



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN MUESTRAS DE
LECHE CRUDA DE LA PARROQUIA SAN LUIS-RIOBAMBA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO/A FARMACÉUTICO/A

AUTORES:

INCA USHPA JOCELYNE LISSETH

MARTÍNEZ BALDA JOAO PAOLO

Riobamba-Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN MUESTRAS DE
LECHE CRUDA DE LA PARROQUIA SAN LUIS-RIOBAMBA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO/A FARMACÉUTICO/A

AUTORES: INCA USHPA JOCELYNE LISSETH

MARTÍNEZ BALDA JOAO PAOLO

DIRECTORA: Dra. ANA KARINA ALBUJA LANDI

Riobamba-Ecuador

2022

©2022, Jocelyne Lisseth Inca Ushpa & Martínez Balda Joao Paolo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotros, Jocelyne Lisseth Inca Ushpa y Martínez Balda Joao Paolo, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 01 de diciembre de 2022


Jocelyne Lisseth Inca Ushpa
CI: 160087800-1


Martínez Balda Joao Paolo
CI: 080216733-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA DE LA PARROQUIA SAN LUIS-RIOBAMBA**, realizado por las señoras: **JOCELYNE LISSETH INCA USHPA Y MARTÍNEZ BALDA JOAO PAOLO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Gallegos Núñez Janneth María PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022- 12- 01
Dra. Ana Karina Albuja Landi DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022- 12- 01
BQF. Adriana Isabel Rodriguez Basantes MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022- 12- 01

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada con mucho amor a ti mi Dios por haberme guiado por el mejor camino y ayudado a tomar las mejores decisiones. A mi madre Martina que me dio la oportunidad de vivir y a pesar de todas las circunstancias siempre me apoyó y me brindo su amor. A mi padre José que fue mi apoyo incondicional en todo momento, creyendo en mi capacidad y en mis habilidades de poder cumplir con todo lo que me propongo. A Jeimy, a mis hermanas y a Dannita, por demostrarme que el amor incondicional y sin barreras si existe.

Jocelyne

Esta tesis está dedicada con mucho amor a mi madre Wendy Paola Balda Boada por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros incluyendo este se lo debo a ella. A mi abuela Aura Boada por su sacrificio y esfuerzo, por darme una carrera y creer en mi capacidad. A mi padre Jorge Martínez y mi hermana Cytally Martínez quienes con sus palabras de aliento no me dejaban darme por vencido apoyándome para cumplir todos mis ideales. A mis compañeros y amigos presentes y pasados con quienes he compartido alegrías y tristezas y que durante todos estos años estuvieron a mi lado apoyándome.

Joao

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por ser mi pilar fundamental, haberme forjado como la persona que soy ahora, motivándome constantemente y apoyándome para alcanzar mis anhelos. A mi tutora Doctora Ana Albuja que con sus conocimientos y dulzura supo llegar a nosotros formando un equipo para poder cumplir con los objetivos de este trabajo. A mi compañero de tesis Joao Martínez, sinceramente las palabras quedarían cortas para agradecer todo tu apoyo como compañero, persona y amigo desde el inicio hasta el final. A la BQF Yolanda Buenaño por la guía y clave principal en el desarrollo del proceso experimental de este trabajo. A Danny, que puedo decir simplemente gracias por estos años y por el apoyo que me ha brindado para continuar y seguir con mi camino. A los docentes en general donde con sus palabras sabias, sus conocimientos rigurosos y precisos me supieron formar desde el inicio de la carrera.

Jocelyne

Quiero expresar mi profundo agradecimiento en primer lugar a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa la cual siempre ha creído en mí y me han enseñado a valorar todo lo que tengo.

