARRACÍN ORIO, Andrea; MIER, Alfredo Esteban; ALEU, Gonzalo; ZOGBI, Ana Paola; ROSMINI, Marcelo Raúl y FRIZZO, Laureano Sebastián. Evaluación de la producción de ácido láctico y gas por cepas autóctonas y comerciales potencialmente iniciadoras y probióticas para productos cárnicos. En: XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, 2014. p. 1

una de las características deseables para ser usada como cultivo iniciador en la industria cárnica. En estudios con *Lactobacillus casei* Jurado y Guzman¹⁰⁷, reporta resultados negativos para producción de gas y actividad de catalasa, los cuales son similares a los encontrados en esta investigación. De este modo es posible inferir que los datos analizados son acordes con otras investigaciones.

6.1.3 *Yersinia pseudotuberculosis*. En la figura 3 se pueden observar la morfología de la bacteria patógena *Y. pseudotuberculosis*, la cual corresponde a cocobacilos pequeños, se encuentran solos o en pares y su coloración es rosa, lo que permite inferir que son Gram negativas. En concordancia, Amaya y calle¹⁰⁸ y Jiménez¹⁰⁹ afirman que *Y. pseudotuberculosis* es un cocobacilo Gram negativo que mide entre $0.5-0.8 \times 3.1 \mu\text{m}$ de tamaño.

Figura 3. *Yersinia pseudotuberculosis*; a. morfología macroscópica en agar MacConkey; b. morfología microscópica



6.2 PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A ANTIMICROBIANOS Y COMPARACIÓN CONTRA PATÓGENOS

6.2.1 Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. La prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a BAL se encontró *L. gasseri* mostró resistencia a la cefalotina y dicloxacilina; y fue sensible a la penicilina, ciprofloxacina y gentamicina. Por lo que respecta a *Lc. lactis*, mostró ser resistente

¹⁰⁷ JURADO GÁMEZ, H y GÚZMAN INSUASTY, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. En: Rev Med Vet Zoot. (Ago., 2105); Vol 62, no 2, p. 28

¹⁰⁸ AMAYA y CALLE Op.,cit. p. 5

¹⁰⁹ JIMÉNEZ Op.,cit. p. 11

a la dicloxacilina y fue sensible a la penicilina, cefalotina, ciprofloxacina y gentamicina (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

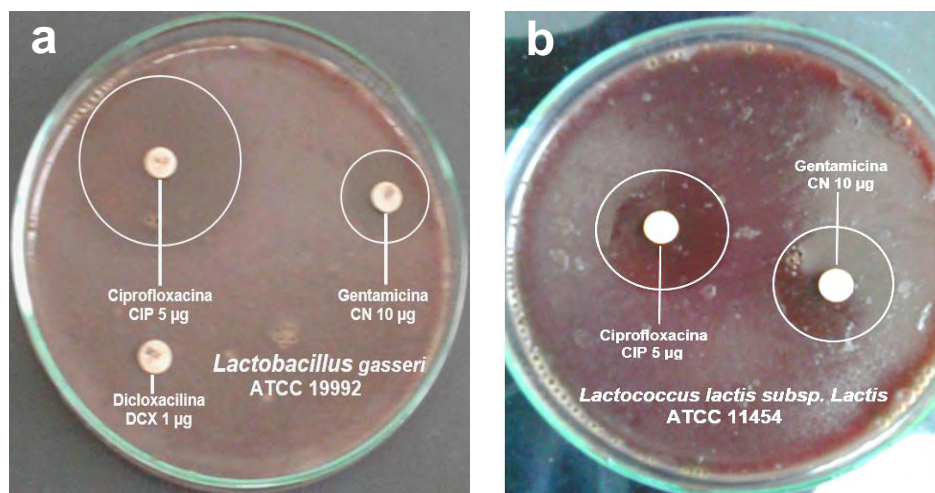
Antibióticos	Diámetro halo de inhibición <i>L. gasseri</i> (mm)	Nivel de sensibilidad Sensible (S) Resistente (R)	Diámetro halo de inhibición <i>Lc. lactis</i> (mm)	Nivel de Sensibilidad Sensible (S) Resistente (R)
Penicilina P 10 IU	40	S ^{ab}	40	S ^{ab}
Cefalotina KF 30 µg	9	R ^a	22	S ^a
Ciprofloxacina CIP 5 µg	34	S ^{bc}	26	S ^{bc}
Gentamicina CN 10 µg	15	S ^a	24	S ^a
Dicloxacilina DCX 1 µg	0	R ^{ab}	0	R ^{ab}

a. Centro de controle e produtos para diagnósticos Ltda. CECON¹¹⁰

b. Manual para antibiograma LABORCLIM¹¹¹

c. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement¹¹²

Figura 4. a. Susceptibilidad frente a antimicrobianos de *Lactobacillus gasseri*; b. Susceptibilidad frente antimicrobianos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.



¹¹⁰ CENTRO DE CONTROLE E PRODUTOS PARA DIANOSTICOS LTDA CECON. [online]. [Citado 6 enero 2016] Disponible en: <<http://www.ceconsp.com.br/>>

¹¹¹ Laborclin, Manual de antibiograma [online]. Rua Cassemiro de Abreu. Marzo, 2013. [Citado 14 febrero 2016]. Disponible en Internet: <http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_238.pdf>

¹¹² Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement [online]. West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania. Vol. 34 No. 1. [Citado 14 febrero 2016].

Según Flórez¹¹³, los *Lactococos* son sensibles en general a macrólidos, antibióticos de amplio espectro como aminoglicósidos (gentamicina y kanamicina) vancomicina, tetraciclinas y cloranfenicol. En cuanto a los *Lactobacilos*, son sensibles a las penicilinas y otros β -lactámicos, aunque muestran una ligera resistencia a la oxacilina y a las cefalosporinas.

Sanz *et al* citados por Alvarado y Díaz¹¹⁴ consideran que un requisito sustancial que deben cumplir las especies bacterianas probióticas, es la ausencia de resistencia a antimicrobianos, porque debe impedirse el riesgo de que las cepas puedan transferir genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas o potencialmente patógenas que se encuentren en el TGI del huésped. Por lo anterior Charteris *et al* citados por Alvarado y Díaz¹¹⁵ ratifican, que en la selección de especies con potencialidades probióticas, se incluya el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos.

Como se mencionó anteriormente, *L. gasseri*, presentó resistencia a cefalotina y dicloxacilina; por su parte, RUBIO *et al*¹¹⁶, informaron sobre la resistencia que presentaron dos cepas de *Lactobacillus gasseri* CTC1700 y CTC1704 frente a kanamicina y clindamicina. Según Azcarate *et al* citados por Selle y Klaenhammer¹¹⁷ la evaluación de la secuencia genómica de *L. gasseri* ATCC 33323 permitió concluir que no existen genes indeseables de resistencia a antibióticos que puedan ser transmisibles, pero también concluyen, que no es válido suponer que todas las cepas de *L. gasseri* presenten ausencia de genes de resistencia a antibióticos transmisibles. Este mismo criterio puede aplicarse para *Lc. lactis* ya que es posible que otras cepas de esta bacteria presenten resistencia a los mismo antibióticos que en esta investigación se registraron como sensibles. Por tal motivo Azcarate *et al* citados por Selle y Klaenhammer¹¹⁸, plantean que es necesaria la evaluación de resistencia a antibióticos y la secuenciación del genoma de cepas con potencial probiótico antes de su comercialización.

Lc. lactis mostró ser resistente únicamente a dicloxacilina, por su parte Perreten *et al* citados por Florez¹¹⁹ informan que en la cepa *Lc. lactis* K214, aislada de un queso fresco fabricado con leche cruda, se halló un plásmido (pK214), portador de tres genes de resistencia a estreptomycin, cloranfenicol y tetraciclina.

¹¹³ FLOREZ Op., cit. p.16

¹¹⁴ SANZ *et al* Op. Cit., Citados por ALVARADO y DÍAZ Op. Cit., p. 9

¹¹⁵ CHARTERIS W, KELLY P, MORELLI L, COLLINS, J. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. Citados por *Ibid.*, p.10

¹¹⁶ RUBIO, Raquel; JOFRÉ, Anna; MARTÍN, Belén; AYMERICH, Teresa y GARRIGA, Margarita. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. En: Food Microbiology, August, 2013. p. 303

¹¹⁷ AZCARATE *et al* Op.cit Citados por SELLE and Op.cit., p. 917

¹¹⁸ *Ibid.*, p.917

¹¹⁹ PERRETTEN. V., SCHWARZ, F., CRESTA, L., BOEGLIN. M., DASEN, G., and TEUBER. M. Antibiotic resistance spread in food. citados por FLOREZ Op., cit. p.11

Salyers *et al*, citados por Florez¹²⁰ mencionan que la resistencia a los antibióticos se convierte en un peligro potencial cuando está presente en los microorganismos beneficiosos, ya que estos podrían convertirse en reservorios desde dónde los determinantes podrían transferirse a los microorganismos patógenos y a los oportunistas. Por tal razón, según los resultados encontrados y el perfil de susceptibilidad reportado en este estudio, es posible inferir que *L. gasseri* y *Lc. lactis*, son cepas potencialmente seguras, y con ellas se disminuye el riesgo de transmitir genes de resistencia a bacterias patógenas para penicilina, ciprofloxacina y gentamicina en el caso del *L. gasseri* y penicilina, cefalotina, ciprofloxacina y gentamicina para *Lc. lactis*.

6.2.2 Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a *Yersinia pseudotuberculosis*. Esta prueba permitió observar que *Y. pseudotuberculosis* fue sensible a penicilina, cefalotina, ciprofloxacina y gentamicina y mostro resistencia únicamente a dicloxacilina (Tabla 4, figura 5)

Tabla 4. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana frente a *Yersinia pseudotuberculosis*

Antibiótico	Diámetro halo de inhibición (mm) <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Nivel de Sensibilidad, Sensible (S) Resistente (R)
Penicilina P 10 IU	24	S ^{abc}
Cefalotina KF 30 µg	43	S ^b
Ciprofloxacina CIP 5 µg	40	S ^{ad}
Gentamicina CN 10 µg	28	S ^{abcd}
Dicloxacilina DCX 1 µg	0	R ^{cd}

a. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012¹²¹

b. Centro de controle e produtos para diagnósticos Ltda. CECON¹²²

c. CALPA Y CHASPUENGAL, Aura *et al*¹²³

d. JURADO *et al*¹²⁴

En estudios similares, Calpa Y Chaspuengal *et al*¹²⁵, encontró que *Y. pseudotuberculosis* presentó resistencia a la dicloxacilina, y sensibilidad a los demás antibióticos evaluados en este estudio, corroborando estos resultados. Por su parte Jurado *et al*¹²⁶, reportó resultados similares en cuanto a la resistencia que

¹²⁰ SALYERS, A. A., GUPTA, A., and WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics resistance genes. Citados por *Ibíd.*, p.17

¹²¹ The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [en línea] Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>. [citado en 20 de marzo de 2016]

¹²² CENTRO DE CONTROLE E PRODUCTOS PARA DIANOSTICOS LTDA CECON. [online]. [Citado 6 enero 2016] Disponible en: <<http://www.ceconsp.com.br/>>

¹²³ CALPA Y CHASPUENGAL. Op. cit., p.57

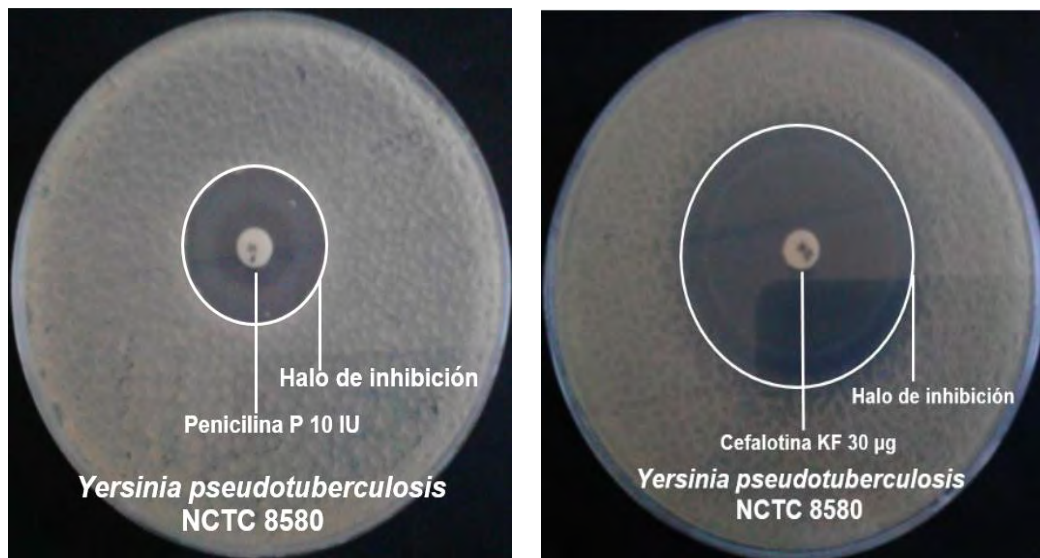
¹²⁴ JURADO *et al* Op. cit., p.54

¹²⁵ CALPA Y CHASPUENGAL. Op. cit., p.57

¹²⁶ JURADO *et al* Op. cit., p.54

presenta la *Y. pseudotuberculosis* a la dicloxacilina, pero encontraron diferencias con respecto a la penicilina y cefalotina. Estas diferencias podrían ser a una posible adaptación de la bacteria patógena según explica Hawkey citado por Florez¹²⁷, cuando menciona que la presencia de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ocurrir por la propagación de los sistemas de defensa que presentan las cepas o también a cambios en genes, en donde proteínas codificadas pueden modificar su actividad hasta que son capaces de proteger o modificar el blanco de acción.

Figura 5. Susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a *Yersinia pseudotuberculosis*.



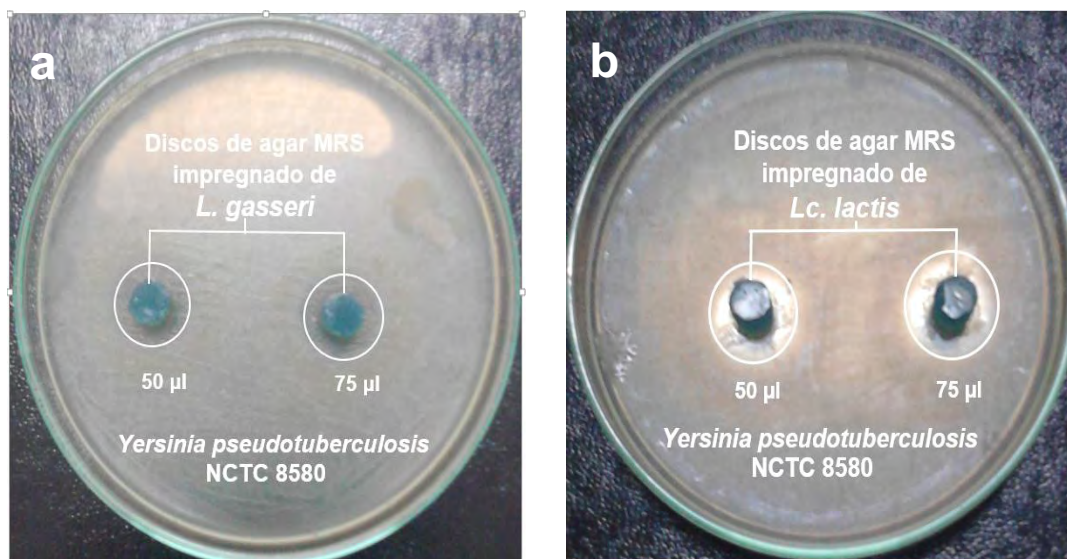
6.2.3 Ensayos de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus gasseri* y a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a *Yersinia pseudotuberculosis*. En este ensayo se encontró que la bacteria patógena estudiada fue sensible a la acción inhibitoria de *L. gasseri* y *Lc. lactis* en las concentraciones de 50, 75, 100 y 150 µl, produciendo halos de 3 y 4 mm en las dos cepas. El halo de mayor tamaño producido por *L. gasseri*, fue de 4 mm en la concentración de 75 µl. Por su parte *Lc. lactis* presentó halos de 4 mm para las concentraciones de 75 µl y 100 µl (Tabla 5, figura 6).

¹²⁷ HAWKEY PM. Mechanisms of resistance to antibiotics. Intens. Citado por FLOREZ Op. cit., p.5

Tabla 5. Acción inhibitoria de *Lactobacillus gasseri* y a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a *Yersinia pseudotuberculosis*

Medio	Concentración (µl) y medida del halo (mm) para <i>Lactobacillus gasseri</i>			
		50 µl 3 mm	75 µl 4 mm	100 µl 3 mm
TSA	Concentración (µl) y medida del halo (mm) para <i>Lactococcus lactis</i>			
		50 µl 3 mm	75 µl 4 mm	100 µl 4 mm

Figura 6. Discos de agar impregnados de BAL. a. *Lactobacillus gasseri*; b. a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.



El resultado de la acción inhibitoria que presentaron la BAL estudiadas podría corresponder a la producción de sustancias inhibitorias como el ácido láctico, peróxido, enzimas y posibles bacteriocinas las cuales son características del metabolismo de las bacterias lácticas según lo afirma Aguirre y Ramirez¹²⁸. De modo similar Mishra y Lambert citados Delgado¹²⁹, considera que las BAL producen varias sustancias como ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y sustancias relacionadas, que pueden tener efectos antimicrobianos.

¹²⁸ AGUIRRE, Diana y RAMÍREZ, Cristina. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: Rev MVZ Córdoba, 25 (Ago., 2009); Vol 14, no 2, p. 1732

¹²⁹ MISHRA Ch, and LAMBERT, J, Production of antimicrobial substances by probiotics. Citados por DELGADO PALACIO. Op. cit., p.11

La respuesta antagónica, tipificada mediante la medida de los halos para *L. gasseri* es muy similar entre las concentraciones evaluadas; resultados similares fueron encontrados por Delgado¹³⁰ en su estudio de inhibición de lactobacilos frente a bacterias patógenas, en donde se establece que *L. gasseri* presenta actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, con halos de que van desde 2 a 5 mm. De igual forma Rubio *et al*¹³¹, afirman en su estudio con 23 cepas de *Lactobacillus* diferentes, que únicamente las cepas de *L. gasseri* mostraron antagonismo contra *L. monocytogenes* y *Salmonella*. Por su parte Samot y Badet¹³², menciona que *L. gasseri* fue capaz de inhibir a cepas cariogénicas como *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y una cepa periodontopatogénicas como *Fusobacterium nucleatum*.

De igual forma, *Lc. lactis* demostró tener acción inhibitoria sobre *Y. pseudotuberculosis* la cual podría explicarse por la producción antimicrobianos. Según Lindgren y Dobrogosz citados por Khemariya *et al*¹³³, *Lc. lactis* es capaz de producir compuestos como ácido, peróxido de hidrógeno, y nisina los cuales se han sido identificado por contribuir en la actividad antimicrobiana de esta bacteria.

Khemariya *et al*¹³⁴ afirma que la nisina se ha descrito como un péptido extracelular con una extensa acción antibacteriana frente a bacterias gram positivas nocivas y bacterias patógenas. Según Tong *et al*¹³⁵ *Lc. lactis* tiene características dominantes en la competencia contra bacterias, debido a la producción de la bacteriocina nisina; Los mismos autores señalan que en estudios con *Lc. Lactis*, se encontraron resultados que demuestran la acción antagónica de *Lc lactis* frente a *Streptococcus mutans*, una de las principales bacterias cariogénicas

6.2.4 Ensayos de la acción inhibitoria del sobrenadante de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a *Yersinia Pseudotuberculosis*. Los resultados registrados en la tabla 6 muestran que se presentaron halos de 1, 2 ,3 y 5 mm para *L. gasseri*. Resultados similares, fueron registrados para el *Lc. Lactis* el cual presentó halos de 1, 2 y 3 mm (Tabla 7). Para ambas cepas, la mayoría de los halos tiene un valor de 2 mm y los métodos de

¹³⁰ Ibid., p.48

¹³¹ RUBIO, *et al*. Op. cit., p. 308

¹³² SAMOT, J.; BADET, C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. En: Anaerobe, 1(Dec., 2012); vol. 19, p. 37

¹³³ LINDGREN, S and DOBROGOSZ, W. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations citados por KHEMARIYA, Priti; SINGH, Sudhir; NATH, Gopal and GULATI, Anil. Diversity Analysis, Batch Fermentation and Characterization of Nisin in Identified Strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. En: Food Biotechnology. 2014. no. 28. p. 143

¹³⁴ Ibid., p. 144

¹³⁵ TONG, Zhongchun; ZHOU, Lin; LI, Jie; KUANG, Rong; LIN, Yuan y NI, Longxing. An in vitro investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. En: Archives of oral biology, October, 2011. Vol. 57, no 4, p. 377

difusión en disco y difusión en cilindro plástico fueron los que arrojaron mejores resultados.