A mi madre Wendy que ha sido uno de mis pilares ya que con su apoyo he podido salir adelante y ser una mejor persona. A mi segunda madre mi abuela Aura Boada ya que gracias a su esfuerzo y apoyo hoy culmino mis estudios para ser un profesional. A mi compañera de tesis Jocelyne Inca quien no solo ha sido mi compañera sino también mi amiga desde el inicio de la carrera y que juntos hemos podido sacar adelante este trabajo y de este modo logramos que este sueño se haga realidad. A mi tutora la Dra. Ana Albuja que nos apoyó con su conocimiento a lo largo de la realización de este trabajo de integración curricular dándonos pautas para que el mismo se terminara de la mejor manera. A la BQF. Yolanda Buenaño por su colaboración y guía durante la fase experimental de este proyecto. A los docentes de la ESPOCH quienes a lo largo de toda mi formación académica impartieron su conocimiento con el fin de que hoy sea un profesional.

Joao

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	2
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación	3
1.4. Objetivos	4

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes de investigación.....	5
2.2. Referencias teóricas	8
2.2.1. <i>Leche cruda</i>	8
2.2.1.1. <i>Composición química de la leche cruda</i>	9
2.2.1.2. <i>Contaminantes de la leche cruda</i>	10
2.2.1.3. <i>Requisitos de calidad de la leche cruda</i>	10
2.2.1.4. <i>Perspectiva para mejorar la calidad de la leche cruda</i>	12
2.2.2. <i>Bacterias ácido lácticas</i>	13
2.2.2.1. <i>Características morfológicas de las bacterias ácido lácticas</i>	13
2.2.2.2. <i>Clasificación de las bacterias ácido lácticas</i>	13

2.2.2.3.	<i>Principales géneros de bacterias ácido lácticas</i>	15
2.2.2.4.	<i>Bioquímica de las bacterias ácido lácticas</i>	20
2.2.2.5.	<i>Pruebas bioquímicas de aislamiento</i>	21
2.2.2.6.	<i>Beneficios de las bacterias ácido lácticas</i>	23
2.2.3.	Probióticos	23
2.2.3.1.	<i>Funciones de los probióticos</i>	25
2.2.3.2.	<i>Mecanismos de acción de los probióticos</i>	26
2.2.3.3.	<i>Interacción de probióticos con la microbiota intestinal</i>	27
2.2.3.4.	<i>Dosis de probióticos</i>	27
2.2.3.5.	<i>Directrices para evaluar los probióticos usados a nivel alimentario</i>	28
2.2.4.	Actividad probiótica	29
2.2.4.1.	<i>Ensayos para determinación de la actividad probiótica</i>	29

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	31
3.1.	Metodología de la investigación	31
3.1.1.	<i>Localización de la investigación</i>	31
3.1.2.	<i>Tipo y diseño de investigación</i>	31
3.2.	Diseño experimental	31
3.2.1.	<i>Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo</i>	31
3.2.2.	<i>Muestra</i>	31
3.2.3.	<i>Método de muestreo</i>	31
3.2.4.	<i>Criterios de inclusión</i>	32
3.2.5.	<i>Criterios de exclusión</i>	32
3.3.	Instrumentos de recolección de datos	32
3.3.1.	<i>Técnica para la recolección de las muestras</i>	32
3.3.2.	<i>Técnica de aislamiento y recuento por diluciones</i>	33
3.3.3.	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	33
3.3.5.	<i>Siembra y Aislamiento de BAL</i>	34

3.3.5.1.	<i>Siembra y Aislamiento de bacilos</i>	34
3.3.5.2.	<i>Siembra y aislamiento de cocos</i>	35
3.3.6.	<i>Pruebas bioquímicas para el aislamiento</i>	35
3.3.6.1.	<i>Tinción Gram</i>	35
3.3.6.2.	<i>Catalasa</i>	36
3.3.6.3.	<i>Oxidasa</i>	36
3.3.7.	<i>Pruebas de caracterización</i>	36
3.3.7.1.	<i>Prueba de movilidad</i>	36
3.3.7.2.	<i>Producción de CO₂ a partir de glucosa</i>	37
3.3.7.3.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	37
3.3.7.4.	<i>Tolerancia a cloruro sódico</i>	38
3.3.7.5.	<i>Tolerancia a distintos pH</i>	38
3.3.8.	<i>Pruebas de actividad probiótica</i>	39
3.3.8.1.	<i>Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares</i>	39
3.3.8.2.	<i>Capacidad hemolítica</i>	40
3.3.8.3.	<i>Resistencia a antibióticos</i>	40
3.3.8.4.	<i>Evaluación del efecto antagónico</i>	41
3.3.8.5.	<i>Técnica de conservación de las cepas con glicerol</i>	41
3.3.8.6.	<i>Aislamiento y caracterización de BAL</i>	42

CAPITULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1.	Análisis e interpretación de los datos	43
4.1.1.	<i>Selección de cepas aisladas de las muestras de leche cruda</i>	43
4.1.2.	<i>Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas</i>	43
4.1.3.	<i>Pruebas de caracterización</i>	47
4.1.4.	<i>Pruebas de actividad probiótica</i>	52
4.1.4.1.	<i>Capacidad hemolítica</i>	52
4.1.4.2.	<i>Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares</i>	53

4.1.4.3. <i>Resistencia a antibióticos</i>	55
4.1.4.4. <i>Evaluación del efecto antagónico</i>	56
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Microorganismos presentes en la leche cruda	8
Tabla 2-2: Composición química de la leche cruda	9
Tabla 3-2: Requisitos organolépticos para leche cruda.....	11
Tabla 4-2: Parámetros físico químicos de calidad en leche cruda	11
Tabla 5-2: Parámetros microbiológicos en leche cruda	12
Tabla 6-2: Géneros comunes de BAL y sus características diferenciales.....	16
Tabla 7-2: Principales probióticos utilizados en la industria	24
Tabla 8-2: Beneficios de los probióticos.....	26
Tabla 1-4: Colonias seleccionadas de las muestras de leche cruda.....	43
Tabla 2-4: Pruebas bioquímicas para la identificación de BAL en agar M17	44
Tabla 3-4: Pruebas bioquímicas para la identificación de BAL en agar MRS.....	45
Tabla 4-4: Pruebas de caracterización en agar M17	47
Tabla 5-4: Pruebas de caracterización en agar MRS	49
Tabla 6-4: Resultados de prueba de capacidad hemolítica	52
Tabla 7-4: Porcentaje de supervivencia a la simulación de tolerancia a jugos gástricos (pH 3)	54
Tabla 8-4: Porcentaje de supervivencia frente a la simulación de tolerancia a sales biliares	54
Tabla 9-4: Resultados de resistencia a antibióticos.....	55
Tabla 10-4: Evaluación del efecto antagónico	56
Tabla 11-4: Identificación mediante PCR de las bacterias BAL seleccionadas.	58

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2: Fermentación homoláctica en las bacterias.....	14
Ilustración 2-2: Fermentación heteroláctica en las bacterias.....	15
Ilustración 3-2: <i>Lactococcus lactis</i>	17
Ilustración 4-2: <i>Lactobacillus casei</i>	18
Ilustración 5-2: <i>Streptococcus spp.</i>	18
Ilustración 6-2: <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	19
Ilustración 7-2: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	19
Ilustración 8-2: <i>Enterococcus faecalis</i>	20
Ilustración 9-2: Mecanismo de la actividad probiótica	27
Ilustración 1-3: Técnica para la recolección de las muestras	32
Ilustración 2-3: Procedimiento para la preparación de medios de cultivo	33
Ilustración 3-3: Preparación de diluciones.....	34
Ilustración 4-3: Procedimiento de Siembra y Aislamiento de bacilos.....	34
Ilustración 5-3: Procedimiento de Siembra y Aislamiento de cocos.....	35
Ilustración 6-3: Procedimiento para la realización de tinción Gram.....	35
Ilustración 7-3: Determinación de la prueba de catalasa.....	36
Ilustración 8-3: Determinación de la prueba de oxidasa	36
Ilustración 9-3: Proceso de realización de la prueba de movilidad	36
Ilustración 10-3: Proceso de producción de CO ₂ a partir de glucosa	37
Ilustración 11-3: Proceso de determinación a diferentes temperaturas	37
Ilustración 12-3: Proceso de tolerancia al cloruro sódico.....	38
Ilustración 13-3: Proceso de tolerancia a diferentes pH.....	38
Ilustración 14-3: Proceso de simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares	39
Ilustración 15-3: Proceso para la realización de la capacidad hemolítica	40
Ilustración 16-3: Proceso para la prueba de resistencia a antibióticos	40
Ilustración 17-3: Proceso para evaluación de efecto antagónico.....	41
Ilustración 18-3: Proceso de conservación en glicerol	41

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS
- ANEXO C:** TÉCNICA DE PLAQUEO EN PLACA PETRI DE VIDRIO
- ANEXO D:** SIEMBRA CON ASA DE DRIGALSKY MEDIANTE TÉCNICA DE SUPERFICIE
- ANEXO E:** INCUBACIÓN POR 24-48H EN JARRAS GAS-PACK.
- ANEXO F:** CEPAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA
- ANEXO G:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO H:** PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN
- ANEXO I:** PRUEBAS DE ACTIVIDAD PROBIÓTICA
- ANEXO J:** REPORTE EMITIDO POR EL LABORATORIO IDGEM

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
MRS	Medio de cultivo de Man Rogosa Shape
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
S	Estreptomicina
E	Eritromicina
CIP	Ciprofloxacina
TE	Tetraciclina
V	Vancomicina
C	Cloranfenicol
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
UFC	Unidades formadoras de colonias
MDR	Multiresistencia bacteriana
PCR	Reacción en cadena de polimerasa

RESUMEN

El objetivo del trabajo de integración curricular fue determinar la actividad probiótica de bacterias ácido lácticas aisladas en muestras de leche cruda obtenidas en la parroquia San Luis de la ciudad de Riobamba, se recolectó las muestras mediante un método de muestreo por conveniencia a los productores de leche, se recolectaron 3 muestras y cada una de estas muestras fueron una mezcla de leches de distintos productores. Una vez recolectada la muestra se realizó la diluciones hasta 10^{-7} y se sembraron las últimas dos diluciones en agar M17 y MRS respectivamente, una vez evidenciado el crecimiento se procedió a realizar siembras sucesivas con el fin de aislar las colonias tanto de lactobacilos como de lactococos. Las bacterias se analizaron mediante pruebas bioquímicas y de caracterización para seleccionar las cepas que cumplieron con características fenotípicas propias de bacterias ácido lácticas (cocos y bacilos gram positivos, resistentes a cambios del entorno como temperatura, salinidad y pH). Como resultado se obtuvo que, al realizar las pruebas de capacidad probiótica, 8 de las 35 cepas aisladas tuvieron características útiles para su implementación como agente probiótico tales como supervivencia a jugos gástricos y sales biliares, hemólisis Gamma y su resistencia a antibióticos. De estas 8 cepas de bacterias ácido lácticas a 6 se le realizaron una prueba de PCR para su identificación dando como resultado: 5 colonias fueron identificadas como *Lactococcus lactis*; 1 colonia como *Lactococcus cremoris*. Como última prueba se evaluó el efecto antagónico de las cepas identificadas frente a: *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomona aeruginosa*; *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. Se concluyó que, ninguna de las seis colonias aisladas presentó antagonismo frente a los 5 patógenos analizados. Se recomienda fomentar la continuidad de la investigación realizando estudios posteriores de una mayor evaluación in vitro, al ser estas bacterias candidatas a probióticos.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA> <LECHE CRUDA> <ACTIVIDAD PROBIÓTICA>, <CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS> <BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA>.