Tabla 6. Concentraciones (μ l) y halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante de *Lactobacillus gasseri* frente a *Yersinia Pseudotuberculosis*

Método	Condición	Concentración (μ l) y medida del halo (mm)			
		50 μ l	75 μ l	100 μ l	150 μ l
Discos Método modificado	Filtrado pH 6	2 mm	2 mm	3 mm	2 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	5 mm	3 mm
Difusión en cilindro plástico	Filtrado pH 6	2 mm	2 mm	2 mm	1 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	2 mm	1 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	2 mm	1 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	1 mm
Difusión en Pozos de doble capa con cilindro	Filtrado pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
Difusión en Pozos de doble capa modificado	Filtrado pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm

Tabla 7. Concentraciones (μ l) y halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a *Yersinia Pseudotuberculosis*

Método	Condición	Concentración (μ l) y medida del halo (mm)			
		50 μ l	75 μ l	100 μ l	150 μ l
Discos Método modificado	Filtrado pH 6	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	3 mm	3 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
Difusión en cilindro plástico	Filtrado pH 6	2 mm	1 mm	2 mm	2 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	2 mm	1 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
Difusión en Pozos de doble capa con cilindro	Filtrado pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
Difusión en Pozos de doble capa modificado	Filtrado pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm

La acción de inhibición del sobrenadante puede explicarse por la presencia compuesto antimicrobianos, aunque en este caso, no es posible afirmar cual tuvo mayor incidencia en la inhibición de la bacteria patógena. Según Leveau y Bouix citados por Peñaflo¹³⁶ las sustancias antimicrobianas que pueden encontrarse son etanol, CO₂, diacetilo, H₂O₂, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas.

Con respecto a las bacteriocinas, Zárate¹³⁷, las define como péptidos activos con actividad antimicrobiana frente a otras bacterias, de las cuales existen numerosas bacteriocinas producidas por BAL y cada una puede presentar un espectro de inhibición particular. El mismo autor señala que la producción de bacteriocinas es un rasgo ventajoso, ya que permite adquirir una posición dominante en un determinado nicho, al eliminar a otras bacterias competidoras.

Con respecto a la presencia y detección de bacteriocinas de la cepa *L. gasseri K7* en un medio de cultivo MRS; Mavric *et al*¹³⁸, afirman que fueron detectadas en el sobrenadante luego de 4 horas de incubación, cuando el cultivo estaba en la fase de crecimiento exponencial, y su concentración alcanzó su máximo después de 8 horas de incubación. Por lo anterior es posible inferir que en el sobrenadante utilizado en esta investigación, posiblemente se produjeron bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos las cuales manifestaron su actividad mediante la inhibición de *Y. Pseudotuberculosis*.

Con respecto a la cantidad de sobrenadante utilizado, no se encontraron diferencias marcadas entre los tamaños de los halos. De la misma forma Calpa y Chaspuengal¹³⁹, en estudios similares, señala que las cantidades empleadas son independientes del efecto inhibitorio ejercido. Los resultados encontrados en este estudio permiten inferir que en el sobrenadante se produjeron bacteriocinas, por la formación de halos de inhibición ya que según menciona Cleveland y cols citados por Delgado¹⁴⁰ las bacteriocinas constituyen un mecanismo de competencia al ayudar a la bacteria productora a imponerse en un determinado hábitat.

Un aspecto fundamental en cuanto a la producción de bacteriocinas es la composición del medio de crecimiento. Según Farinha *et al*¹⁴¹, el medio afecta significativamente la producción de bacteriocinas, lo cual fue demostrado por

¹³⁶ LEVEAU, J and BOUIX, M. Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial. Citados por PEÑAFLO y GARCÍA. Op. Cit., p. 27

¹³⁷ ZARATE SARAPURA, Edgar. MODELAMIENTO DEL EFECTO DEL CLORURO DE SODIO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE NISINA DE *Lactococcus lactis*. Febrero 2011. p.12

¹³⁸ MAVRIČ, Anja; TOMPA, Gorazd; TRMČIĆ, A; ROGELJ, Irena and MATIJAŠIĆ, B. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri K7*—Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of an active component. En: Process Biochemistry 20 (May., 2014); vol. 49, no 8, p. 1253

¹³⁹ CALPA Y CHASPUENGAL. Op. cit., p.60

¹⁴⁰ DELGADO, Op. cit., p. 113

¹⁴¹ FARINHA, Luiz; SABO, Sabrina; PORTO, Maria; SOUZA, Ellen; OLIVEIRA, Maricê y OLIVEIRA, Ricardo. Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*. En: Chemical Engineering, 2015, vol. 43. p. 316

Mavric¹⁴² al incrementar la producción de bacteriocinas, cultivando *L. gasseri* K7 en un medio MRS modificado. Por su parte Gomes *et al* citados Farinha¹⁴³ *et al*, observaron una disminución de bacteriocinas en aproximadamente un 50% y 62% cuando se adicione inulina y oligofruktosa al medio MRS.

6.3 SUSCEPTIBILIDAD EN DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

6.3.1 Viabilidad de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a 38°C y 45°C. En la tabla 8 se observa que *L. gasseri* reportó valores de crecimiento comprendidos entre 4.9×10^8 y 3×10^{13} UFC/150 μ L a una temperatura de 38°C y valores entre 4.3×10^8 y 3×10^{13} UFC/150 μ L a temperatura de 45°C. Por su parte *Lc. lactis* obtuvo conteos comprendidos entre 3.6×10^8 y 3×10^{13} UFC/150 μ L a una temperatura de 38°C y valores entre 2.36×10^8 y 3×10^{12} UFC/150 μ L a temperatura de 45°C respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Viabilidad de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en medio MRS a temperaturas de 38°C y 45°C (UFC/150 μ L)

FACTOR DE DILUCIÓN	<i>L. gasseri</i> UFC/150 μ L		<i>Lc. lactis</i> UFC/150 μ L	
	38 °C	45 °C	38 °C	45 °C
10^6	4.9×10^8	4.3×10^8	3.6×10^8	2.36×10^8
10^7	3×10^9	3×10^9	3×10^9	3×10^9
10^8	3×10^{10}	2.4×10^{10}	3×10^{10}	2.44×10^{10}
10^9	3×10^{11}	2×10^{11}	1.83×10^{11}	3×10^{11}
10^{10}	4.7×10^{11}	3×10^{11}	3×10^{12}	3×10^{11}
10^{11}	3×10^{12}	3×10^{12}	3×10^{12}	3×10^{12}
10^{12}	3×10^{13}	3×10^{13}	3×10^{13}	-

La temperatura de crecimiento de las BAL han sido descrita por diferentes autores; Fernández y del Castillo¹⁴⁴, afirmar que una de las características de los lactobacilos es que son mesófilos, por lo cual crecen en temperaturas entre 20 - 40°C, Olivera¹⁴⁵, menciona que las BAL pueden ser mesófilos o termófilos. Ramírez¹⁴⁶, asegura que las BAL son mesófilas, aunque algunas pueden crecer a

¹⁴² MAVRIČ *et al*, Op. cit., p. 59

¹⁴³ FARINHA *et al*, Op. cit., p. 59

¹⁴⁴ SAMANIEGO FERNÁNDEZ, Luz María; DEL CASTILLO, *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. p. 3-8.

¹⁴⁵ OLIVERA. Op. Cit., 12 p.

¹⁴⁶ RAMÍREZ CUENCA, María. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis Licenciado en Química de Alimentos. Hidalgo-México:

temperaturas bajas como 5°C y otras a temperaturas a 45°C, y en muchos casos su temperatura óptima se encuentra entre 25°C y 35°C. Ahmed *et al*, declaran que Las bacterias mesófilas crecen rápidamente y desarrollan altas poblaciones en cuestión de horas a una temperatura entre 20-30°C. De acuerdo con lo mencionado, las BAL estudiadas, concuerdan dentro de los rangos anteriormente mencionados.

Batt citado por Ahmed *et al*¹⁴⁷, afirma que la temperatura óptima de crecimiento para los miembros del género *Lactococcus* se encuentra cercana a los 30 ° C y pueden crecer a temperaturas tan bajas como 10°C. Para el caso de los lactobacilos Ahmed *et al*¹⁴⁸ menciona que la temperatura óptima se encuentra entre 30 y 40°C, pero puede proliferar en un mínimo de 5°C hasta un límite superior de 53°C, dependiendo de la especie.

Ahmed *et al*¹⁴⁹, manifiestan que las BAL tienen una temperatura de crecimiento óptimo único y es una de las características básicas de las BAL, que permite diferenciarlas, debido a que interviene en el crecimiento y afecta el tiempo de generación de acuerdo con la fase de crecimiento y especie. De la misma forma Guerra *et al* citado por Caballero¹⁵⁰, reitera que existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y las diferencias que se pueden encontrar dependen de las características propias del microorganismo utilizado. Tal es el caso de *L. gasseri*, ya que a 38°C y 45°C presentó crecimientos adecuados, siendo mejor el crecimiento a 38°C. Los valores máximos que presentó *L. gasseri* fueron de 3×10^{13} UFC/150 µL en las dos temperaturas estudiadas, por su parte, Gregor *et al*¹⁵¹, reportó crecimientos de 10^8 UFC/ml a 37 ° C para *L. gasseri* en la leche, suero de leche y suero de queso. Por lo anterior es posible inferir que el *L. gasseri* tiene un mejor crecimiento a 38°C y 45°C, además estas diferencias pueden indicar que posiblemente la temperatura óptima de crecimiento de *L. gasseri*, se encuentra cercana a 38°C.

De igual forma *Lc. lactis*, manifestó resultados similares, en donde se aprecia un mejor crecimiento a 38°C con 3×10^{13} UFC/150 µL a diferencia de 45°C con

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de investigaciones químicas, 2005. p. 4

¹⁴⁷ BATT, C. Lactooccus. Citado por AHMED, Toqeer; KANWAL, Rashida and AYUB, Najma. Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*. En: Biotechnology, 2006, vol. 5, no 4, p. 481

¹⁴⁸ Ibid., p. 481

¹⁴⁹ Ibid., p. 484

¹⁵⁰ GUERRA N., RUA M y PASTRANA L. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. Citado por CABALLERO CERVANTES, Yesenia. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de: maestra en ciencias. México: colegio de postgraduados, Institución de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus montecillo 2014. p. 15.

¹⁵¹ GREGORET, V; PEREZLINDO, M; VINDEROLA, G; REINHEIMER, J and BINETTI, A. (2013). A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. En: Food microbiology, 27 (Nov.,2012); Vol 34. p. 22

3×10^{12} UFC/150 μ L. Por su parte Ahmed *et al*¹⁵², encontró resultados similares para 4 cepas de *Lc. lactis*, por tanto 3 de ellas reportaron mejores crecimientos a 37°C y una a 40°C. Estas diferencias pueden indicar que posiblemente la temperatura óptima de crecimiento de *Lc. lactis* se encuentra cercana a 38°C de la misma forma que sucedió con *L. gasseri*.

Los resultados encontrados en este estudio indican que la temperatura y el período de incubación, son factores importantes que modulan el crecimiento de las BAL, según Dalie *et al*¹⁵³, estas características pueden llegar a afectar considerablemente las cantidades producidas de metabolitos antimicrobianos. De igual forma Sadiq *et al*¹⁵⁴, manifiesta que la temperatura está estrechamente relacionada con el antagonismo contra los aislados bacterianos

6.4 VIABILIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE pH

En el tabla 9 se observa los valores de UFC reportados para *L. gasseri* en los diferentes pH evaluados, en el cual se encontró valores entre $1,4 \times 10^7$ y 3×10^{11} UFC en el pH de 6; entre $1,12 \times 10^8$ y 3×10^{11} UFC a pH 4,5 y entre 3×10^7 y $3,5 \times 10^{11}$ UFC a pH 3,5. Por su parte *Lc. lactis* reportó valores entre $2,44 \times 10^8$ y $1,32 \times 10^{12}$ UFC a pH 6; entre 3×10^{12} y 1×10^8 UFC a pH 4,5 y entre $5,3 \times 10^{11}$ y 3×10^7 UFC a pH 3,5 (Tabla 10).

Tabla 9. Viabilidad de los diferentes tiempos a pH 6, 4.5, 3.5 y 2,5 de *Lactobacillus gasseri*

pH	Minutos	No. DE COLONIAS POR DILUCIÓN (UFC/mL)				
		10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
6	0	$1,4 \times 10^7$	$2,40 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	-
	20	-	$3,12 \times 10^8$	$1,00 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{11}$
	40	$1,4 \times 10^7$	$3,04 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{11}$
	60	$2,6 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	3×10^{11}
	80	$1,72 \times 10^8$	$4,1 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	$6,3 \times 10^{11}$
	100	$2,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$	$1,00 \times 10^9$	$1,30 \times 10^{10}$	3×10^{11}
	120	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$	$1,00 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{11}$
	140	$2,0 \times 10^7$	$2,96 \times 10^9$	$5,00 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{11}$
	160	$3,5 \times 10^8$	-	2×10^9	$3,0 \times 10^{10}$	-
	180	$3,0 \times 10^9$	-	$3,30 \times 10^9$	-	-

¹⁵² AHMED *et al*, Op. cit., p. 485

¹⁵³ DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M. y RICHARD-FORGET, F. Lacticacid bacteria- Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *En: Food Control*. Abril, 2010, vol. 21, no. 4. p.372.

¹⁵⁴ SADIQ *et al*. Op. cit., p. 206

Continuación de tabla 9.

4,5	0	-	$2,00 \times 10^9$	$9,2 \times 10^9$	$5,5 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{11}$
	20	$1,12 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	-	$3,0 \times 10^{11}$
	40	$4,9 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$3,00 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^{11}$
	60	$4,8 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$8,0 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{10}$	3×10^{11}
	80	$4,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$2,00 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^{11}$
	100	$1,68 \times 10^7$	$8,8 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	-	3×10^{11}
	120	$2,80 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{11}$
	140	$1,48 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	-	$3,1 \times 10^{11}$
	160	$2,16 \times 10^9$	$5,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	-
180	3×10^8	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^{10}$	-	
3,5	0	$3,0 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	3×10^{11}
	20	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{11}$
	40	$1,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	1×10^{10}	3×10^{11}
	60	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	2×10^{10}	$6,3 \times 10^{11}$
	80	-	-	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	3×10^{11}
	100	-	-	-	$3,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{11}$
	120	-	-	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{11}$
	140	-	-	$3,1 \times 10^9$	-	-
	160	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-	

Tabla 10. Viabilidad de los diferentes tiempos a pH 6, 4.5, 3.5 y 2.5 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

pH	Minutos	No. DE COLONIAS POR DILUCIÓN (UFC/mL)				
		10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
6	0	$5,64 \times 10^8$	$5,08 \times 10^9$	$4,04 \times 10^{10}$	$3,94 \times 10^{11}$	$3,66 \times 10^{12}$
	20	$3,22 \times 10^8$	$4,52 \times 10^9$	$3,89 \times 10^{10}$	$3,45 \times 10^{11}$	$3,43 \times 10^{12}$
	40	$2,88 \times 10^8$	$3,18 \times 10^9$	$3,25 \times 10^{10}$	$3,11 \times 10^{11}$	$2,75 \times 10^{12}$
	60	$4,88 \times 10^8$	$3,56 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$1,74 \times 10^{11}$	$4,7 \times 10^{11}$
	80	$3,91 \times 10^8$	$2,97 \times 10^9$	$1,55 \times 10^{10}$	$2,05 \times 10^{11}$	3×10^{11}
	100	$2,44 \times 10^8$	$1,24 \times 10^9$	$1,10 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^{11}$
	120	$3,33 \times 10^8$	$1,35 \times 10^9$	$2,09 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^{11}$
	140	$3,04 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$1,86 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$	$1,32 \times 10^{12}$
	160	$3,45 \times 10^8$	$1,08 \times 10^9$	$2,00 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	3×10^{11}
180	$4,28 \times 10^8$	$2,96 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	3×10^{11}	
4,5	0	$3,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{11}$	3×10^{12}
	20	$2,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{11}$	3×10^{12}
	40	$3,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{11}$	3×10^{12}
	60	$3,00 \times 10^8$	$2,00 \times 10^9$	$2,00 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{11}$	3×10^{12}
	80	$3,00 \times 10^8$	$3,20 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	$3,00 \times 10^{11}$	3×10^{12}
	100	$3,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^9$	$1,00 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{11}$	3×10^{11}

120	3,00 x 10 ⁸	3,50x 10 ⁹	4,0 x 10 ⁹	-	-
140	1,00 x 10 ⁸	1,00x 10 ⁹	9,0 x 10 ⁹	-	-
160	2,50 x 10 ⁸	1,00x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	3,0 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹
180	3,10 x 10 ⁸	5,00x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	-	-

Continuación de tabla 10.

	0	3,36 x 10 ⁸	1,28x 10 ⁹	1,20 x 10 ¹⁰	9,0 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹
	20	3,0 x 10 ⁷	8,0 x 10 ⁸	1,03 x 10 ¹⁰	1,15 x 10 ¹¹	5,3 x 10 ¹¹
	40	3,0 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁹	3,0 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹
	60	-	2,0 x 10 ⁸	-	3,0 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹
3,5	80	-	3,0 x 10 ⁸	-	3,0 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹¹
	100	-	6,0 x 10 ⁸	-	-	-
	120	-	-	-	-	.
	140	-	-	-	-	.
	160	-	-	-	-	.
	180	-	-	-	-	.

Los valores de UFC reportados para *L. gasseri* en los diferentes pH evaluados, se encontró que las mejores viabilidades se presentaron en los pH 4.5 y 6. Para el caso del pH 3.5, se observó un menor conteo de UFC con respecto de los pH 4.5 y 6; por otra parte el pH 2.5 no presentó valores de UFC aceptables para considerarse como viable.

Según los resultados de UFC encontrados por *Lc. lactis*, se presentó viabilidad a los pH 4.5 y 6. Sin embargo, presentó mayores conteos que *L. gasseri* en todas las diluciones; en cuanto al pH 3.5 no hubo conteos viables en los minutos 120 - 180. Finalmente en el pH 2,5 no se presentaron conteos viables.

Slonczewski *et al*, aseguran que “un mecanismo clave para la homeostasis del pH ácido es el transporte de protones fuera del citoplasma por bombas de protones primarios”¹⁵⁵.

Gregoret ¹⁵⁶, en su estudio concluye que para *L. gasseri* la pérdida de viabilidad en la leche no acidificada fue de 1,85 y 1,53 (Log UFC/mL) en el tiempo cero y después de 30 días de almacenamiento, respectivamente. Cuando las células fueron suspendidas en la leche acidificada, fueron menos afectadas por la simulación de la digestión gástrica, reduciendo su viabilidad en 0,64 y 1 (Log UFC/mL), en los tiempos mencionados anteriormente. En este caso, *L. gasseri* resistió una digestión intestinal simulada, que redujo su viabilidad celular en 0,34 y 0,65 (Log UFC/mL), en el tratamiento donde la leche, no se acidifica y en donde

¹⁵⁵ SLONCZEWSKI, J. L., FUJISAWA, M., DOPSON, M., & KRULWICH, T. A. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Advances in microbial physiology*, 2009, vol. 55, p. 5

¹⁵⁶ GREGORET, V., PEREZLINDO, M. J., VINDEROLA, G., REINHEIMER, J., & BINETTI, A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food microbiology*, 2013, Vol. 34, no 1, p. 23.

se acidifica correspondientemente. De acuerdo a esto y basado en nuestros resultados se puede inferir que *L. gasseri* puede resistir a la digestión gástrica soportando pH bajos. De la misma forma *Lc. lactis* manifiesta gran potencial para soportar estas simulaciones las cuales son importante para considerarse a las bacterias estudiadas como probióticos.