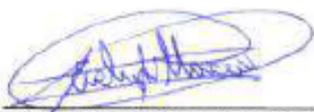
0162-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The main objective of this research study was to determine the probiotic activity of lactic acid bacteria isolated in raw milk samples obtained in the San Luis parish of the city of Riobamba. The samples were collected through a convenience sampling method from milk producers, 3 samples were collected and each of these samples was a mixture of milk from different producers. Once the samples were collected, dilutions were made up to 10^{-7} and the last two dilutions were sown on M17 and MRS agar, respectively. Once the growth was evident, successive sowings were made in order to isolate colonies of both lactobacilli and lactococci. The bacteria were analyzed employing biochemical and characterization tests to select the strains that complied with phenotypic characteristics typical of lactic acid bacteria (gram-positive cocci and bacilli, resistant to environmental changes such as temperature, salinity, and pH). As a result, when testing probiotic capacity, 8 of the 35 isolated strains had useful characteristics for their implementation as probiotic agents, such as survival to gastric juices and bile salts, Gamma hemolysis, and resistance to antibiotics. Of these 8 strains of lactic acid bacteria, 6 were subjected to a PCR test for identification, resulting in 5 colonies identified as *Lactococcus lactis*; 1 colony as *Lactococcus cremoris*. As a last test, the antagonistic effect of the identified strains was evaluated against *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Citrobacter freundii*, and *Klebsiella pneumoniae*. It was concluded that none of the six isolated colonies presented antagonism against the five pathogens analyzed. It is recommended to encourage the continuity of the research by carrying out subsequent studies of further in vitro evaluation, as these bacteria are candidates for probiotics.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <RAW MILK>, <PROBIOTIC ACTIVITY>, <PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS>, <LACTIC ACID BACTERIA>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

INTRODUCCIÓN:

La leche es un alimento altamente nutritivo que se puede ingerir de diversas fuentes animales como vacas, cabras y ovejas. Sin embargo, el alto contenido nutricional de esta leche, que incluye proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y su alta actividad de agua, proporciona un ambiente ideal para el crecimiento de muchos microorganismos. Los microorganismos presentes en la leche cruda pueden provocar la fermentación de la leche a través de la producción de lactato, que tiene diversos efectos sobre las propiedades sensoriales, de textura, sabor y organolépticas del producto resultante (Quigley et al., 2013: p.664-665).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un tipo de bacterias muy extensas en la naturaleza, donde se las clasifica como microorganismos "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS) porque no son patógenos, son adecuados para procesos tecnológicos e industriales, toleran ácidos y bilis y tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas estas son microorganismos muy codiciados para la elaboración de miles de alimentos fermentados entre los cuales podemos mencionar el queso y el yogurt, además de actuar como biopreservantes de tal forma que extienden la vida útil de los alimentos (Mosquera., 2022:p.6-8). Debido a este potencial probiótico las BAL son un objeto de estudio muy valioso para la industria tanto de alimentos como de farmacia.

Estas son una población dominante en la leche de vaca, cabra y oveja, antes de la pasteurización. Los géneros de BAL más comunes en la leche incluyen *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Quigley et al., 2013:p.664-665).

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que suministrados en cantidades adecuadas son una alternativa al uso de los antibióticos y otorgan beneficios para la salud del huésped (FAO/OMS., 200:p.1-8); (Brunser, 2017: p. 2).

Los probióticos son microorganismos vivos que aportan beneficios al huésped como lo son mejorar la digestión, fortalecer la inmunidad y también sirven como barrera para frenar las infecciones por bacterias patógenas por su efecto antagónico (Banerjee y Ray., 2017:p.3-4).

CAPÍTULO I

1 DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1 Antecedentes

La recurrencia de infecciones bacterianas debido al desarrollo de resistencia a los antibióticos (RAM) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Durante muchos años, los antibióticos convencionales han sido los medicamentos de primera línea para el tratamiento de infecciones de origen bacteriano. Pero debido al aumento de la multiresistencia bacteriana (MDR), la terapia con antibióticos estándar ha perdido su eficacia. La resistencia a los antimicrobianos (RAM) y la persistencia se asocian con un riesgo elevado de fracaso del tratamiento e infecciones recurrentes. Por lo tanto, son importantes impulsores del aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad, lo que resulta en un aumento de los costos de atención médica (González et al., 2019:p.3-5).

Esta resistencia a los antibióticos está relacionada principalmente a la automedicación por parte de la población debido a la falta de control en el expendio de medicamentos antibióticos y al mal uso que les da la población debido a que muchas veces el paciente compra parte del tratamiento, pero al sentir una mejoría después de las primeras dosis este suspende el tratamiento favoreciendo la aparición de una resistencia al medicamento antibiótico (Gamboa et al., 2022: p.2-6).

1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad debido al estilo de vida que lleva el ser humano se han presentado un sin número de problemas de salud entre los que podemos mencionar enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome de colon irritable, diarrea aguda, estreñimiento, hipertensión, diabetes además de enfermedades derivadas al uso de antibióticos y procesos alérgicos y se han buscado formas para poder mitigar los síntomas de estas enfermedades. Es aquí donde entra el uso de los alimentos funcionales para el tratamiento de estas enfermedades y entre estos alimentos funcionales podemos encontrar a los microorganismos probióticos que se han convertido en un tratamiento natural para estas patologías y que principalmente no conllevan efectos adversos a su consumo, entre los grupos de alimentos que tienen la presencia de estos microorganismos probióticos podemos mencionar a los productos lácteos destacando entre estos a la leche cruda y leches fermentadas (Ayyash, et al., 2018: p.478-479).

A nivel nacional la investigación, uso y aplicación de las cepas bacterianas con actividad probiótica se han dado casi exclusivamente a nivel de la industria agrícola en donde se usa estas

cepas como suplemento nutricional con el objetivo de inhibir ciertos agentes patógenos que puedan afectar al desarrollo de los animales de corral como lo son cerdos, pollos, ganado bovino e incluso en la industria camaronera (Sotomayor, et al., 2016: p.20-22); (Tapia, et al., 2015: p.30-34); (Álvarez, et al., 2020: p.86).

En el año 2011 se reportó un gasto estimado de 27,9 mil millones de dólares en la compra de probióticos a nivel mundial y se había estimado un incremento en su consumo para finales del año 2018 esperándose un gasto de 44,9 mil millones de dólares. Se ha pronosticado que debido a la gran demanda de probióticos a nivel mundial aumente llegando a generar un gasto de 83,5 mil millones de dólares para el año 2022 (TMC, 2017: p. 4-5).

1.3 Justificación

Las leches frescas o incluso las leches fermentadas de vaca son un producto consumido por la mayoría de la población a nivel mundial, en este producto se ha logrado evidenciar un alto recuento de bacterias ácidos lácticas (BAL) lo que lo convierte en una fuente para la exploración de materiales biológicos con una aplicación tanto para la salud pública como para la industria alimentaria y más específicamente en la industria láctea (Reuben et al., 2020: p. 1223-1224). El objetivo de este trabajo de titulación fue determinar la actividad probiótica de las cepas BAL obtenidas de muestras de leche cruda de vaca recolectada en la parroquia San Luis de la ciudad de Riobamba.

Para la realización de este trabajo de integración curricular se hizo una recopilación de información presente en artículos científicos extraídos de plataformas de divulgación científica como lo son PubMed y Elsevier donde se constató que si existen artículos relacionados con la caracterización y aislamiento de BAL con actividad probiótica a partir de leche cruda de vaca y en los distintos repositorios de las universidades del Ecuador como la ESPOCH en los que se pudo constatar que existen estudios relacionados con la identificación y aislamiento de bacterias con actividad probiótica pero ninguno referente a la evaluación de la actividad probiótica de cepas de BAL aisladas a partir de leche cruda por lo tanto el tema de investigación es novedoso e innovador debido a que aportaría información valiosa para el uso de estas cepas de BAL como un alimento funcional y así favorecer a la salud de la población.

La presente investigación tuvo como finalidad determinar la actividad probiótica de las BAL presentes en la leche cruda para lo cual se realizó un aislamiento de bacterias ácidos lácticas mediante métodos dependientes de cultivo en agar MRS y M17, luego de esto se procedió a la identificación de BAL mediante el uso de pruebas bioquímicas, una vez aisladas e identificadas las cepas de interés se llevaron a cabo las pruebas de actividad probiótica como: simulación de

tolerancia a jugos gástricos y sales biliares, hemólisis, resistencia a antibióticos y evaluación del efecto antagónico frente a agentes patógenos.