Kim *et al*¹⁵⁷, obtuvieron resultados en donde una cepa de *Lc. lactis*, presentó un aumento viable en el número de células después de 3 horas de incubación a pH 7,0 y 4,0, sin embargo, hubo una disminución significativa en células viables a pH 3,5, 3,0 y 2,5; finalmente todas las células murieron a pH 2,0 y 1,5. Por lo anterior, El pH 4,5 fue elegido como el pH subletal, ya que, a este pH, las células todavía crecen lentamente, y se designó como letal el pH de 2,5, ya que el número de células viables se redujo significativamente. Resultados similares encontrados en este estudio demuestran que hay una gran posibilidad para que la cepa *Lc. Lactis* sobreviva a mecanismos fisiológicos adversos en el tracto digestivo. De acuerdo a esta investigación y basado en lo anterior para *L. gasseri* y *Lc. lactis* el pH letal encontrado es 3,5 ya que existe una marcada tendencia a la disminución de colonias.

De acuerdo a lo anterior Prescott *et al*, citados por Alvarado y Diaz afirman que “la acidez producida por el estómago con pH de 2-3 constituye una de las principales barreras para muchos microorganismos que transitan el tracto gastrointestinal.”¹⁵⁸ Además Kandler y Weiss aseguran que “muchas especies de lactobacilos pueden hacer frente a esta barrera porque son microorganismos acidúricos; con pH óptimo de crecimiento en el rango 5,5-6,2; capaces de crecer a pH inferior a 5”¹⁵⁹.

Para que las cepas en estudio sean viables para el hospedero Corcoran *et al*, citados por León¹⁶⁰, afirman que la tolerancia a la acidez de las BAL es atribuida por la presencia de un gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático. Los microorganismos gram positivos utilizan un mecanismo conocido como F1-F0 ATPasa como protección en condiciones de acidez. La F1-F0 ATPasa es una subunidad enzimática múltiple, conteniendo una porción catalítica (F1), incorporando subunidades para la hidrólisis de ATP; y una porción integral de membrana (F0) que incluye subunidades que funcionan como canales de membrana para la translocación de protones. De lo cual se puede inferir que la regulación de gradientes entre el medio y la bacteria es adecuada para el

¹⁵⁷ KIM, Woojin S.; REN, Jun; DUNN, Noel W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, Vol. 171, no 1, p. 60.

¹⁵⁸ PRESCOTT L. HARLEY J and KLEIN D. Normal microbiota and nonspecific host resistance in Microbiology. Citados por ALVARADO RIVAS, Carmen Cecilia; DÍAZ RIVERO, Cándida Gloria. Estudio preliminar del potencial probiótico lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 2009, Vol. 51, no 1, p. 10.

¹⁵⁹ KANDLER O, WEISS N. Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Citados por *Ibíd.*, p. 10.

¹⁶⁰ CORCORAN, B.M; STANTON, C; FITZGERALD, G.F; ROSS, R.P... Survival of Probiotic Lactobacilli in Acid Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. Citado por LEÓN. *Op. cit.*, p. 24.

mantenimiento ya que las propiedades del medio interno de *L. gasseri* y *Lc. lactis* ayudan a la sobrevivencia en pH bajos como los que se sometieron en esta prueba.

6.5 SUSCEPTIBILIDAD EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALES BILIARES Y BILIS BOVINA.

6.5.1 Viabilidad de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina. En el ensayo de viabilidad frente a diferentes concentraciones de sales biliares para *L. gasseri* se obtuvieron valores entre $4,6 \times 10^{10}$ - 3×10^{11} a una concentración de 3%, 3×10^8 - $7,2 \times 10^9$ al 4% y 3×10^8 - $3,7 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L al 5% de sales biliares (Tabla 11). Por su parte *Lc. Lactis* reportó valores entre $7,8 \times 10^9$ - 3×10^{11} a una concentración de 3%, $5,6 \times 10^9$ - $5,4 \times 10^{10}$ al 4% y $4,4 \times 10^9$ - $3,9 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L al 5% de sales biliares (Tabla 12).

En cuanto a la viabilidad a diferentes concentraciones de bilis bovina se obtuvieron los resultados de $4,8 \times 10^{10}$, 8×10^9 y 3×10^9 UFC/150 μ L en las concentraciones de 0.5, 1 y 2% respectivamente para *L. gasseri* (Tabla 11). Por su parte *Lc. lactis* reportó valores de 8×10^{11} , 5×10^{12} y 3×10^{11} UFC/150 μ L en las concentraciones de 0.5, 1 y 2% respectivamente (Tabla 12).

Tabla 11. Viabilidad de *Lactobacillus gasseri* a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina

<i>Lactobacillus gasseri</i> (UFC/150 μ L)							
Concentración	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	10^{11}	10^{12}
SALES BILIARES							
3%	3×10^8	$2,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^{10}$	3×10^{11}	$1,7 \times 10^{12}$	$1,7 \times 10^{13}$
4%	3×10^8	3×10^8	$7,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	5×10^{10}	10×10^{12}	1×10^{12}
5%	$1,7 \times 10^8$	3×10^8	$1,5 \times 10^9$	$3,7 \times 10^{10}$	8×10^{10}	$1,5 \times 10^{12}$	2×10^{12}
BILIS BOVINA							
0,5%	3×10^8	$1,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$4,8 \times 10^{10}$	6×10^{10}	5×10^{11}	-
1%	$4,7 \times 10^8$	8×10^8	8×10^9	$1,6 \times 10^{10}$	1×10^{11}	$1,4 \times 10^{12}$	2×10^{12}
2%	3×10^8	3×10^9	3×10^9	4×10^9	3×10^{10}	3×10^{11}	3×10^{12}

Tabla 12. Viabilidad de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina.

<i>Lactococcus lactis</i> (UFC/150 μ L)							
Concentración	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	10^{11}	10^{12}
SALES BILIARES							
3%	$4,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$	$4,6 \times 10^{10}$	3×10^{11}	8×10^{11}	9×10^{12}
4%	$3,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$5,6 \times 10^9$	$5,4 \times 10^{10}$	2×10^{11}	5×10^{11}	2×10^{12}
5%	2×10^8	$6,5 \times 10^8$	$4,4 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{10}$	2×10^{10}	5×10^{11}	1×10^{12}

BILIS BOVINA							
0,5%	3x10 ⁸	2,6x10 ⁹	4,0x10 ⁹	4,5x10 ¹⁰	8x10 ¹¹	1,5x10 ¹²	2,0x10 ¹³
1%	3,1x10 ⁸	4,4x10 ⁸	5,7x10 ⁹	3x10 ¹⁰	5x10 ¹¹	5x10 ¹²	3,4x10 ¹³
2%	8,x10 ⁷	2,8x10 ⁸	3,5x10 ⁹	4x10 ¹⁰	3x10 ¹¹	1,0x10 ¹²	2x10 ¹³

De acuerdo a los resultados obtenidos, *L. gasseri* y *Lc. lactis* tiene la capacidad de resistir concentraciones del 3%, 4% y 5% de sales biliares y 0,5%, 1% y 2% de bilis bovina. Esta es característica importante de BAL ya que para ejercer su acción probiótica deben ser capaces de sobrepasar todas las condiciones fisiológicas del tracto digestivo.

Gibson y Fuller citados por Moreno¹⁶¹ mencionan que antes de llegar al tracto intestinal, las bacterias probióticas tiene que ser capaces resistir en primer lugar, a la acidez gástrica y posteriormente se enfrentaran a las sales biliares. Gómez *et al* citados por Caballero¹⁶², sostienen que las sales biliares representan una importante barrera antibacteriana que afecta el establecimiento de bacterias probióticas en el TGI, por lo cual la resistencia al contacto con sales biliares es un requisito para la selección de bacterias probióticas.

Los resultados encontrados en este ensayo, demostraron que las BAL estudiadas tienen una alta posibilidad de sobrevivir en las concentraciones mencionadas debido a que valores similares fueron reportados por Gregoret *et al*¹⁶³, quienes encontraron que *L. gasseri* mostró resultados positivos cuando fue sometido a concentraciones de 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3% de bilis bovina. Semma *et al*¹⁶⁴, afirman que *Lc. lactis* fue capaz de tolerar una concentración de 0,3% de bilis con un conteo de 1,59x 10¹⁰ UFC/ml. Al comparar los resultados obtenidos por los autores anteriormente mencionados con los obtenidos en esta investigación se encuentra que *L. gasseri* y *Lc. lactis* muestran una alta capacidad para crecer en condiciones altas de estrés causado por las sales biliares y bilis bovina, por lo cual posiblemente presentarían buenos resultados en una investigación *in vivo*.

Azcarate¹⁶⁵ menciona que la colonización del estómago y el intestino delgado proximal es limitada, debido a la presencia de ácido, bilis y secreciones pancreáticas, con un número de bacterias que van desde 10¹ hasta 10³ UFC/ml. Eventualmente la densidad bacteriana aumenta en el intestino delgado distal de 10⁴ a 10⁷ UFC/ml) y posteriormente alcanzar un máximo en el colon de 10¹¹ a 10¹²

¹⁶¹ GIBSON, G., FULLER, R. Aspects of In vitro and In vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human use. Symposium Citado por MORENO GALARZA, Lizeth Johanna, Aislamiento y Selección de Lactobacillus sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Posgrado Interfacultades de Microbiología. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.2012. p. 26

¹⁶² GÓMEZ ZAVAGLIA A., KOCIUBINSKI G., PÉREZ P., DE ANTONI G. 1998. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. Citados por CABALLERO Op. cit., p. 53.

¹⁶³ GREGORET *et al*. Op. Cit., p.23

¹⁶⁴ SEEMA Bhanwar; ARASHDEEP Singh and ABHIJIT Ganguli. Probiotic characterization of potential hydrolases producing Lactococcus lactis subsp. lactis isolated from pickled yam. En: Int J Food Sci Nutr. September, 2013. Vol. 65. p. 59

¹⁶⁵ AZCARATE *et al*. Op. Cit., p. 4610

UFC/ml. Con base en las densidades bacterianas mencionadas, es posible inferir que *L. gasseri* y *Lc. lactis* tendría un alto porcentaje de sobrevivencia y oportunidad de sobrepasar las concentraciones de sales biliares.

Gotcheva *et al* citado por Frizzo¹⁶⁶ comentan que luego del pasaje por las condiciones ácidas del estómago, los *Lactobacillus* incorporados a la dieta sufren estrés al contacto con la bilis en el intestino, y eventualmente se incrementa ya que el tiempo de residencia varían en cada parte del tracto gastrointestinal. Por tal motivo es importante que las cepas utilizadas como probióticos lleguen en altas densidades a las diferentes secciones del TGI, para garantizar que las pérdidas generadas por estrés de la acidez gástrica y sales biliares no sean mayores a las que efectivamente sobrepasan estas secciones y que eventualmente puedan manifiesten sus efectos probióticos. Por lo anterior es posible afirmar que las cepas estudiadas tiene una alta posibilidad de sobrepasar las secciones del TGI aun cuando se presenten pérdidas, ya que a las mayores conteos en las mayores concentraciones de sales biliares y bilis fueron de $3,7 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L y 3×10^9 UFC/150 μ L para *L. gasseri* y de $3,9 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L y 3×10^{11} UFC/150 μ L para *Lc. lactis*.

6.6 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

Los resultados registrados para *L. gasseri* en la cinética de fermentación, permiten concluir que la fase exponencial en los medios MRS y PRO se alcanzó en los tiempos 6 (20:00 horas) y 5 (16:00 horas) respectivamente. Por su parte *Lc. Lactis*, presentó su fase exponencial en el tiempo 4 (12:00 horas) en los dos medios evaluados.

En las figuras 7 y 8 se observa la comparación entre el crecimiento de *L. gasseri* en los medios MRS y PRO, al igual que el crecimiento de *Lc. lactis*.

¹⁶⁶ GOTCHEVA, V; HRISTOZOVA, E; HRISTOZOVA, T; GUO, M.; ROSHKOVA, Z. & ANGELOV, A. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. Citados por FRIZZO, L. S., SOTO, L. P., BERTOZZI, E., SEQUEIRA, G., MARTI, L. E., & ROSMINI, M. R. Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. FAVE Sección Ciencias Veterinarias, 2006, vol. 5, no 1/2, p. 71

Figura 7. Crecimiento (UFC/150 μ L) de *Lactobacillus gasseri* en los medios MRS Y PRO

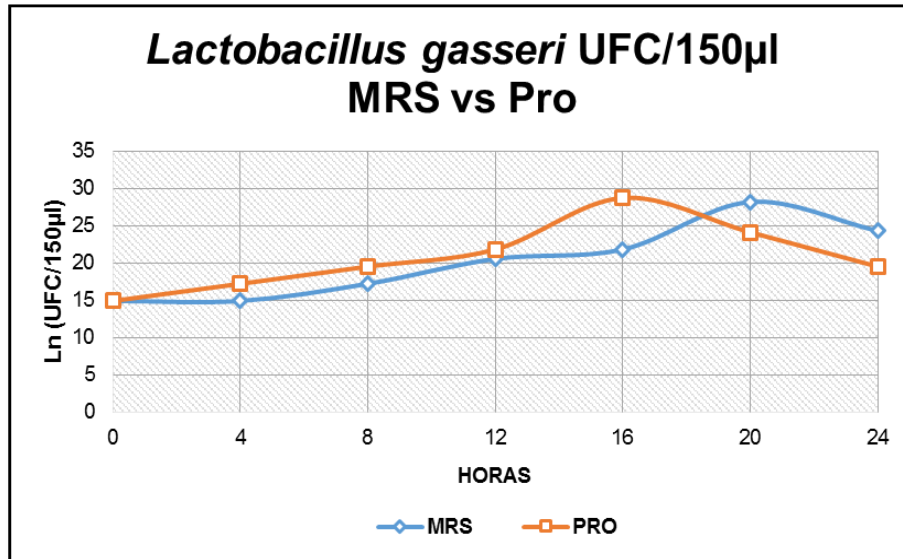
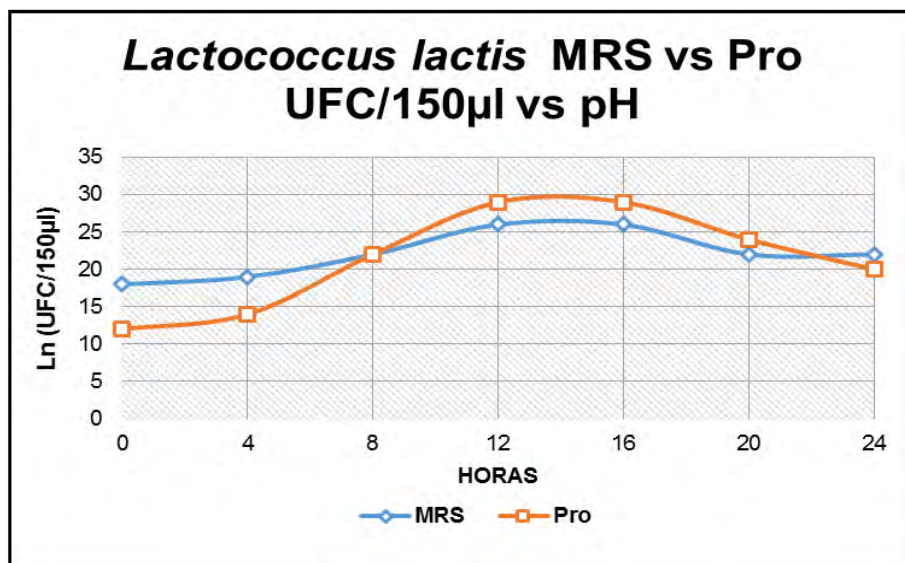


Figura 8. UFC/150 μ L. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Cinética de crecimiento en los medio MRS y PRO



La figura 7 muestra que el crecimiento de *L. gasseri* en el medio PRO fue mayor en todos los tiempos de la cinética de fermentación en comparación con el medio MRS, también se observa que la fase exponencial se presentó en un menor

tiempo y con un mayor número de UFC. En cuanto al crecimiento de *Lc lactis*, se observa una tendencia similar a la de *L. gasseri*, por cuanto existen mayores valores de UFC en todos los tiempos del medio PRO; aunque las fases exponenciales se presentaron en el mismo tiempo en los dos medios.

Las diferencias que se pueden observar en cuanto al crecimiento de las BAL utilizadas en los dos medios de cultivo, pueden estar relacionadas con los diferentes contenidos nutricionales de cada medio (Tablas 13 y 14). Según Orozco y Solarte¹⁶⁷, durante la fermentación, las BAL deben cumplir con sus requerimientos de carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas obteniéndolas ya sea, del medio de crecimiento o de su interacción con otros microorganismos presentes en el mismo medio de fermentación. Lo que antecede permite deducir que el medio PRO fue más eficiente que el medio MRS al aportar los requerimientos para las cepas *L. gasseri* y *Lc lactis*. En las tablas 13 y 14, se muestra la composición teórica aproximada de los medios MRS y PRO en donde se aprecia que los aportes nutricionales son mayores en el medio PRO y en el caso de las vitaminas C y B6 solo están presente en este medio.

Paralelamente, Orozco y Solarte¹⁶⁸, afirma que cuando las células se siembran en un medio el cual contiene diversas fuentes de carbono, es común hallar diferentes fases de latencia; esta característica es conocida como crecimiento diauxico, el cual consiste en el uso preferible de una fuente de carbono antes de consumir la segunda. Con base en lo anterior, el medio PRO es probablemente el sustrato en donde podrían encontrarse diferentes fases de latencia, a causa de las diferentes materias primas que lo componen.

Con respecto a las diferentes fases de crecimiento en la cinética de fermentación, Reyes¹⁶⁹, argumenta se pueden distinguir 4 secciones diferentes:

- Fase de adaptación: inicia seguidamente de la inoculación, y su actividad microbiológica se detiene eventualmente por la adaptación del microorganismo al medio.
- Fase logarítmica: las células exponen la máxima actividad de crecimiento, y perduran en tanto que las condiciones óptimas permanezcan disponibles.
- Fase estacionaria: la población bacteriana permanece constante y la acumulación de metabólicos de desecho como el ácido láctico inicia.
- Fase de muerte: finalmente el número de células disminuye por la ausencia de condiciones para su crecimiento.

¹⁶⁷Orozco Murillo, M. P., & Solarte, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales. 2003. P. 10

¹⁶⁸ Ibíd., p. 45

¹⁶⁹ REYES ESTÉVEZ, Ricardo. Caracterización de la cinética de crecimiento de microorganismos lácticos a través de ultrasonidos y su transformada wavelet. Tesis de Maestría en Ciencias. Oaxaca: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Oaxaca, 2011. p.10

De los resultados descritos anteriormente, se infiere que *L. gasseri*, se adaptó a los medio MRS y PRO y posteriormente incremento su crecimiento hasta alcanzar su fase logarítmica en los tiempos 6 y 5, después de estos tiempos las condiciones de los medios, disminuyeron proporcionalmente y su crecimiento llegar a un declive. Para el caso de *Lc. lactis* se encontró que la fase logarítmica ocurrió en el tiempo 4, y de forma similar, pasado este tiempo las condiciones de los medios MRS y PRO, disminuyeron proporcionalmente. En las dos cepas de estudio se presentó una tendencia similar debido a que los medios no fueron renovados al tratarse de un cultivo discontinuo. Según Doelle¹⁷⁰, las condiciones ideales de un medio, no están presentes en un cultivo discontinuo. De la misma manera Orozco y Solarte¹⁷¹, reiteran que el final de la fase exponencial, algún nutriente esencial como la fuente de carbono o nitrógeno se agota; por otra parte también puede suceder que un metabolito tóxico se acumule a un nivel significativo que inhiba el crecimiento.