Este trabajo de integración curricular no formó parte de ningún proyecto de investigación vigente en la ESPOCH, pero se derivó de los resultados de un proyecto ya culminado en el cual se identificaron y aislaron cepas de BAL, presentes en leche cruda y queso de leche cruda por lo tanto este trabajo complementó estos resultados para futuras publicaciones.

1.4 Objetivos

General

- Determinar la actividad probiótica de bacterias ácido-lácticas aisladas en muestras de leche cruda obtenidas en la parroquia San Luis de la ciudad de Riobamba.

Específicos

- Aislar bacterias ácido-lácticas presentes en muestras de leche cruda mediante los métodos dependientes de cultivo en agar MRS y M17.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas y de caracterización las colonias aisladas de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Lactococcus*.
- Realizar las pruebas de actividad probiótica (simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares, hemólisis, resistencia a antibióticos y evaluación del efecto antagónico).

CAPITULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

Las bacterias ácido lácticas cumplen un papel importante en el proceso de fermentación, por lo cual, son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos por su capacidad para acidificar y preservar los alimentos, además, mejoran la textura, olor y sabor de los productos. Estas bacterias producen como principal metabolito el ácido láctico y se consideran microorganismos nutricionalmente exigentes por su capacidad para hidrolizar los péptidos de las muestras de leche (Parra, 2010, p. 94).

Estas bacterias tienen la capacidad de ser probiótico, es decir, cultivos puros o la mezcla de cultivos de distintos microorganismos, que al ser aplicados a los individuos o animales aportan beneficios a la salud del huésped, mejorando enfermedades a nivel del tracto gastrointestinal, modulando el sistema inmunológico, además, se usa en casos de intolerancia a la lactosa, disminuye el colesterol, reduce la hipertensión, es útil en casos de cáncer etc., (Ramirez et al., 2018, p. 10).

Una investigación publicada por el American Dairy Science Association, en donde se realizó la caracterización de BAL potencialmente probióticas y bifidobacterias aisladas del calostro humano. Se aislaron 197 cepas de 40 muestras de calostro humano de mujeres de nacionalidad Mongol. Las bacterias aisladas abundaban *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se seleccionaron a 2 cepas las cuales presentaron tolerancia a ácidos y sales biliares. Con base en sus características fisiológicas y bioquímicas y los resultados del análisis de la secuencia del ARNr 16S, las 2 cepas se identificaron como *B. lactis* Probio-M8 y *L. rhamnosus* Probio-M9, respectivamente (Liu, et al., 2020: p. 102-105).

Una publicación del Journal of Dairy Science en el 2020 presenta una investigación en donde se evaluó la capacidad probiótica de las cepas de BAL aisladas de muestras de leche fresca de vaca y cabra de la localidad de Jashore, Bangladesh. De los 63 aislamientos de BAL examinados para detectar actividad antagonista contra 6 patógenos probados (*Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, solo 13 inhibieron estos patógenos en diversos grados. Las cepas aisladas mostraron una mayor actividad principalmente contra *E. coli*. La actividad contra *L. monocytogenes* (por cepas de BAL de leche de vaca), *E.*

faecalis y *Salmonella entérica* (por cepas de BAL de leche de cabra) fue la menos registrada (Reuben et al., 2020: p. 1223-1224).

En un trabajo experimental publicado por LWT - Food Science and Technology y realizado en los Emiratos Árabes Unidos se determinó que las BAL aisladas y seleccionadas de la leche cruda de camello exhibieron importantes características probióticas que los convierten en candidatos prometedores para producir alimentos funcionales con posibles beneficios para la salud. Las BAL identificadas en este estudio exhibieron porcentajes altos de eliminación de colesterol, capacidad para inhibir patógenos, tolerancia razonable a los ácidos y la bilis y sensibilidad a los antibióticos sin hemólisis (Ayyash, et al., 2018: p. 478-485).