Tabla 13. Composición nutricional teórica del caldo MRS

Nutriente	Extracto de carne (8 g)	Extracto de levadura (4 g)	D-glucosa 20 g	Aportes totales
Agua %	3,0	1,64	-	4,66
Energía Kcal	16,6	7,40	75,8	99,84
Proteína g	3,1	0,96	-	4,09
Grasa Total g	0,1	0,04	-	0,18
Carbohidratos g	0,5	0,82	20	21,31
Fibra Diet. total g	0	0,26	-	0,26
Ceniza g	1,2	0	-	1,20
Calcio mg	6,5	2,68	-	9,16
Fósforo mg	58,9	4,16	-	63,04
Hierro mg	-	0,16	-	0,16
Potasio mg	-	84,00	-	84,00
Sodio mg	-	135,20	-	135,20
Zinc mg	-	0,17	-	0,17
Magnesio mg	-	7,20	-	7,20
Tiamina mg	-	0,93	-	0,93
Riboflavina mg	-	0,70	-	0,70
Niacina mg	1,9	5,10	-	6,97
Vit. C mg	-	-	-	0,00
Vit. B6 mg	-	-	-	0,00
Vit. B12 µg	-	0,02	-	0,02

¹⁷⁰ DOELLE, Horst Werner. Bacterial metabolism. Academic Press, Second Edition. Australia: St. Lucia, Brisbane, 2014. p. 67

¹⁷¹ OROZCO y SOLARTE Op. cit., p. 47

Tabla 14. Composición nutricional teórica del medio PRO

Nutriente	Leche de soya (15 g)	Leche en polvo (150 g)	Salvado de trigo (15 g)	Azúcar pulverizado (10 g)	Aportes totales
Agua %	13,21	7,35	1,48	0,13	22,18
Energía Kcal	8,10	531,00	32,40	38,00	609,50
Proteína g	0,49	53,25	2,33	0,01	56,09
Grasa Total g	0,26	0,30	0,64	-	1,20
Carbohidratos g	0,94	77,70	9,68	9,81	98,13
Fibra Diet. total g	0,09	-	6,42	-	6,51
Ceniza g	-	11,40	0,00	-	11,40
Calcio mg	3,75	420,00	10,95	8,30	443,00
Fósforo mg	7,80	1516,50	151,95	0,40	1676,65
Hierro mg	0,10	0,48	1,59	0,07	2,23
Potasio mg	17,70	1020,00	177,30	13,30	1228,30
Sodio mg	7,65	3420,00	0,30	2,80	3430,75
Zinc mg	0,02	6,05	1,09	--	7,16
Magnesio mg	3,75	90,00	91,65	0,90	186,30
Tiamina mg	0,01	0,24	0,08	-	0,33
Riboflavina mg	0,01	2463,00	0,09	-	2463,10
Niacina mg	0,08	1,00	2,04	0,01	3,12
Vit. C mg	-	10,05	-	-	10,05
Vit. B6 mg	0,01	0,45	0,20	-	0,66
Vit. B12 µg	-	5,97	-	-	5,97

6.6.1 Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/150 µL). La fase exponencial de *L. gasseri* se obtuvo en el tiempo 6 y 5, con valores de 1.75×10^{12} y 3×10^{12} UFC/150 µL en los medios MRS y PRO respectivamente (tabla 15). En el caso de *Lc. lactis*, la fase exponencial llegó en el tiempo 4 en los dos medios, con valores de 6.4×10^{12} y 3×10^{11} UFC/150 µL (tabla 15).

El efecto del medio de cultivo sobre el conteo de microorganismos en placa para *L. gasseri*, expresado en UFC/150 µL, presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) a los tiempos 2, 6 y 7, con mayores conteos en el medio PRO (tabla 16). Por su parte, *Lc. lactis* tuvo diferencias significativas en los tiempos 1, 2 y 3, donde el medio PRO también obtuvo el mayor crecimiento (tabla 17).

Tabla 15. Fase exponencial de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO

<i>Lactobacillus gasseri</i>		
	MRS	PRO
Tiempo (horas) fase exponencial	6 (20:00 horas)	5 (16:00 horas)
UFC/150 µL	1.75x10 ¹²	3x10 ¹²
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
	MRS	PRO
Tiempo (horas) fase exponencial	4 (12:00 horas)	4 (12:00 horas)
UFC/150 µL	6.4x10 ¹²	3x10 ¹¹

Tabla 16. Efecto del medio de cultivo sobre el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/150 µL) de *Lactobacillus gasseri*

<i>Lactobacillus gasseri</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	2,20 x 10 ⁹ a	2,50 x 10 ⁹ b	9,00 x 10 ⁷ a	2,50 x 10 ⁹ a	1,37 x 10 ¹¹ a	8,00 x 10 ¹² a	3,67 x 10 ¹¹ a
² PRO	2,83 x 10 ⁶ a	2,40 x 10 ⁷ a	2,23 x 10 ⁸ a	1,93 x 10 ⁹ a	1,00 x 10 ¹² a	2,23 x 10 ⁹ b	7,90 x 10 ⁸ b

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Tabla 17. Efecto del medio de cultivo sobre el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/150 µL) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	1,48 x 10 ⁷ a	5,91 x 10 ⁷ b	1,11 x 10 ⁹ b	1,10 x 10 ¹² a	1,77 x 10 ¹¹ a	2,85 x 10 ⁹ a	1,11 x 10 ¹⁰ a
² PRO	1,17 x 10 ⁵ b	1,20 x 10 ⁹ a	2,10 x 10 ¹¹ a	1,90 x 10 ¹² a	2,79 x 10 ¹² a	1,30 x 10 ⁹ a	1,11 x 10 ¹⁰ a

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ² PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Charles citado por Ramírez¹⁷², afirma que las BAL son muy exigentes en su requerimientos nutricionales, de modo que el medio debe aportar una mezcla compleja de vitaminas B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas y

¹⁷² CHARLES, A. Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera. Citado por RAMÍREZ CUENCA, Op. Cit., p. 4

fuentes de carbono. De acuerdo con lo anterior y con base en los conteos reportados para *L. gasseri* y *Lc. lactis*, se puede inferir que el medio PRO puede suplir una mayor cantidad de requerimientos nutricionales a diferencia del medio MRS (ver tablas 13 y 14), lo cual lo convierte en un buen promotor de crecimiento y proporcionó buenos resultados para el conteo de microorganismos en este estudio.

Gregoret *et al*¹⁷³, realizaron cinéticas de crecimiento con una cepa de *Lactobacillus gasseri* 37, en leche, suero de leche y suero queso, en donde se encontró que dicha cepa alcanza recuentos viables que van desde 3×10^8 a $4,5 \times 10^9$ UFC/ml en su fase exponencial. Por su parte, Mavrič *et al*¹⁷⁴, reportan valores de $2,0 \times 10^7$ UFC/ml, en la fase exponencial de *Lactobacillus gasseri* K7 en medio MRS. Al comparar estos conteos con los resultados encontrados en esta investigación para *L. gasseri*, quien reporta valores de $1,75 \times 10^{12}$ y 3×10^{12} en los medios MRS y PRO, se observa que el medio tiene una fuerte influencia, la cual se traduce en menores o mayores conteos de UFC según el medio utilizado.

Lc. lactis registro valores de $6,4 \times 10^{12}$ y 3×10^{11} UFC para los medios MRS y PRO, por su parte Sigala *et al*¹⁷⁵, reportó un valor de $1,78 \times 10^{10}$ UFC, para *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* en su fase exponencial, en donde se utilizó como medio de cultivo leche descremada al 11% de sólidos totales. Al igual que *L. gasseri*, se observa una diferencia en los valores reportados entre los diferentes medios de esta investigación y los de otros autores mencionados, por lo cual se puede deducir que, aunque la bacteriana tiene características diferentes en cuanto a su desarrollo; el medio de cultivo es determinante para crecimiento.

6.6.2 Determinación de pH. En el anexo M, tabla 53, se observa que el valor de pH reportado para *L. gasseri* en la fase exponencial de los medios MRS y PRO fue de 4,28 y 4,7 respectivamente. Por su parte *Lc. lactis* registró valores de 4,80 y 4,98 en los medios MRS y PRO (Anexo M, tabla 54). En las figuras 9 y 10, se observa la tendencia del pH en el tiempo completo de la cinética en las BAL estudiadas.

En las tablas 18 y 19 se observa el efecto de las UFC/150 μ L sobre el pH del medio de cultivo, donde *L. gasseri* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) a los tiempos 3, 6 y 7, destacándose un menor pH para el medio PRO (5.23) vs MRS (5.50) al tiempo 3, mientras que en el tiempo 6 y 7 el menor pH lo presentó el medio MRS (4.30 vs 4.65, 4.18 vs 4.65 respectivamente). Por otra

¹⁷³Gregoret *et al*, Op. cit., p. 20

¹⁷⁴Mavrič *et al*, Op. cit., p. 1253

¹⁷⁵ SIGALA, Juan Carlos; TAFOLLA, Martha Patricia y PÉREZ GAVILÁN, Jose Pablo. Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración. *En: BioTecnología*. 2007. Vol. 11 No. 2. p. 19

parte *Lc. lactis* fue diferente en los tiempos 1, 2, 3, 4 y 5 donde el medio PRO obtuvo el mayor pH.

Figura 9. *Lactobacillus gasseri*, comparación entre UFC/150 µL vs pH durante la cinética de los medios MRS y PRO

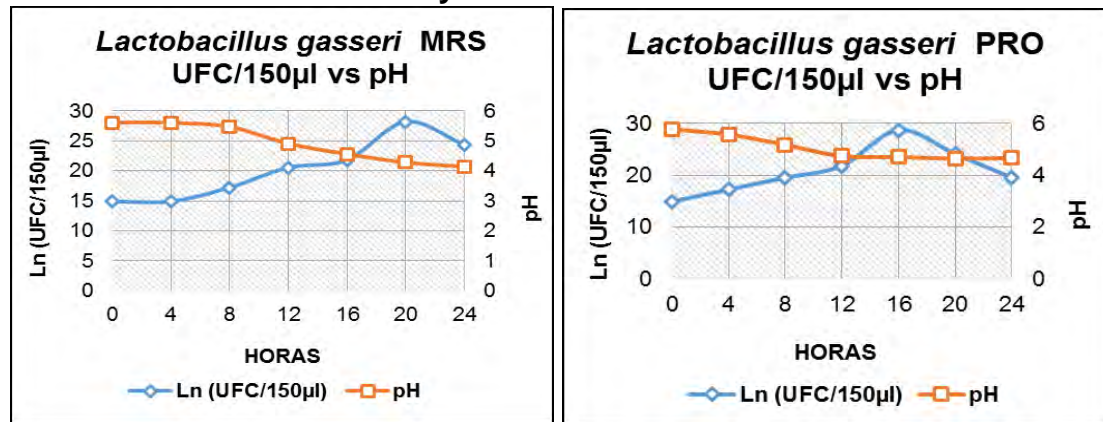


Figura 10. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, comparación entre UFC/150 µL vs pH durante la cinética de los medios MRS y PRO

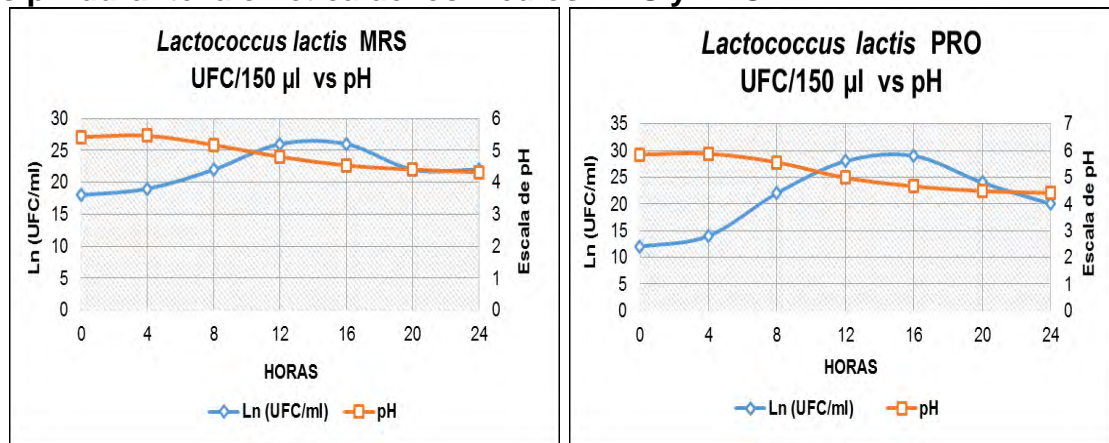


Tabla 18. Efecto de la biomasa (UFC/150 µL) sobre el pH del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri*

<i>Lactobacillus gasseri</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	5.58 a	5.63 a	5.50 a	4.92 a	4.56 a	4.30 b	4.18 b
² PRO	5.73 a	5.61 a	5.23 b	4.82 a	4.68 a	4.65 a	4.65 a

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Tabla 19. Efecto de la biomasa (UFC/150 µL) sobre el pH del medio de cultivo *Lactococcus lactis*.

<i>Lactococcus lactis</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	5.43 b	5.48 b	5.18 b	4.79 b	4.54 b	4.40 a	4.33 a
² PRO	5.85 a	5.88 a	5.60 a	5.02 a	4.70 a	4.49 a	4.41 a

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Ramírez *et al*¹⁷⁶, aseguran que el pH del ambiente se reduce por la acumulación de ácido láctico y otros ácidos producidos por BAL. De igual forma Doelle¹⁷⁷, menciona que a medida que avanza el crecimiento celular en la fase de crecimiento exponencial, los nutrientes son absorbidos y los productos finales se excretan, ocasionando que esta actividad metabólica cambie el pH y altere el entorno; finalmente el medio se vuelve incapaz de soportar más crecimiento. Con base en lo anterior, es posible inferir que el descenso en el pH para *L. gasseri* en el medio MRS, paso de 5,61 a 4,14, debido a la acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, de igual forma sucedió con el medio PRO el cual paso de 5,77 a 4,66. Para el caso de *Lc. lactis*, se encontraron valores iniciales y finales de 5,42 a 4,32 en el medio MRS y de 5,85 a 4,41 para el medio PRO.

Carr *et al* citados por Ramirez¹⁷⁸, afirman que las BAL son ácido tolerantes, pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2 y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían la actividad producida por los ácidos orgánicos. Por lo anterior se deduce que las BAL estudiadas son capaces de sobrevivir en el rango de pH anteriormente mencionados, ya que los valores encontrados en el último tiempo de la cinética de fermentación fueron de 4,14 para *L. gasseri* y 4,32 para *Lc. lactis*.

¹⁷⁶ RAMÍREZ *et al*. Op. Cit., p. 3

¹⁷⁷ DOELLE. Op. Cit., p. 67

¹⁷⁸ Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. The lactic acid bacteria citado por Ramírez Op cit. P. 1

Según Urrego y Cadavid citados por Vásquez *et al*¹⁷⁹, las BAL pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía. Paralelamente Dunne¹⁸⁰, asegura que las especies Gram-positivas tales como estreptococos y lactobacilos típicamente se aíslan de los contenidos del estómago debido a su tolerancia al ácido y su capacidad para asociarse con el epitelio secretor de la mucosa gástrica. Según lo mencionado, *L. gasseri* y *Lc. lactis* pueden sobrevivir al descenso en el pH mediante este sistema y además pueden permanecer viables en ambientes ácidos.

6.6.3 Determinación del porcentaje de ácido láctico. En la determinación de % de ácido láctico para *L. gasseri*, se presentaron valores iniciales y finales de 0,58 - 1,34 en el medio MRS y de 0,24 - 0,8 en el medio PRO respectivamente (Anexo M, tabla 55) (Figura 11). Por otra parte *Lc. Lactis* obtuvo resultados iniciales y finales de 0,39 y 0,97 en el medio MRS y de 0,17 – 0,71 en el medio PRO (Anexo M, tabla 56) (figura 12).

En las tablas 20 y 21 se observa el efecto de las UFC/150 µL sobre el % de ácido láctico del medio de cultivo, donde *L. gasseri* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en todos los tiempos destacándose el medio MRS con un mayor % de ácido (0.96) en comparación con el medio PRO (0,71) al tiempo 7, Por otra parte, *Lc. lactis* fue diferente en los tiempos 1, 2, 3, 4, 6 y 7 donde el medio MRS obtuvo mayor % de ácido láctico con valores máximos en el tiempo 7 (1,34) en comparación en el medio PRO (0.66).

Tabla 20. Efecto de las unidades formadoras de colonia (UFC/150µl) sobre el % de ácido láctico del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri*.

<i>Lactobacillus gasseri</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	0.39 a	0.49 a	0.55 a	0.71 a	0.78 a	0.87 a	0.96 a
² PRO	0.17 b	0.33 b	0.28 b	0.45 b	0.58 b	0.67 b	0.71 b

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Tabla 21. Efecto de la biomasa (UFC/150µl) sobre el % de ácido láctico

¹⁷⁹URREGO VELÁSQUEZ, M. C., CADAVID RO13. JAS, L. A. Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo) Citados por VÁSQUEZ, Sandra Milena; SUÁREZ, Héctor; ZAPATA, Sandra. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 2009, vol. 36, no 1, p. 1

¹⁸⁰DUNNE, Colum. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory bowel diseases*, 2001, vol. 7, no 2, p. 138

del medio de cultivo *Lactococcus lactis*.

<i>Lactococcus lactis</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	0.58 a	0.56 a	0.42 a	0.65 a	0.92 a	1.16 a	1.34 a
² PRO	0.24 b	0.25 b	0.64 b	0.55 b	0.87 a	0.70 b	0.66 b

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

¹ Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

Figura 11. % Ácido láctico de los medios MRS y PRO vs UFC/150µl de la cepa *Lactobacillus gasseri* durante la cinética de fermentación.

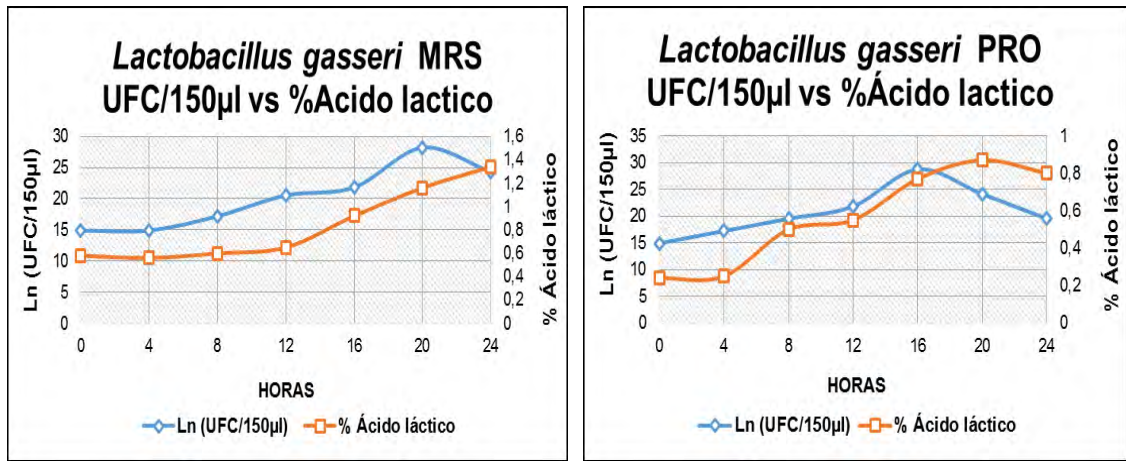
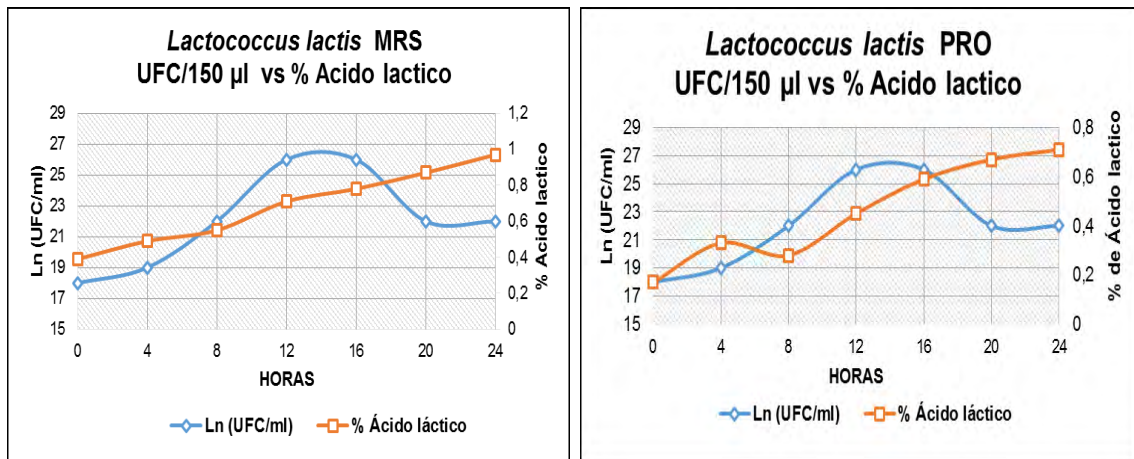


Figura 12. % Ácido láctico de los medios MRS y PRO vs UFC/150µl de la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* durante la cinética.



El porcentaje de ácido láctico encontrado en este estudio para *Lc lactis* en la fase exponencial fue de 0.71 y 0.45 en los medios MRS y PRO. Por su parte Ahmed et

*al*¹⁸¹, encontró porcentajes de ácido láctico de 0,58, 0,56 y 0,57% en la fase exponencial de varias cepas de *Lc. lactis* cultivadas en leche en polvo reconstituida sin grasa. Estas diferencias pueden explicarse por las diferencias entre las cepas estudiadas, la constitución de los diferentes medios de crecimiento y condiciones ambientales. Según Contreras *et al*¹⁸², las BAL pueden generar productos del metabolismo relativamente sencillos o de naturaleza peptídica, los cuales pueden estar en mayor o menor concentración dependiendo de la composición del medio de crecimiento, condiciones ambientales entre otros; entre los productos sencillos se tienen los ácidos orgánicos como el láctico y en menor cantidad el ácido acético, peróxido de hidrógeno y ácidos grasos volátiles.

Ramirez M¹⁸³, afirma que La fermentación de las BAL se caracteriza por la acumulación de ácidos orgánicos como el ácido láctico, propiónico y acético, y por la disminución de pH del ambiente de crecimiento, contribuyendo a la inhibición de microorganismos. Además el mismo autor infiere que la vía metabólica de Embden Meyerhof Parnas (EMP), es la que ocupan las bacterias homofermentativas para transformar la glucosa y producir dos moléculas de lactato por una molécula de glucosa. En este contexto, las BAL estudiadas cumplen con esta característica y podrían producir la inhibición *in vivo* de patógenos, ya que la producción de total de ácido láctico evaluado en la cinética de crecimiento fue de 1,34 y 0,8% y de 0,97 y 0,71% en los medios MRS y PRO para *L. gasseri* y *Lc. lactis*. En cuanto a la capacidad para producir ácido láctico que tiene *L. gasseri*, Hammes y Vogel citados por Selle y Klaenhammer¹⁸⁴ afirman que *L. gasseri* es un homofermentador obligado, el cual metaboliza la glucosa y produce un 85% de ácido láctico a través de la ruta de EMP.

Ahmed *et al*¹⁸⁵, mencionan que existe una relación inversa entre la acidez y el pH, por cuanto el porcentaje de acidez marco una tendencia creciente hasta llegar 0,56 a 0,58%, en tanto el pH disminuyó hasta llegar a valores 4.80 y 4.89. En este estudio se observó que existe la misma relación, ya que al comparar los resultados reportados por *L. gasseri* y *Lc. lactis* se observa, la misma tendencia.

6.6.4 Determinación de consumo de azúcares totales. En las figuras 13 y 14 se puede observar el consumo de azúcar de *L. gasseri* en todos los tiempos de la cinética de fermentación de los medios analizados. De igual forma las figuras 15 y 16 muestran la información respectiva para *Lc. lactis*.

¹⁸¹ AHMED, et al. Op. cit., p. 482

¹⁸² CONTRERAS PINZÓN, M; DOMÍNGUEZ ESPINOSA, R. & GONZÁLEZ-BURGOS, Araceli. Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera. Revista de Ciencia, Tecnología y Educación, 2007, vol. 22, p. 35.

¹⁸³ Ramírez Op cit. P. 5

¹⁸⁴ HAMMES, WP and VOGEL, RF. The genus *Lactobacillus*. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Citados por SELLE and KLAENHAMMER, Op. cit., p. 921

¹⁸⁵ AHMED *et al*. Op cit. p. 481

El consumo de azúcar de *L. gasseri* en los medios MRS y PRO presentó valores en la fase logarítmica de 1.79 mg/L y 2.043 mg/L respectivamente (Anexo M, tabla 57). De acuerdo a este estudio para *Lc. lactis* mostró valores de consumo de azúcares totales de 2,35 mg/L y 2,54 mg/L en la fase exponencial de la cinética de fermentación de los medio MRS y PRO (Anexo M, tabla 58).

Se relacionó el consumo de azúcares totales (Y) y el crecimiento de las BAL a través del tiempo durante el proceso de fermentación (X) mediante un análisis de regresión lineal (Tabla 22), donde Madariaga *et al*¹⁸⁶, asegura que el valor del intercepto indica el valor promedio de la variable Y cuando X es cero y el valor de la pendiente indica el cambio promedio de Y, por cada aumento de una unidad en X. De tal forma, que para *Lc. lactis* con cada incremento de una unidad logarítmica de UFC/150µl le corresponde un consumo de azúcar total de 0,1460 y 0,1049 mg/L en medio MRS y PRO, respectivamente. Mientras que para *L. gasseri* el consumo fue de 0,0876 y 0,1299 mg/l (MRS y PRO).

Madariaga *et al*¹⁸⁷, infiere que el coeficiente de determinación (r^2) representa la cantidad de variabilidad de Y que puede ser explicado por X, por lo tanto las ecuaciones de mejor predicción para este estudio fueron las obtenidas para *L. gasseri* y *Lc. lactis* en medio PRO con un r^2 de 0,9737 y 0,9607, respectivamente. Por el contrario, las ecuaciones de *Lc. lactis* y *L. gasseri* en el medio MRS no obtuvieron un buen r^2 quedando una alta variabilidad sin explicar

Tabla 22. Regresiones lineales entre el consumo de azúcares (mg/L) y crecimiento bacteriano (Ln UFC/150µl)

CEPA	MEDIO	PENDIENTE	INTERCEPTO	r^2
<i>Lc. lactis</i>	MRS	-0,1460	4,8436	0,7215
	PRO	-0,1049	3,5746	0,9607
<i>L. gasseri</i>	MRS	-0,0876	3,5154	0,8405
	PRO	-0,1299	4,0175	0,9737

r^2 : Coeficiente de determinación.

¹⁸⁶ Madariaga, D. F. C., Rodríguez, J. L. G., Lozano, M. R., Vallejo, E. C., & de Administración, E. Inferencia estadística Módulo de regresión lineal simple. 2013, p. 12

¹⁸⁷ *Ibíd.*, p. 19.

Figura 13. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150µl en el medio MRS de *Lactobacillus gasseri*

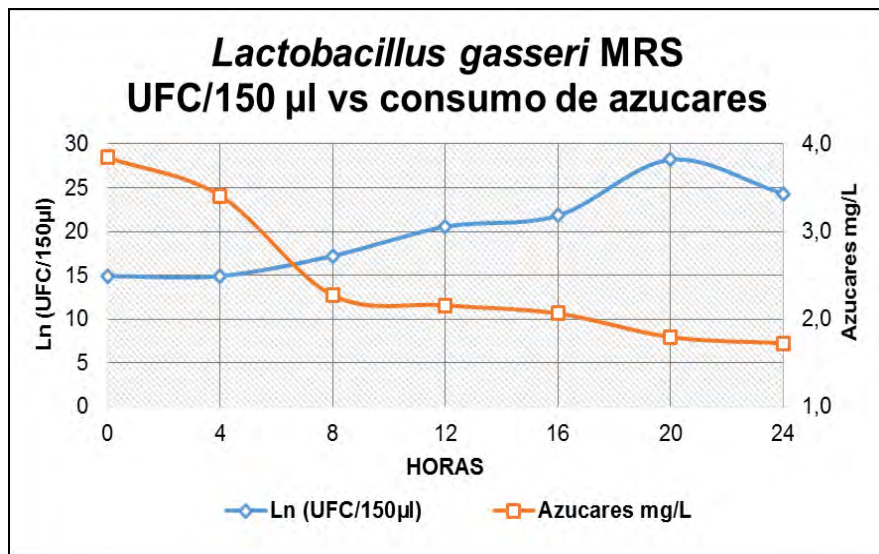


Figura 14. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150µl medio PRO *Lactobacillus gasseri*

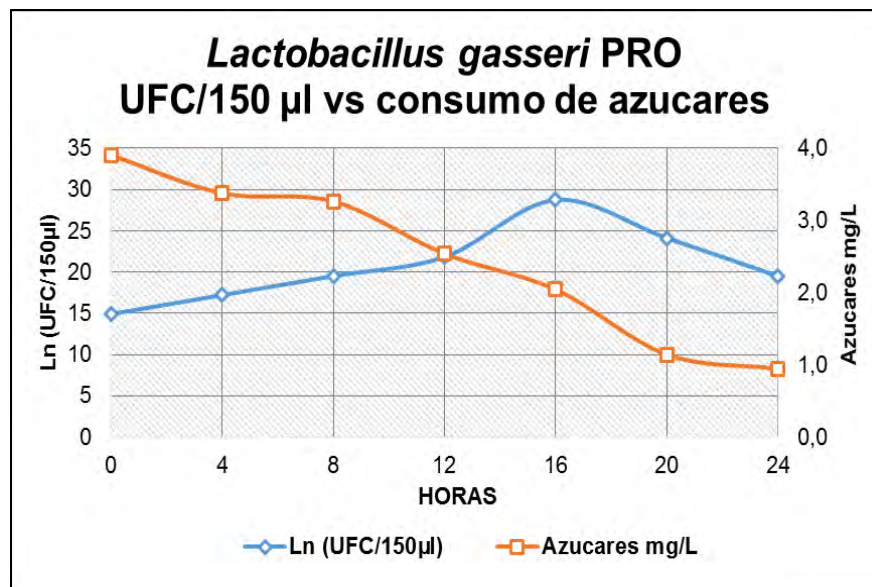


Figura 15. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150µl medio MRS *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

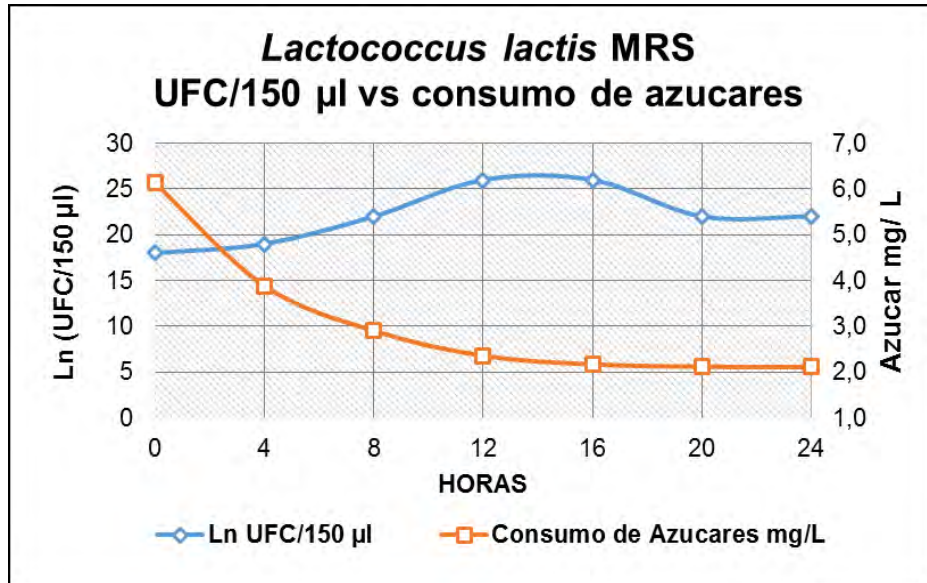
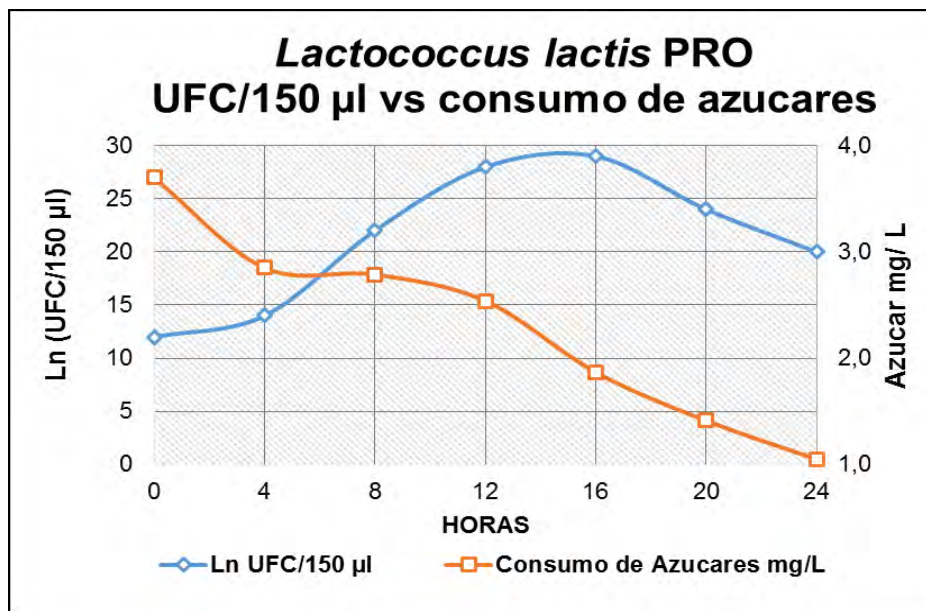


Figura 16. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/150µl medio PRO *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



El estudio de medios de cultivo ha sido de mucha importancia en la industria láctea, por la interacción entre las diferentes materias primas y sus diferentes contenidos nutricionales en relación al crecimiento óptimo de las BAL. Uno de los nutrimentos que ha sido estudiado con relación del crecimiento de las BAL son los hidratos de carbono, ya que estos son generalmente la fuente principal que utilizan las BAL como sustrato energético.

Cardelle *et al*¹⁸⁸, menciona que algunas cepas de lactobacilos son utilizados como probióticos en combinación con prebióticos; en la mayor parte en estudios de fermentación *in vitro* con diferentes sustratos, es difícil determinar cuál de todos se fermentan selectivamente por los microorganismos de interés, y también se dificulta establecer la velocidad a la que un solo oligosacárido es fermentado. En este contexto, es posible inferir que en los medios de fermentación en los que *L. gasseri* y *Lc. lactis* fueron sembrados, no se podría establecer con seguridad que carbohidrato fue el que las BAL estudiadas consumieron preferiblemente.

En contraste, otro aspecto importante con respecto al consumo de azúcares, es el de identificar aquellos carbohidratos que son incapaces de fermentar las BAL. Según Anwar *et al*¹⁸⁹, quien realizó ensayos con tres cepas de *L. gasseri*, registro que ninguna fue capaz de fermentar rafinosa. Por su parte García¹⁹⁰ encontró que

¹⁸⁸ CARDELLE COBAS, A; CORZO, N; OLANO, A; PELÁEZ, Ca, REQUENA, Ta, & ÁVILA, M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium growth. International journal of food microbiology, 2011, vol. 149, no 1, p. 82

¹⁸⁹ ANWAR *et al*. Op.cit., p. 1271

¹⁹⁰ GARCÍA IBARRA, Juan Antonio. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis para obtener el título de licenciado en química en Alimentos. Pachuca de Soto, Hidalgo, 2007. P. 64.

Lc. lactis fue incapaz de fermentar arabinosa, melibiosa y rafinosa. Al respecto Halász¹⁹¹, menciona que la fermentación de disacáridos, como celobiosa y melibiosa, obedece a la capacidad de las BAL de fermentar estos azúcares ya que difieren entre diferentes especies.

Rossi *et al* citados por Díaz Vela *et al*¹⁹², sugieren que las BAL, en presencia de medios pobres en monosacáridos, promueve que el metabolismo se adapte a consumir oligo o polisacáridos. En referencia a lo anterior, Stahl *et al* citados por Guío¹⁹³, aseguran que los oligosacáridos son componentes naturales de alimentos comunes como el plátano y la soya. Como se mencionó anteriormente, las tablas 13 y 14 permiten analizar la composición teórica aproximada de los medios estudiados en donde se observa que el medio PRO está compuesto por diferentes materias primas las cuales aportan en conjunto una mayor cantidad de nutrientes a diferencia del medio PRO, por lo cual *L. gasseri* y *Lc. lactis* tuvieron una mayor oferta nutricional. En cuanto a la composición de carbohidratos, el medio MRS aporta 21,32 g/L en comparación con el medio PRO el cual aporta 98,13g/L. Ramírez¹⁹⁴, asegura que el sustrato energético de las BAL se deriva de la fermentación de carbohidratos para producir ácido láctico, y para este fin, se utiliza el esquema de (EMP), en donde se genera casi exclusivamente ácido láctico y la vía 6 fosfogluconato/fosfoacetolasa, del que se obtienen etanol, ácido acético y dióxido de carbono como productos finales.

6.6.5 Determinación de proteínas de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. El valor de proteína reportado en la fase exponencial para *L. gasseri* en los medios MRS y PRO fue de 0,13 y 0,70 mg/L. Por su parte *Lc. Lactis* registró un valor de proteína de 0,06 y 0,05 mg/L en los medios MRS Y PRO respetivamente (Tabla 23). En las figuras 17 y 18 se muestra los valores de proteína encontrados en todos los tiempos de la cinética de fermentación.

Tabla 23. Determinación de proteínas de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Fase	<i>Lactobacillus gasseri</i> Exponencial	<i>Lactococcus lactis</i> Exponencial
------	---	--

¹⁹¹ HALÁSZ, Anna. Lactic acid bacteria. Food Quality and Standards, 2009, vol. 3, p. 74

¹⁹² ROSSI M, CORRADINI C, AMARETTI A, NICOLINI M, POMPEI A, ZANONI S, Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. citados por DÍAZ-VELA, J., MAYORGA-REYES, L., TOTOSAUS S, A., & PÉREZ-CHABELA, M. D. L. Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae*, 2012, vol. 19, no 3, p. 253-260.

¹⁹³ STAHL, B.; THURL, S.; ZENG, J.; KARA, M.; HILLENKAMP, F.; STEUP, M., and SAWATZKI, G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Citados por GUÍO VILLARREAL, Felipe Andrés. Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con galactosidasa inmovilizada. Tesis Doctoral en Ingeniería Química Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. 2014. P. 4-5

¹⁹⁴ RAMÍREZ Op. Cit., p. 5

Medio de crecimiento	MRS	MRS
Proteína mg/L	0,13	0,06
Medio de crecimiento	PRO	PRO
Proteína mg/L	0,70	0,05

Figura 17. Determinación de proteínas (mg/L) y crecimiento UFC/150µl medio MRS y PRO de *Lactobacillus gasseri*

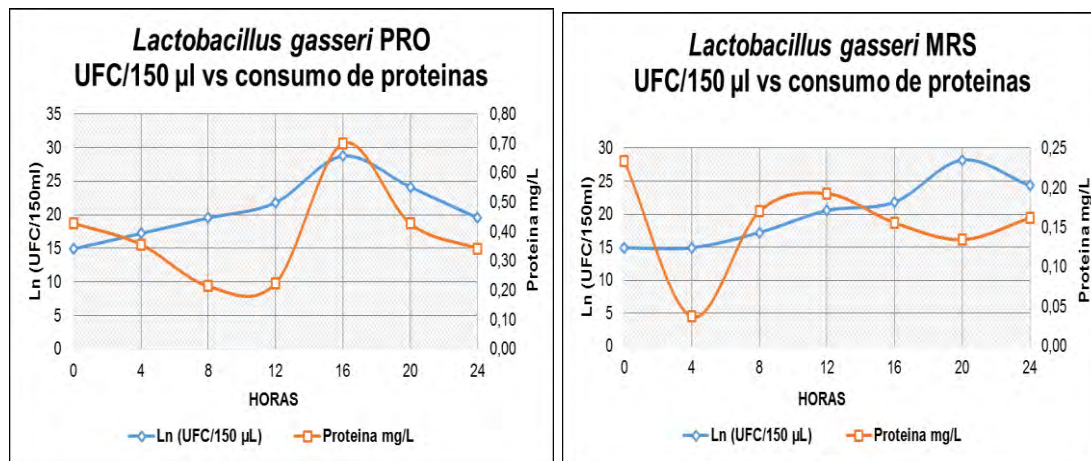
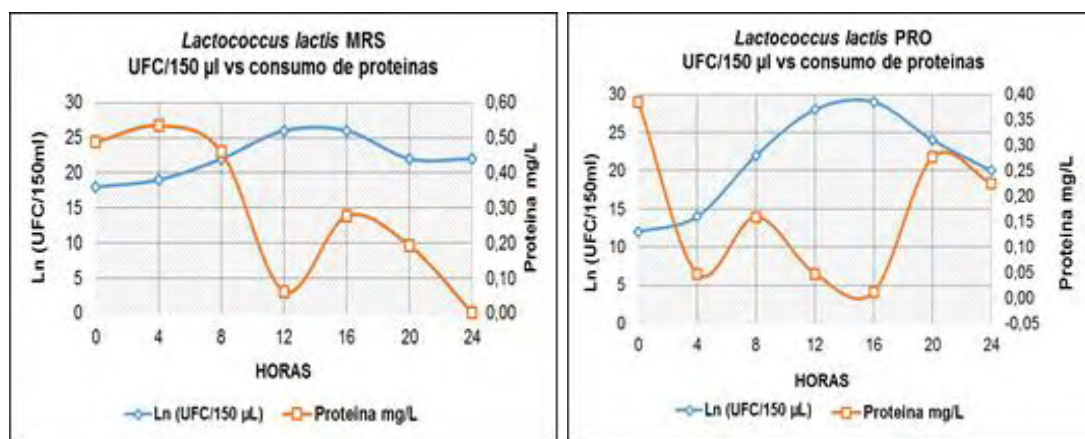


Figura 18. Determinación de proteínas (mg/L) y crecimiento UFC/150µl medio MRS y PRO *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



Elías *et al* citados por Chafla *et al*¹⁹⁵, aseguran que el aumento en la concentración de proteína en un medio está estrechamente relacionado con el desarrollo de

¹⁹⁵ ELÍAS, A; LEZCANO, O y HERRERA, F. R. Algunos indicadores bromatológicos y productos finales de la fermentación para la obtención de cuatro tipos de Sacharinas inoculadas con Vitafert. Citados por CHAFLA, A. L., ESPIN, J. M., JARA, M., & PEÑAFIEL, S. E. Caracterización de proteína microbiana obtenida a partir de residuos agroindustriales. Revista Amazónica Ciencia y Tecnología, 2015, vol. 4, no 2, p. 143.

microorganismos como las bacterias y de enzimas. En contraste Olivera¹⁹⁶, afirma que si bien las BAL carecen de la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos, cuya naturaleza y número varía según la cepa considerada; pueden obtenerlos gracias a su actividad proteolítica a partir de las proteínas del medio en que se desarrollen.

Como se puede observar en las figuras 17 y 18 la proteína registrada por las BAL utilizadas en esta investigación, no muestran una tendencia definida en comparación con la tendencia que marca el consumo de azúcar. Esta característica puede explicarse por la acción simultánea de la actividad proteolítica de las BAL y el consumo de proteínas. En las curvas para determinación de proteína de *L. gasseri* y *Lc. lactis* en los dos medios estudiados, se observa que en promedio, entre las 7 primeras horas de iniciada la cinética se observa una tendencia decreciente, la cual podría corresponder al consumo de proteínas de las BAL. Luego de este descenso se aprecia un incremento en todas las curvas, lo cual podría entenderse como el incremento celular.

García y Jerez¹⁹⁷, encontró un valor de proteína de 0,68 mg/L durante la fase exponencial para *Lactobacillus casei*; este valor difiere al reportado por *L. gasseri* en el medio MRS, pero es muy similar al encontrado en el medio PRO. Por su parte los valores reportados por *Lc. lactis* en los medios MRS y PRO.

Con respecto a la capacidad proteolítica de las BAL, Olivera¹⁹⁸ menciona que el género *Lactobacillus* tienen mayor capacidad proteolítica que las del género *Lactococcus*, además encontró que la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* presentó actividad proteolítica sobre k-caseína, α -caseínas y β -caseína.

6.7 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

En las tablas 24 y 25 se reportan los resultados de la producción de biomasa, relacionados con la velocidad específica de crecimiento (μh^{-1}), fase de latencia, fin de la fase logarítmica (horas), 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) para *L. gasseri* y *Lc. lactis*.

Tabla 24. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus gasseri* en los medios MRS y PRO

¹⁹⁶ OLIVERA Op., cit. p. 16.

¹⁹⁷ 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.

¹⁹⁸ OLIVERA Op., cit. p. 29-30

CEPA BACTERIANA <i>Lactobacillus gasseri</i>	MEDIO	
	MRS	PRO
Fase de latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	0,646	0,8059
Fin fase logarítmica (horas)	20:00	16:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	64,38	48,41
Incremento celular fin fase logarítmica	2E+12	3,0E+12
Incremento celular total	4E+10	3,0E+08
% azúcares consumidos fin fase logarítmica (g/L)	55,21	70,77
% azúcares consumidos totales (g/L)	55,21	75,64
% proteína consumida fin fase logarítmica (g/L)	30,43	20,93
% proteína consumida total (g/L)	30,43	11,63
R ² fin fase logarítmica	0,9041	0,9245

Tabla 25. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO

CEPA BACTERIANA <i>Lactococcus lactis</i>	MEDIO	
	MRS	PRO
Fase de latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	0,741	1,475
Fin fase logarítmica (horas)	12:00	12:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	56,12	28,2
Incremento celular fin fase logarítmica	3E+11	6,0E+12
Incremento celular total	3E+09	4,0E+08
% azúcares consumidos fin fase logarítmica (g/L)	64,60	49,46
% azúcares consumidos totales (g/L)	65,74	71,62
% proteína consumida fin fase logarítmica (g/L)	42,86	15,79
% proteína consumida total (g/L)	61,22	39,47
R ² fin fase logarítmica	0,9462	0,9524

Orozco¹⁹⁹, explica que la división celular ocurre en la fase exponencial, a velocidad de incremento celular (N), es proporcional al número de células iniciales; en teoría las células incrementan su número mediante una progresión geométrica 2^0 , 2^1 , $2^2 \dots 2^m$ hasta m divisiones.

El tiempo de duplicación celular de *Lc. lactis* en este estudio, registró valores de 56,12 y 28,2 minutos, en los medios MRS y PRO respectivamente. Por su parte Ahmed *et al*²⁰⁰, afirman que tres cepas de *Lc. lactis* las cuales fueron cultivaron en leche en polvo reconstituida sin grasa, reportaron tiempos de duplicación celular de 68,16, 65,68 y 60,17 minutos. Las diferencias en cuanto el tiempo de duplicación pueden explicarse por la acción de los medios de crecimiento y sus diferentes aportes nutricionales, la temperatura entre otras. Por su parte *L. gasseri* presenta una tendencia similar a duplicarse en menor tiempo en el medio PRO en comparación con el medio MRS. Al mismo tiempo Orozco²⁰¹, infiere que la velocidad de crecimiento específica obedece a la concentración de nutrientes, por tal razón, cuando la concentración es alta, la velocidad de crecimiento específica puede alcanzar valores máximos. Lo anterior es congruente con los resultados encontrados en este estudio, ya que en la comparación de las tablas 13 y 14 se aprecia que el medio en el que se encuentra la mayor concentración de nutrientes es el medio PRO, y es también en donde se registran los mayores valores para velocidad específica de crecimiento y los menores tiempo de duplicación para *L. gasseri* y *Lc. lactis*.

Los resultados de la cinética de fermentación permitieron establecer que el medio PRO es el más adecuado en términos de tiempo y velocidad para el crecimiento de las BAL estudiadas, debido a que *L. gasseri* alcanzó una velocidad específica de crecimiento (μh^{-1}) de 0,646 y 0,8059 en los medios MRS y PRO respectivamente. En cuanto a *Lc. lactis*, se puede observar una tendencia similar a la de *L. gasseri*, ya que el valor de μh^{-1} del medio MRS fue de 0,741, en comparación con el valor de μh^{-1} del medio PRO, el cual fue de 1,475.

También es importante tener en cuenta los costos de producción de los dos medios para su proceso de producción a nivel industrial. El costo de 500 gramos del medio comercial MRS es \$ 209.000, y el costo de elaboración de un litro de este medio comercial es de **\$ 21.736**; mientras, que el costo de la materia prima para la producción de un litro de inóculo con un medio a base de azúcar, suero de leche, salvado de trigo, leche de soya es de **\$ 2.835**.

¹⁹⁹ Orozco Op. cit., p. 45

²⁰⁰ AHMED et al. Op. cit., p. 481

²⁰¹ Orozco Op. cit., p. 47

6.8 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC-DAD) EN EL SOBRENADANTE de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

En la tabla 26 se puede observar que *L. gasseri* registró la presencia de ácido láctico en el sobrenadante con valores de 5,70 y 5,30 g/L. por su parte *Lc. lactis* reportó valores de 9,95 y 9,00 g/L.

Tabla 26. Análisis de ácido láctico en Muestras de Sobrenadante

<i>Lactobacillus gasseri</i>	
Muestra 1 g/L	Duplicado g/L
5,70	5,30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
Muestra 1 g/L	Duplicado g/L
9,95	9,00

Waldir *et al*²⁰², afirman que actualmente el ácido láctico se obtiene por síntesis química y por vía fermentativa, siendo esta última la vía de preferencia, debido a que se obtiene ácido láctico ópticamente puro.

La producción alta de ácido láctico es una importante característica que se espera de las bacterias con potencial probiótico, por tal motivo fue importante realizar la determinación y cuantificación del mismo. Waldir *et al*²⁰³, encontró valores de ácido láctico en ensayos de cultivo batch, producidos por *Lactobacillus plantarum* en diferentes medios de cultivo en biorreactor, los cuales se encontraron entre 2,7 y 5,4 g/L. El mismo autor concluye que en el medio que aportó las mejores condiciones, se registró un valor de 5,4 g/L. Resultados similares fueron reportados por *L. gasseri* y superiores por *Lc. Lactis*.

Según Waldir *et al*²⁰⁴, los aportes de sales minerales y la concentración de la fuente de carbono, tienen un papel significativo en la conversión de glucosa y en los parámetros de producción de ácido láctico. Por lo anterior, las diferencias entre los resultados encontrados en esta investigación y los resultados mencionados anteriormente pueden explicarse por la acción del medio.

García *et al* afirman que “las mejores producciones de ácido se obtienen a niveles bajos de sulfato de amonio, y a niveles altos se requiere mayor suplementación

²⁰² WALDIR, Estela; MOJMÍR, rychtera, MELZOCH, Karel; QUILLAMA, Elena y EGOAVIL, Erida. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. En: Rev. Perú, Biol. Diciembre, 2007. Vol. 14. No. p. 274

²⁰³ *Ibíd.*, p. 274

²⁰⁴ *Ibíd.*, p. 275

con lactosa inicial; sin embargo, altas concentraciones de nitrógeno en el medio no favorecen la producción de ácido láctico.”²⁰⁵

Monteagudo y Aldavero citados por Waldir *et al.*, afirman que “los factores limitantes en la producción de ácido láctico por la vía fermentativa son principalmente, la baja concentración de bacterias lácticas en el sistema y la inhibición del crecimiento por el producto.”²⁰⁶

Ben Amor *et al* citados por Waldir *et al* garantizan que “los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias Streptococcaceae (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae*.”²⁰⁷

Hagerdal y Hofvendahl citados por Suárez²⁰⁸ afirman que entre las diferentes fuentes de carbono, la glucosa arroja mayores concentraciones de ácido láctico y rendimientos que con otros azúcares. La xilosa, galactosa, arabinosa, lactosa, fructosa y celulosa hidrolizada pueden ser menos efectivos. Además que las concentraciones de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo por lo general, se encuentran entre 10 y 25 g/L. la adición de nutrientes y concentraciones más altas de estos, tienen un efecto positivo en la producción de ácido láctico.

Cock y De Stouvenel²⁰⁹, en su estudio con *Lactococcus lactis subsp lactis* encontraron que la bacteria homofermentativa fue aislada de hojas de plantas de caña de azúcar la cual produjo 12,4 g/L-1 de ácido láctico a 36 °C y 13,7 g/L -1 a 32 °C (sin ajuste de pH y sin agitación); los resultados se deben a que la adaptación de la cepa a entornos con altas concentraciones en sacarosa ya que este microorganismo cuenta con el sistema enzimático para hidrolizar el disacárido y metabolizar luego la glucosa por la vía glicolítica.

Fujimura *et al*²¹⁰, encontraron que la cantidad de ácido láctico producido por *L. gasseri* OLL 2716 fue aproximadamente 1,4 g / litro. Por su parte Kimura²¹¹,

²⁰⁵ GARCÍA M. Carlos. ARRÁZOLA P. Guillermo VILLALBA C. Marcela. Producción de ácido lactico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2013. Vol 11 No. 1, p. 142

²⁰⁶ Monteagudo, J. M & M. Aldavero.. Production of L – lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* in chemostat culture using an ion exchange resins system. citados por Waldir, et al. Op. Cit., p. 271.

²⁰⁷ BEN AMOR, K.; E. E. VAUGHAN & W. M. de Vo. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic Acid bacteria. citados por *Ibid.*, p. 271.

²⁰⁸ HAGERDAL B, HOFVENDAHL K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Citados por SUÁREZ ZULUAGA, Diego Andrés. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus Casei* ATCC 7469. Tesis de Pregrado para optar el título de Ingeniero de Procesos Departamento de ingeniería de procesos. Medellín: Universidad EAFIT, Facultad de ingeniería, 2007. p. 30.

²⁰⁹ COCK, Liliana Serna; DE STOUVENEL, Aida Rodríguez. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. Revista Colombiana de Biotecnología, 2005, vol. 7, no 1, p. 3.

²¹⁰ Fujimura, S., Watanabe, A., Kimura, K., & Kaji, M. Probiotic mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*, 2012, vol. 50, no 3, p. 1135.

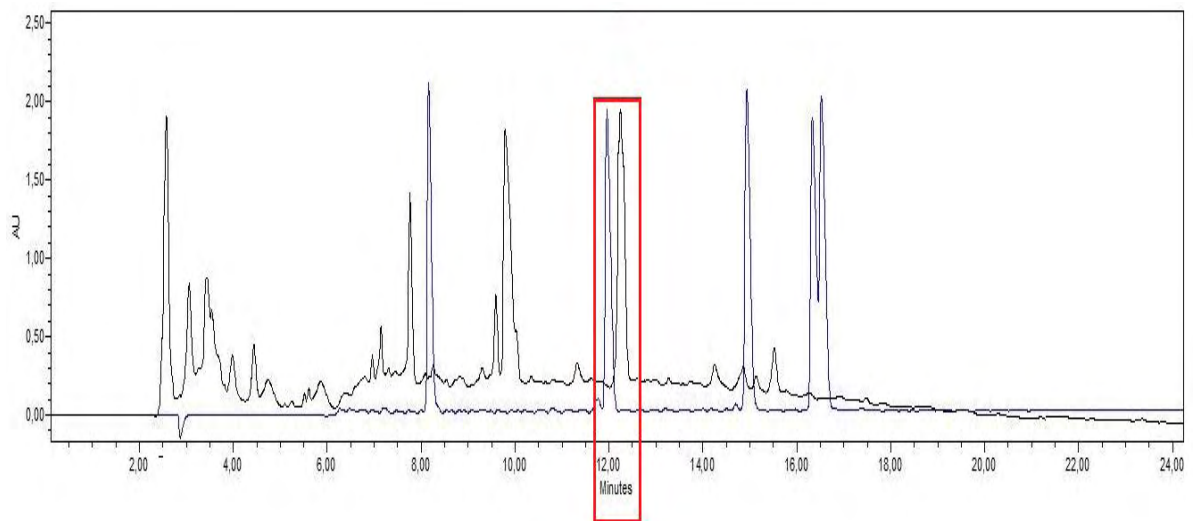
menciona que *L. gasseri* posee una fuerte capacidad de antiácido, por tal razón *L. gasseri* puede sobrevivir a pH bajos suprimiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

6.9 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC – DAD

La comparación de los 7 picos detectados en el sobrenadante de *L. gasseri* frente al patrón estándar, indica que durante el tiempo 11,95 correspondiente al pico número 6 fue similar; en este caso se puede inferir que corresponder a un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,69 mg/ml.

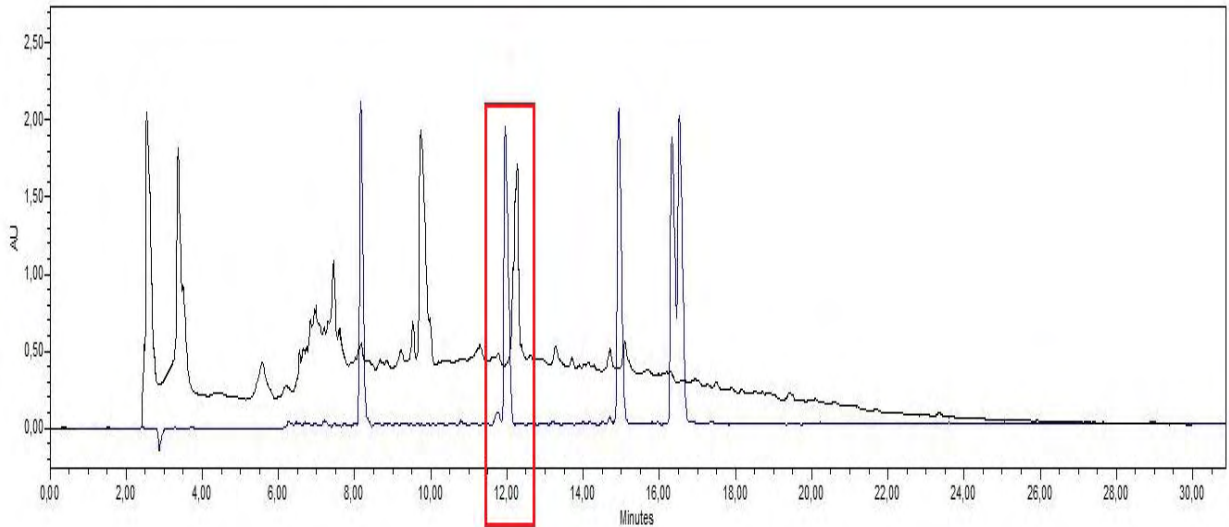
La comparación de los 7 picos detectados en el sobrenadante de *Lc. lactis* frente al patrón estándar indica que durante el tiempo 11,95 correspondiente al pico número 6 fue similar; en este caso se puede inferir que corresponder a un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,62 mg/ml.

Figura 19. Cromatograma de *Lactobacillus gasseri*



²¹¹ Kimura K. 2004. Health benefits of probiotics: probiotics for *Helicobacter pylori* infection. Citado por Ibíd., p. 1135.

Figura 20. Cromatograma correspondiente a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Los ensayos de inhibición *in vitro*, demostraron que *L. gasseri* y *Lc. lactis* pueden inhibir a *Y. pseudotuberculosis*, por acción de las bacterias y de su sobrenadante. Esta característica está asociada a la producción de bacteriocinas, ácido láctico y disminución del pH del medio.

El sobrenadante de *L. gasseri* y *Lc. lactis* presentó inhibición sobre *Y. pseudotuberculosis*; en general, este efecto puede asociarse a la posible presencia en el sobrenadante de compuestos peptídicos.

Los resultados reportados en la cinética de fermentación para *L. gasseri* en el medio PRO, demuestran la fase exponencial se presentó cuatro horas antes y con mayores conteos de UFC que la cinética efectuada en el medio MRS. Por su

parte *Lc. Lactis* mostro que la fase exponencial ocurrió en el mismo tiempo de la cinética de fermentación y alcanzo conteos de UFC más altos en el medio PRO. Por lo anterior es posible concluir que el medio PRO aportó mejores condiciones a *L. gasseri* para su crecimiento, a diferencia de *Lc. lactis* quien presentó un mayor conteo de UFC en el medio MRS.

Las BAL en estudio, tuvieron procesos de fermentación adecuados, presentaron crecimientos elevados, soportando bajos pH y porcentajes variables de sales biliares y bilis bovina, además de una eficiente producción de ácido láctico. Por lo cual se concluye que de forma *in vitro*, las BAL estudiadas pueden soportar las condiciones fisiológicas simuladas de su paso por el tracto digestivo y sus barreras digestivas.

El medio PRO presenta ventajas a nivel de costos por la facilidad para obtener las materias primas para su producción. Por lo cual se concluye que es una buena alternativa para la producción de inóculos.

Los probióticos, como alternativa a antibióticos es un factor importante debido a que su efecto podría ser menos agresivo en comparación con los antibióticos, y es un argumento válido que promueva estos métodos para una producción a escala industrial e incorporarlas en la dieta animal.

7.2. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas complementarias de adhesión celular, actividad antioxidante e hidrofobicidad, que permitan corroborar el potencial probiótico de *L. gasseri* y *Lc. lactis*, antes de una posible evaluación *in vivo*

Realizar una evaluación de medios prebióticos, que permita un crecimiento adecuado de las BAL y que se acorde con el tipo de dieta y la especie animal a la que se quiere suministrar.

Se recomienda realizar pruebas biológicas de identificación a los agentes que causan el efecto inhibitorio propios de *L. gasseri* y *Lc. lactis*.

Realizar estudios más profundos de *L. gasseri* y *Lc. lactis* relacionados con su capacidad para inhibir el crecimiento de otras cepas patógenas que se presenten en la producción animal.

Se recomienda realizar pruebas de conservación de los medios de cultivo, para establecer el tiempo de vida útil del medio PRO y de otros, que tengan como propósito elaborar productos funcionales para el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO RIVAS, Carmen Cecilia; DÍAZ RIVERO, Cándida Gloria. Estudio preliminar del potencial probiótico lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. Revista de la Facultad de Farmacia, 2009, vol. 51, no 1, p. 8-14.

AGÜERO, Nadia de Lourdes; ALBARRACÍN ORIO, Andrea; MIER, Alfredo Esteban; ALEU, Gonzalo; ZOGBI, Ana Paola; ROSMINI, Marcelo Raúl y FRIZZO, Laureano Sebastián. Evaluación de la producción de ácido láctico y gas por cepas autóctonas y comerciales potencialmente iniciadoras y probióticas para productos cárnicos. En: XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, 2014. 2 p.

AMAYA GARZÓN, María Angélica y CALLE LONDOÑO 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 Médica Veterinaria.: BOGOTÁ D.C. Universidad de La Salle, Facultad De Medicina Veterinaria. 2008. 49 p.

ANWAR, M. A; KRALJ, S; PIQUÉ, A. V; LEEMHUIS, H; VAN DER MAAREL, M. J & DIJKHUIZEN, L. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 2010, Vol. 156, no 4, p. 1264-1274.

ARAKAWA, K; KAWAI, Y; NISHIMURA, J; KITAZAWA, H; & SAITO, T. Negative effect of divalent metal cations on production of gasserin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*, in milk-based media. *International dairy journal*, 2009, vol. 19, no 10, p. 612-616.

ARRIBAS, M. B. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Diss. Tesis de Doctorado]. Granada: Universidad de Granada, 2009. p. 213

AHMED, Toqeer; KANWAL, Rashida and AYUB, Najma. Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*. En: *Biotechnology*, 2006, vol. 5, no 4, p. 481-488.

AZCARATE PERIL, Andrea; ALTERMANN, Eric; JUN GOH, Yong; TALLON, Richard; SANOZKY DAWES, Rosemary; PFEILER, Erika; O'FLAHERTY, Sarah; BUCK, Logan; DOBSON, Alleson; DUONG, Tri; MILLER, Michael; BARRANGOU, Rodolphe and KLAENHAMMER. Analysis of the Genome Sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. En: *Applied and Environmental Microbiology*. Febrero. 2008. Vol. 74, no. 15, p. 4610-4625

BAUER, A. W; KIRBY, W. M. M: SHERRIS, J. C & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 1966, vol. 45, no 4, p. 493

CABALLERO CERVANTES, Yesenia. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de: maestra en ciencias. México: colegio de postgraduados, Institución de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus montecillo 2014. P. 74

CARDELLE COBAS, A; CORZO, N; OLANO, A; PELÁEZ, C; REQUENA, T & ÁVILA, M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *International journal of food microbiology*, 2011, Vol. 149, no 1, p. 81-87.

CÁRDENAS CÁRDENAS, Nivia. Estudio de las propiedades tecnológicas de bacterias aisladas de leche materna: aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia 2015. P. 15

CENTRO DE CONTROLE E PRODUCTOS PARA DIANOSTICOS LTDA CECON. [online]. [Citado 6 enero 2016] Disponible en: <<http://www.ceconsp.com.br/>>

COCK, Liliana; DE STOUVENEL, Aida. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. Revista Colombiana de Biotecnología, 2005, Vol. 7, no 1, p. 32.

CONTRERAS-PINZÓN, M.; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, R. & GONZÁLEZ-BURGOS, Araceli. Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera. Revista de Ciencia, Tecnología y Educación, 2007, Vol. 22, p. 35-42.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement [online]. West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania. Vol. 34 No. 1. [Citado 14 febrero 2016].

CHAFLA, A. L., ESPIN, J. M., JARA, M., & PEÑAFIEL, S. E. Caracterización de proteína microbiana obtenida a partir de residuos agroindustriales. En: Revista Amazónica Ciencia y Tecnología, 2015, Vol. 4, no 2, p. 131-145.

DÍAZ, Luisa Villamil; MARTÍNEZ-SILVA, María Angélica. PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. 2009, vol. 38, p. 165-187

DOELLE, Horst Werner. Bacterial metabolism. Academic Press, Second Edition. Australia: St. Lucia, Brisbane, 2014. 738 p.

DOMMELS, Y. E; KEMPERMAN, R. A; ZEBREGS, Y. E., DRAAISMA, R. B; JOL, A; WOLVERS, D. A & ALBERS, R. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. Applied and environmental microbiology, 2009, Vol. 75, no 19, p. 6198 – 6204.

DUNNE, Colum. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflammatory bowel diseases, 2001, Vol. 7, no 2, p. 136-145.

DÍAZ VELA, J; MAYORGA REYES, L; TOTOSAUS S, A & PÉREZ CHABELA, M. D. L. Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. 2012, Vol. 19, no 3, p. 253-260.

FARINHA, Luiz; SABO, Sabrina; PORTO, Maria; SOUZA, Ellen; OLIVEIRA, Maricê y OLIVEIRA, Ricardo. Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*. En: Chemical Engineering, 2015, Vol. 43. p. 313-318.

FUENMAYOR BOBADILLA, Carlos Alberto. Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico. Tesis de Maestría en Ingeniería Química Área de Bioprocesos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería, 2009. p. 36

FUJIMURA, S; WATANABE, A; KIMURA, K & KAJI, M. Probiotic mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*, 2012, Vol. 50, no 3, p. 1134-1136.

FLÓREZ GARCÍA, Ana Belén. Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Memoria, presentada para optar al grado de Doctor. Oviedo 2007. Universidad de Oviedo. Departamento de biología funcional, Área de microbiología. 191 p.

FRIZZO, Laureano. Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. En: *Ciencias Veterinarias*. 2006, Vol. 5, no 1/2, p. 69-80.

GALINDO, C. L; ROSENZWEIG, J. A; KIRTLEY, M. L & CHOPRA, A. K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Journal of pathogens*, 2011, Vol. 2011. p. 15.

GARCÍA IBARRA, Juan Antonio. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis para obtener el título de licenciado en química en Alimentos. Pachuca de Soto, Hidalgo, 2007. P. 96

GARCÍA M. Carlos. ARRÁZOLA P. Guillermo VILLALBA C. Marcela. Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. En: *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2013. Vol 11 No. 1, p. 136 – 143

GILLENIIUS, Erik; URBAN, Constantin F. The adhesive protein invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* induces neutrophil extracellular traps via β 1 integrins. *Microbes and infection*, 2015, Vol. 17, no 5, p. 327-336.

GUÍO VILLARREAL, Felipe Andrés. Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con galactosidasa inmovilizada. Tesis Doctoral en Ingeniería Química Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. 2014. p. 110

GRABENSTEIN, J. P., MARCEAU, M., PUJOI, C., SIMONET, M., & BLISKA, J. B. I. The response regulator PhoP of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for

replication in macrophages and for virulence. En: Infection and immunity, 2004, Vol. 72, no 9, p. 4973-4984.

GREGORET, V; PEREZLINDO, M; VINDEROLA, G; REINHEIMER, J and BINETTI, A. (2013). A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. En: Food microbiology. November, 2012. Vol 34. p. 19-28.

HALÁSZ, Anna. Lactic acid bacteria. Food Quality and Standards, 2009, Vol. 3, p. 70-82

HATHOUT, Amal S.; ALY, Soher E. Role of lactic acid bacteria as a biopreservative agent of Talbina. En: Journal of American Science, 2010, Vol. 6, no 12, p. 889-898.

HAWAZ, Estifanos. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and *in vitro* evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. En: African Journal of Microbiology Research, 2014, Vol. 8, no 13, p. 1419-1425.

JIMÉNEZ VELÁSQUEZ, Sabrina Del Carmen. Identificación de proteínas de secreción con capacidad inmunogénica de aislamientos de *Yersinia pseudotuberculosis* provenientes de plantales cuyícolas del departamento de Nariño. Trabajo de Grado Magíster en Ciencias Biológicas.: Bogotá D.C. Pontificia universidad javeriana. Facultad de ciencias. Programa de posgrado. Maestría en ciencias biológicas. 2011. 110 p.

JIMENEZ SERNA, Alaide. Efecto de diferentes fármacos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei shirota*. Tesis Doctoral. México D.F. Instituto politécnico nacional de ciencias biológicas. 2010. P. 12-13

JURADO GÁMEZ, H y GÚZMAN INSUASTY, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. En: Rev Med Vet Zoot. Agosto, 2105. Vol 62, no 2, p. 23-39.

JURADO-GÁMEZ, Henry; MARTÍNEZ, Javier Andrés; CHASPUENGAL, Aura Magdalena y CALPA, Fredy Yesid. Evaluación *in vitro* de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Abril, 2016. Vol 12 No. 2, p. 49-59

KIM, Woojin S.; REN, Jun; DUNN, Noel W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, Vol. 171, no 1, p. 57-65

KHEMARIYA, Priti; SINGH, Sudhir; NATH, Gopal and GULATI, Anil. Diversity Analysis, Batch Fermentation and Characterization of Nisin in Identified Strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. En: Food Biotechnology. 2014. no. 28. p. 142–161.

Laborclin, Manuel de antibiograma [online]. Rua Casseiro de Abreu. Marzo, 2013. [Citado 14 febrero2016]. Disponible en Internet: <http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_238.pdf>

LEE, Kyoung; HAN, Kyoung; SON, Sung; EOM, Su Jin; LEE, Si and PAIK, Hyun. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. En: Food Science and Technology. Vol, 64. July 2015. p. 1036-1041

LEÓN REISSIG, María Fernanda. Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado licenciatura en bioquímica. Universidad de la República. Facultad de ciencias. 2012. p. 52.

Madariaga, D. F. C., Rodríguez, J. L. G., Lozano, M. R., Vallejo, E. C., & de Administración, E. Inferencia estadística Módulo de regresión lineal simple. 2013, p. 57

MANZANO, Claudia; ESTUPIÑÁN, Diana; POVEDA, Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista chilena de nutrición*, 2012, vol. 39, no 1, p. 98-110.

MORENO GALARZA, Lizeth Johanna, Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Posgrado Interfacultades de Microbiología. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 2012. p. 26

MARTÍNEZ CASTRO, Sara Relación de la inmunidad en mucosas y la microbiota con las enfermedades inflamatorias. 2015. p. 42

MARTEAU, P; MINEKUS, M; HAVENAAR, R & HUIS, J. H. J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. En: Journal of Dairy Science, 1997, Vol. 80, no 6, p. 1031-1037.

MAVRIČ, Anja; TOMPA, Gorazd; TRMČIĆ, A; ROGELJ, Irena and MATIJAŠIĆ, B. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7—Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of an active component. En: Process Biochemistry. May, 2014. Vol. 49, no 8, p. 1251-1259.

MARTÍN, A; CÓRDOBA, J. J; ARANDA, E.; CÓRDOBA, M. G; ASENSIO, M. A; RODRÍGUEZ, A & CÓRDOBA, J. J. Actividad del Grupo de Bacterias Lácticas de Oviedo. 2011. p. 35-36.

MARDONES, J & DURRUTY, P. Microalbuminuria como elemento de predicción de nefropatía y riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos. *Endocrinología y Diabetes*, 2010, p. 246.

OLIVERA, Jorge. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Unidad Tecnológica de Alimentos-Facultad de Agronomía, 2011, p. 1-45.

OROZCO MURILLO, M. P. SOLARTE, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales. 2003. P. 92

PEÑAFLORES MORA, Nancy y GARCÍA GRUERREO, Andrés. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Trabajo de Grado licenciado en química de alimentos. Pachuca de soto, Hidalgo. Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de ciencias básicas e ingeniería. 2007. 113 p.

PISANO, Maria Barbara; FADDA, Maria Elisabetta; MELIS, Roberta Maria; CIUSA, Laura; VIALE, Silvia; DEPLANO, Maura y COSENTINO, Sofia. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. En: *Food Control*. November 2014. Vol, 51. p. 1-8.

POT, B., HERTEL, C., LUDWIG, W., DESCHEEMAER, P., KERSTERS, K., & SCHLEIFER, K. H. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. En: *Microbiology*, 1993, Vol. 139, no 3, p. 513-517.

PUNDIR, R. K; RANA, S; KASHYAP, N; & KAUR, A. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. En: *Journal of Applied pharmaceutical science*, 2013, Vol. 3, no 3, p.85-93.

PUJOL, Céline; BLISKA, James B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular *Yersinia*. En: *Clinical Immunology*, 2005, Vol. 114, no 3, p. 216-226.

RAMÍREZ CUENCA, María. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis Licenciado en Química de Alimentos. Hidalgo-México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de investigaciones químicas, 2005. p. 77

RAMÍREZ, J. C. R; ULLOA, P. R; VELÁZQUEZ, M. Y; GONZÁLEZ, J. A. U & ROMERO, F. A. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente Año, 2011, Vol. 2, no 7. p. 3.

RASHA H. BASSYOUNI, Walla S. ABDEL-ALL, Mostafa G. FADL, Saed Abdel-all and ZEINAT kamel. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products in Egypt as a Probiotic. En: Life Science Journal 2012; 9(4) p. 2924-2933

REYES ESTÉVEZ, Ricardo. Caracterización de la cinética de crecimiento de microorganismos lácticos a través de ultrasonidos y su transformada wavelet. Tesis de Maestría en Ciencias. Oaxaca: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Oaxaca, 2011. p. 70

RONDÓN, A. J; FLORIDO, G. M; SAMANIEGO, L. M; SALABARRÍA, R. B; SILVA, M. L; SOCORRO, M; & QUINTANA, M. P. EFECTO DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS EN LA REDUCCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE POLLOS. P. 11

RUIZ PÉREZ, Patricia. Biodiversidad de la microbiota lactica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos de la variedad cencibel: caracterización molecular y tecnología para la selección de cepas. 2010. p. 221

RUBIO, Raquel; JOFRÉ, Anna; MARTÍN, Belén; AYMERICH, Teresa y GARRIGA, Margarita. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. En: Food Microbiology. August, 2013. p. 303-311

SADIQ, Sara; IMRAN, Muhammad; HASSAN, Muhammad, IQBAL, Mazhar; ZAFAR, Yusuf and HAFEEZ, Fauzia. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. En: LWT-Food Science and Technology. May, 2014. Vol. 59, no 1, p. 204-210.

SAÉZ TORMO, G; BORREGO OLIVA, S; MONTORO BOTELLA, A; OCETE MOCHÓN, D & CERDÁ MICO, C. En: Infecciones quirúrgicas y tiempos. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Su utilidad en las infecciones quirúrgicas. 2009. P. 9

SAMOT, J.; BADET, C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. En: Anaerobe, December. 2012; Vol. 19, p. 34-38.

SANZ, Y. COLLADO, M y DALMAU, J. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. En: Acta pediátrica española. Vol. 61, no, p 476 – 482.

SÁNCHEZ, L; VICHI, J; LLANES, M; CASTRO, E; SOLER, D. M; ESPINOSA, I & FERREIRA, C. L. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Lactobacillus* spp. COMO CANDIDATO A PROBIÓTICAS. Revista de Salud Animal, 2011, Vol. 33, no 3, p. 154-160.

SÁNCHEZ, Claudia; NEVES, Ana; CAVALHEIRO, Joao; MOREIRA DOS SANTOS, Margarida; GARCÍA QUINTÁNS, Nieves; LÓPEZ, Paloma and SANTOS, Helena. Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH. En: Applied and Environmental Microbiology. 2007, Vol. 74. No. 4. p. 1136–1144.

SELLE, Kurt and KLAENHAMMER, Todd. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. En: Microbiology Reviews. April, 2013. Rev 37. p. 915–935.

SIGALA, Juan Carlos; TAFOLLA, Martha Patricia y PÉREZ GAVILÁN, Jose Pablo. Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración. En: BioTecnología. 2007. Vol. 11 No. 2. p. 18 – 27

SUÁREZ ZULUAGA, Diego Andrés. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus Casei* ATCC 7469. Tesis de Pregrado para optar el título de Ingeniero de Procesos Departamento de ingeniería de procesos. Medellín: Universidad EAFIT, Facultad de ingeniería, 2007. p. 117.

SUMERI, I., ADAMBERG, S., UUSNA, R., SARAND, I., & PAALME, T. Survival of cheese bacteria in a gastrointestinal tract simulator. En: International Dairy Journal, 2012, Vol. 25, no 1, p. 36-41.

SLONCZEWSKI, J. L., FUJISAWA, M., DOPSON, M., & KRULWICH, T. A. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. En: Advances in microbial physiology, 2009, Vol. 55, p. 1-317.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.[en línea] Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>. [citado en 20 de marzo de 2016]

TONG, Zhongchun; ZHOU, Lin; LI, Jie; KUANG, Rong; LIN, Yuan y NI, Longxing. An in vitro investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. En: Archives of oral biology, October, 2011. Vol. 57, no 4, p. 376-382.

VÁSQUEZ, Sandra Milena; SUÁREZ, Héctor; ZAPATA, Sandra. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la

conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 2009, vol. 36, no 1, p. 64-71

VILLA, K. J. F; ECHEVERRI, I. C. C; LÓEZ, L. W & ARIAS, J. A. C. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. En: *Revista Biosalud*. 2014, Vol. 13, no 1, p. 45-61.

WALDIR, E., RYCHTERA, M., MELZUCH, K., QUILLAMA, E. EGOAVII, E. I. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. En: *Revista Peruana de Biología*, 2007, Vol. 14, no 2, p. 271-276.

ZARATE SARAPURA, Edgar. MODELAMIENTO DEL EFECTO DEL CLORURO DE SODIO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE NISINA DE *Lactococcus lactis*. Febrero 2011. 60 p.

ANEXOS

ANEXOS

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

- En cámara de flujo laminar tipo II, junto al mechero, y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente, abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.

- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad, triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato, saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando un asa estéril, crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.
- De Inmediato, llevar a incubar las cajas petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

Anexo B. Reconstitución y manejo general de ampollas para *Yersinia pseudotuberculosis*

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 sentirán 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 C. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer

- Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez equivalente a un estándar 0.5 McFarland equivalente a $1,5 \times 10^7$ UCF/mL. La densidad correcta del estándar de turbidez debe verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia se realiza a 625 nm
- Los microorganismos *L. gaseeri*, *lc lactis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, fueron identificados por tinción de gram 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, en cuanto a bacterias de difícil crecimiento como *L. gasseri* se debe adicionar el 5% de sangre sobre el volumen del agar a preparar.

Preparación del inóculo

- **Método de crecimiento:** Se seleccionaron al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología. 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 $1,5 \times 10^7$ UCF/mL.

- **Inoculación de las placas:** En un lapso de tiempo óptimo después de ajustar la turbidez del inóculo, se toma un hisopo estéril de algodón el cual se sumerge en el tubo con la cepa. El hisopo se debe rotar varias veces y presionar firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Mueller -Hinton pasando varias veces el hisopo sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° C cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.
- **Aplicación de los sensidiscos a las placas inoculadas:** Con una pinza estéril se tomó cada disco de antibiótico los cuales deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Las cajas se invirtieron para evitar la acumulación excesiva de humedad y se llevaron a incubación a 37°C por 12 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 D. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos

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 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.

Características del Producto

Tabla 27. Antibióticos, sigla y cantidad

PRODUCTO	SIGLA	Contenido de disco antimicrobiano
PENICILINA	P	10 IU
CEFALOTINA	KF	30 µg
CIPROFLOXACINA	CIP	5 µg
GENTAMICINA	CN	10 µg
DICLOXACILINA	DCX	1 µg

Anexo E. Ensayos de inhibición *in vitro*

Obtención del sobrenadante de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

A partir de las bacterias lácticas en estudio, se procedió a realizar la obtención del sobrenadante de la siguiente manera;

- fue sembrada a partir de bacterias lácticas que fueron cultivadas en cajas petri con agar MRS y azul de anilina por 24 horas. posteriormente se tomó de tres a cuatro colonias y se sembró en caldo MRS a 37°C por 24 Horas
- Se hizo el ajuste de inóculo a escala MacFarland a una concentración de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL, correspondientes a un patrón 4 en la escala de McFarland, a una densidad óptica de 625 nm.
- A partir de la bacteria láctica previamente sembrada y ajustada, se tomaron 1,5 ml de la muestra y se los deposito en tubos eppendorf de 2 ml.

- A continuación se llevó las muestras a centrifugar en una criocentrífuga con una temperatura controlada de 4°C, y velocidad de 13.500 rpm por 15 minutos.
- Después de este procedimiento la bacteria láctica se separó en dos fases la primera con el sobrenadante y la segunda el precipitado (en este caso es la biomasa de las bacterias lácticas)
- Se procedió inmediatamente tomar una muestra cruda del sobrenadante, es decir sin filtrarlo, y otras se procedieron a filtrarlas de la siguiente manera:
- Con una jeringa de 5 ml, se extrajo el sobrenadante y se procedió a filtrar la muestra usando membranas de 0,2 µm en tubos eppendorf previamente estériles
- Una vez filtrado los sobrenadantes se tomó tres muestras de las cuales una se la neutralizo a pH 6 para eliminar el efecto de los ácidos, otra muestra se sometió a calentamiento a 80°C por 10 minutos para eliminar el efecto enzimático y finalmente una muestra que se neutralizo y se llevó a 80°C. Para las muestras sin filtrar se tomó el mismo número de ejemplares y se les hizo el mismo tratamiento.
- Previo a la realización de la prueba se sembró y verifico la pureza de las bacterias a utilizar. Se sembraron las BAL y ajustaron a escala MacFarland de 4 ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL)
- Posteriormente se sembraron en cajas petri con agar MRS y azul de anilina, a concentraciones de 50, 75 100 y 150 µL, se llevó a incubar por 24 horas a 37°C.
- Posterior a esto se procedió a ajustar la bacteria patógena a escala Mac Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ bact/mL) y sembró en cajas petri con agar agar TSA (Tryptona Soja Agar)
- A continuación de las muestras sembradas a diferentes concentraciones se procedió a tomar discos de agar con la bacteria en masa colocándolos en el agar TSA previamente impregnado con la bacteria patógena. Los discos se los tomo con un asa bacteriológica estéril.
- Se llevó las cajas de petri sembradas con la bacteria patógena y los discos de agar con la bacteria láctica a incubar a 37°C por 12 horas
- Trascorridas las 12 horas se procedió a medir los halos formados. La distancia se midió desde el borde de la bacteria láctica hasta el borde o extremos del

halo. Un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena

Técnica por difusión en agar con discos impregnados:

- De las muestras que se obtuvieron del sobrenadante sin filtrar y filtrado con los diferentes tratamientos se procedió a adicionar 50, 75 100 y 150 μ L del sobrenadante, impregnado en discos de papel filtro
- Se ubicó en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido el inóculo de la cepa patógena; cuando se coloca el disco impregnado en el agar, la sustancia capta humedad y se difunde radialmente hacia afuera del agar, formándose así un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.
- Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano en torno al disco, se forma un anillo claro; cuanto más ancha es la zona que rodea el disco, más sensible es el patógeno. El diámetro del anillo es también función de la concentración inicial del sobrenadante

Procedimiento:

La prueba tiene relación directa con el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, ya que la metodología corresponde a las especificaciones dichas anteriormente así:

- Con un asa, se toman de cuatro a cinco colonias de la cepa patógena a analizar que se inoculan en un caldo de cultivo; este se incuba 37° C hasta que tome turbidez y se diluye hasta lograr una turbidez igual a la escala de 0.5 McFarland.
- La bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis* se cultivó de un medio solido a medio líquido en caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) llevándose a incubación por 24 horas a 37°C.
- Se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión y se inocula con este en forma homogénea toda la superficie de un agar. Una vez que se ha secado la superficie de este, aproximadamente unos cinco minutos, se colocan sobre ella los discos con el sobrenadante en estudio con pinzas estériles. La placa se incuba a 37° C por 12 horas; transcurrido este tiempo se miden los diámetros de inhibición en milímetros desde el centro del disco de inhibición. Para la evaluación de este método se utilizó agar Triptica soja.

Método de difusión en cilindro plástico

- Este método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras con la bacteria patógena ajustada a escala 0.5 McFarland y sembrada en cajas petri con agar TSA, empleando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro.
- El número de pozos depende del halo de inhibición esperado. La base de cada pozo se sella con 0.05 mL (50 µl) de agar nutritivo derretido,
- En seguida se procedió a depositar sobre estos cilindros plásticos diferentes cantidades del sobrenadante a razón de 50, 75, 100 y 150µl. de las muestras filtradas y sin filtrar con los tratamientos ya mencionados.
- Finalmente y sin invertir las cajas se dejaron incubar por 12 horas a 37°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.

Método de difusión en pozos con doble capa modificado

En cajas preparadas con agar TSA se realizaron 3 pozos empleándose la boca de una punta estéril de 8 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 indicada del sobrenadante filtrado y sin filtrar con los tratamientos descritos. (50, 75,100 y 150µl).
- 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 37°C por 12 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 F. Preparación Medio PRO

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 medio 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

Se estableció la cantidad a preparar, se procedió a pesar las materias primas y se depositaron en 2 erlenmeyer, la mitad del volumen total de agua destilada en cada uno con diferentes mezclas de la siguiente manera:

1. salvado de trigo + azúcar blanco se auto clavó durante 15 minutos a 121°C
2. leche de soya +leche en polvo se esterilizó a 121°C por 1 minuto

Finalmente se mezclaron en un solo recipiente evitando contaminación y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C.

Anexo G. 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 H₂SO₄ al 10%. La vidriería para las dosificaciones como para las diluciones deben estar previamente lavadas con H₂SO₄ 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 H₂SO₄ al 96% en un balón aforado y conservarlo cubierto con papel aluminio.

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

Solución estándar: De la solución madre 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.

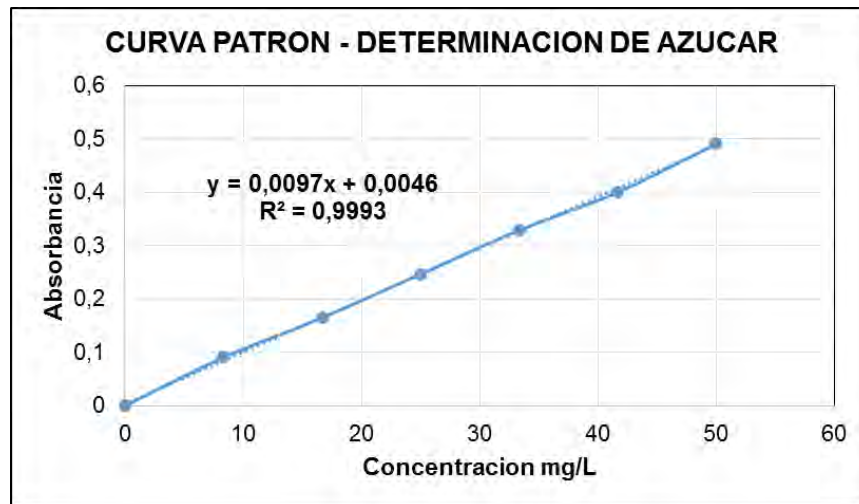
Adición de la Antrona

- 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 correspondiente a la densidad óptica entre 0 y 1, si esta requiere se debe diluir.
- A continuación 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 deposita en un tubo de ensayo (lavado previamente con H₂SO₄ al 10% durante toda la noche).
- Posteriormente a esta muestra de 2,5 ml se le deposita 5 ml de la solución de antrona ya preparada anteriormente y se sigue el mismo procedimiento que en la curva estándar.
- El blanco se prepara con 2,5 ml de agua destilada más 5 ml del reactivo de Antrona.

Anexo H. 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

Tabla 28. Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L

Tiempo	Concentración	Absorbancia
0	0	0
1	8,33	0,091
2	16,66	0,165
3	24,99	0,247
4	33,33	0,329
5	41,66	0,400
6	49,99	0,491

Anexo I. Lecturas de absorbancia para los medios MRS y PRO

Tabla 29. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de *Lactobacillus gasseri* en los medios MRS y PRO

Tiempo (horas)	Medios de cultivo			
	MRS		PRO	
	X	Y	X	Y
0	3,84	0,376	3,90	0,382
4	3,41	0,334	3,38	0,331
8	2,27	0,224	3,26	0,320
12	2,16	0,213	2,54	0,250
16	2,06	0,204	2,04	0,202
20	1,79	0,178	1,14	0,115
24	1,72	0,171	0,95	0,096

Tabla 30. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los medios MRS y PRO

Tiempo (horas)	Medios de cultivo			
	MRS		PRO	
	X	Y	X	Y
0	6,13	0,597	3,70	0,362
4	3,88	0,380	2,85	0,280
8	2,90	0,285	2,79	0,274
12	2,35	0,232	2,54	0,250
16	2,17	0,214	1,87	0,185
20	2,12	0,209	1,41	0,141
24	2,10	0,208	1,05	0,106

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 1/10000
 Medio Pro 1/10000

Anexo J. Determinación de Proteínas “método Lowry” modificado

Curva estándar: se estableció una curva de 0 a 0.3 mg/L. dentro de una serie de tubos de ensayo de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL de la solución de seroalbumina y se completó a 1mL con agua destilada.

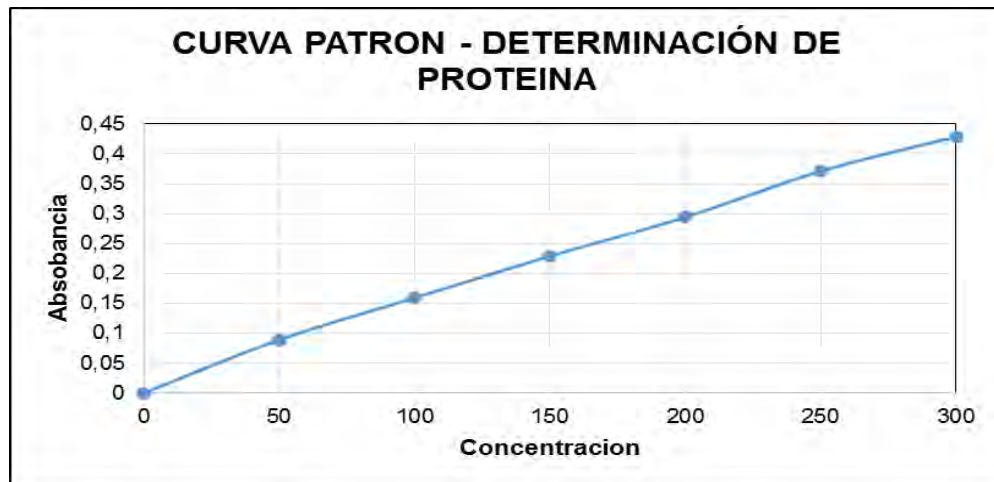
Método:

- Se ajusta 1 mL del patrón de la curva estándar y de las muestras
- Se adiciona 0.5 mL de NaOH 2N a todos los tubos
- Colocar en baño María a temperatura de ebullición durante 20 minutos
- Reposar en baño de agua fría
- Adicionar 0.5 mL de H_2SO_4 2.6 N
- Adicionar 0.9 mL de solución A
- Llevar por 10 minutos en la oscuridad
- En este momento de debe preparar la solución C y adicionar 3mL a la muestra problema de la siguiente manera:

$$\text{Volumen de Folin} = \frac{\text{Volumen a preparar}}{15 \text{ (sumatoria de la proporción 1:14)}} \times 14$$

- A continuación se lleva 10 minutos a baño María a 50°C
- Se Reposar en agua fría
- Finalmente se lleva a leer en espectrofotómetro las absorbancias a 750 nm

Calculo: los datos de absorbancia y concentración de la curva estándar, son graficados para obtener una regresión lineal donde el coeficiente de correlación no debe ser menor de 0.99, reordenar la ecuación en términos de concentración y sustituir las lecturas D.O obtenidas de las muestras problema, teniendo en cuenta de multiplicar por el factor de dilución.



Anexo K. Análisis de medidas repetidas en el tiempo, cinética de fermentación, pH, % ácido láctico, *L. gasseri* y *Lc. lactis*.

Tabla 31. Estructura de covarianza *L. gasseri*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	361,4
Sin estructura	368,3
Autoregresiva 1	365,3

Tabla 32. Análisis de varianza *L. gasseri*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	20,12	0,0109
TIEMPO	6	24	285,53	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	60,98	<.0001

Tabla 33. Comparación de medias por Tukey *L. gasseri*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	0,59	0,4567	ns
1	1	4,13	0,0198	*
2	2	1,59	0,9316	ns
3	3	-0,58	0,9867	ns
4	4	4,88	0,0034	ns
5	5	-1483	<.0001	*

6	6	-10,35	<.0001	*
---	---	--------	--------	---

Tabla 34. Estructura de covarianza *Lc. lactis*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	30,34
Sin estructura	29,39
Autoregresiva 1	29,33

Tabla 35. Análisis de varianza *Lc. lactis*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	1,93	0,2371
TIEMPO	6	24	38,59	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	8,25	<.0001

Tabla 36. Comparación de medias por Tukey *Lc. lactis*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	2,4	0,0246	*
1	1	3,26	0,0033	*
2	2	-3,82	0,008	*
3	3	-1,33	0,1972	ns
4	4	-1,25	0,2235	ns
5	5	0,62	0,5382	ns
6	6	-0,04	0,9673	ns

Análisis de medidas repetidas en el tiempo cinética de fermentación, pH *L. gasseri*

Tabla 37. Estructura de covarianza pH *L. gasseri*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	-29,9

Sin estructura	-30,1
Autoregresiva 1	-28,1

Tabla 38. Análisis de varianza pH *L. gasseri*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	6,44	0,0641
TIEMPO	6	24	179,12	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	10,04	<.0001

Tabla 39. Comparación de medias por Tukey pH *L. gasseri*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	-1,72	0,0982	ns
1	1	0,32	0,7516	ns
2	2	3,16	0,0042	*
3	3	1,2	0,2416	ns
4	4	-1,52	0,1414	ns
5	5	-4,16	0,003	*
6	6	-5,6	<.0001	*

Análisis de medidas repetidas en el tiempo cinética de fermentación pH *Lc. lactis*

Tabla 40. Estructura de covarianza pH *Lc. lactis*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	-66,8
Sin estructura	-67,4
Autoregresiva 1	-69,3

Tabla 41. Análisis de varianza por Tukey pH *Lc. lactis*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	41,43	0,003

TIEMPO	6	24	790,27	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	15,31	<.0001

Tabla 42. Comparación de medias por Tukey pH *Lc. lactis*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	-8,14	<.0001	*
1	1	-7,82	<.0001	*
2	2	-8,27	<.0001	*
3	3	-4,36	0,0002	*
4	4	-3,19	0,0039	*
5	5	-1,76	0,0913	ns
6	6	-1,56	0,131	ns

Análisis de medidas repetidas en el tiempo cinética de fermentación % ácido láctico *L. gasseri*

Tabla 43. Estructura de covarianza % ácido láctico *L. gasseri*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	-28,5
Sin estructura	-30,2
Autoregresiva 1	-29,4

Tabla 44. Análisis de varianza % ácido láctico *L. gasseri*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	6	1202,13	<.0001
TIEMPO	6	36	2344,49	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	36	21,4	<.0001

Tabla 45. Comparación de medias por Tukey % ácido láctico *L. gasseri*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	19,54	<.0001	*
1	1	14,25	<.0001	*
2	2	25,29	<.0001	*
3	3	24,14	<.0001	*
4	4	18,16	<.0001	*
5	5	18,62	<.0001	*
6	6	23,68	<.0001	*

Análisis de medidas repetidas en el tiempo cinética de fermentación % ácido láctico *Lc. lactis*

Tabla 46. Estructura de covarianza % ácido láctico *Lc. lactis*

Criterio de Información Bayesiano	
Simétrica compuesta	-140
Sin estructura	-141,1
Autoregresiva 1	-142,3

Tabla 47. Análisis de varianza % ácido láctico *Lc. lactis*

Efecto	Núm. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	6	374,4	<.0001
TIEMPO	6	36	298,48	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	36	132,9	<.0001

Tabla 48. Comparación de medias por Tukey % ácido láctico *Lc. lactis*

MRS	PRO	F	Pr >F	Significancia
0	0	13,49	<.0001	*
1	1	12,12	<.0001	*
2	2	-8,41	<.0001	*
3	3	4,01	0,0003	*
4	4	1,96	0,0583	ns
5	5	18,09	<.0001	*

6	6	26,4	<.0001	*
---	---	------	--------	---

Anexo L. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales *L. gasseri* y *Lc. lactis* en medios MRS y PRO

Tabla 49. Varianza y regresión para azúcares totales de *L. gasseri* en medio MRS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
MODELO	1	3,43700	3,43700	26,34	0,0037
ERROR	5	0,65237	0,13047		
TOTAL CORREGIDO	6	4,08937			

R-Cuadrado	Coef Var
0,8405	14,65

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	3,51536	0,24612	14,28	<,0001
Pendiente	1	-0,08759	0,01707	-5,13	0,0037

Tabla 50. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales *L. gasseri* en medio PRO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
MODELO	1	7,56080	7,56080	184,88	<,0001

ERROR TOTAL CORREGIDO	5	0,20448	0,04090
	6	7,76529	

R-Cuadrado	Coef Var
0,9737	8,22

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	4,01750	0,13780	29,16	<,0001
Pendiente	1	-0,12991	0,00955	-13,60	<,0001

Tabla 51. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales *Lc. lactis* en medio MRS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
MODELO	1	9,53556	9,53556	12,95	0,0156
ERROR TOTAL CORREGIDO	5	3,68119	0,73624		
	6	13,21674			

R-Cuadrado	Coef Var
0,7215	27,74

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	4,84357	0,58466	8,28	0,0004
Pendiente	1	-0.14589	0,04054	-3,60	0,0156

Tabla 52. Análisis de varianza y regresión para azúcares totales *Lc. lactis* en medio PRO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
MODELO	1	4,93080	4,93080	147,48	<,0001
ERROR	5	0,16717	0,03343		<,0005
TOTAL CORREGIDO	6	5,09797			<,0006

R-Cuadrado	Coef Var
0,9607	7,89

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	3,57464	0,12459	28,69	<,0001
Pendiente	1	-0,10491	0,00864	-12,14	<,0001

Anexo M. valores de pH, % de Ácido láctico, consumo de azúcares de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* durante la cinética de fermentación

Tabla 53. Valores de pH de *Lactobacillus gasseri*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
pH MRS	5,61	6,6	5,47	4,91	4,56	4,28	4,14
pH PRO	5,77	5,57	5,17	4,74	4,7	4,64	4,66

Tabla 54. Valores de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
pH MRS	5,42	5,46	5,17	4,80	4,53	4,40	4,32
pH PRO	5,85	5,88	5,56	4,98	4,66	4,48	4,41

Tabla 55. Porcentaje de ácido láctico de *Lactobacillus gasseri*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
% Acides MRS	0,58	0,56	0,6	0,65	0,92	1,16	1,34
% Acides PRO	0,24	0,25	0,5	0,55	0,77	0,87	0,8

Tabla 56. Porcentaje de ácido láctico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
% Acides MRS	0.39	0.49	0.55	0.71	0.78	0.87	0.97
% Acides PRO	0.17	0.33	0.28	0.45	0.59	0.67	0.71

Tabla 57. Consumo de azucares de *Lactobacillus gasseri*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
Azucars mg/L MRS	3,84	3,41	2,27	2,16	2,06	1,79	1,72
Azucars mg/L PRO	3,90	3,38	3,26	2,54	2,04	1,14	0,95

Tabla 58. Consumo de azucares de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Tiempo (Horas)	1 0	2 4:00	3 8:00	4 12:00	5 16:00	6 20:00	7 24:00
Azucars mg/L MRS	6,13	3,88	2,90	2,35	2,17	2,12	2,10
Azucars mg/L PRO	3,70	2,85	2,79	2,54	1,87	1,41	1,05