En Valencia en el 2018, una investigación sobre “Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra”, determinó que, las principales bacterias encontradas fueron *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii lactis*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*, de las cuales el 56% presentaron actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* y *Salmonella spp.*, presentaron adhesión a la mucina y sensibilidad a amoxicilina, ceftriaxona, cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina, sin embargo, únicamente *L. paracasei* en condiciones in vitro presentó todas las características probióticas como inhibición a patógenos, adhesión a la mucina y resistió a las condiciones gastrointestinales en diferentes tiempos (Amarocho, 2018, p. 189).

Otro estudio realizado en Madrid en el 2019 sobre “Bacterias probióticas en leche fermentada, viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales”, menciona que, las especies encontradas fueron *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus casei*, además, se determinó la viabilidad en base al método de PCR en tiempo real, obteniendo una viabilidad aceptable en los 28 días de vida útil del producto, sin embargo, sólo *L. acidophilus* presentó alta producción de ácido láctico y secretó bacteriocina para inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* (Tabasco, 2019, p. 165).

Un estudio realizado por la dirección de investigación y posgrado de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco se aislaron 20 BAL, y caracterizar e identificar las seis BAL con mayor potencial acidificante, característica importante para la elaboración del “queso crema tropical” tradicionalmente fabricado con leche bronca. Por sus características morfológicas y bioquímicas, estas bacterias pudieron considerarse como pertenecientes al género *Lactobacillus*. La caracterización de las BAL se hizo con una combinación de las pruebas morfológicas, metabólicas

y fisiológicas y por métodos moleculares, que estuvieron basados en la secuenciación del 16s DNAr (Ramos, et al., 2009: p 15-17).

En Uruguay en el 2020 se realizó un estudio sobre “Selección de bacterias ácido lácticas y adjuntas de leche y queso, para el control de *Clostridium spp*”, donde se determinó que, se aislaron 130 cepas de las cuales 56 presentaron actividad antibacteriana contra *C. tyrobutyricum*, siendo más prevalentes *L. casei* con actividad anticlostridial y *L. delbrueck* con potencial bacteriocina, las cuales fueron resistentes a la lisozima, por lo que no serían afectadas por los niveles de lisozimas presentes en el queso y la leche (Olivera, 2018, p. 130).

Otra investigación realizada en Venezuela en el 2017 sobre “Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico”, evaluó 72 cepas de bacterias, identificando a *Lactococcus spp*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp*, *Leuconostoc spp*, y *Streptococcus spp*. De las bacterias evaluadas, 14 cepas presentaron potencial probiótico debido a la obtención de buenos resultados en las pruebas de hidrofobicidad con solventes como el xileno y hexadecano, inhibición a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, además, fueron resistentes al pH ácido y presentaron buen tiempo de autoagregación, lo cual se relaciona con la capacidad de adhesión de las bacterias al epitelio intestinal (Sánchez y Tromps, 2014, p. 125)

Mediante la búsqueda de información en distintos repositorios de universidades de Ecuador como la Universidad Central del Ecuador y la ESPOCH donde se constató que si existen investigaciones en las que se evaluó la actividad probiótica de BAL presentes en distintas muestras como lo son las BAL aisladas a partir de heces fermentadas de *Gallus gallus* y de otras aves de corral (Chasi, 2015: p. 20-30); (Salas., 2012: p. 10-15).

También se encontraron trabajos relacionados con la evaluación de la resistencia antimicrobiana en muestras de queso en la zona rural de Riobamba (Albujá, et al 2018: p. 20-26), evaluación de la resistencia antimicrobiana en muestras de leche cruda del recolectada en el mercado San Alfonso (Lascano, et al., 2016: p. 10-12) y del efecto bactericida de cepas de *Lactobacillus sp* frente a distintos agentes patógenos (Torres., 2013: p. 2-5), pero ninguna en la que se haya realizado el aislamiento y evaluación de la actividad probiótica de las BAL en leche cruda y aún menos dentro de la zona delimitada para el desarrollo de este trabajo de titulación.

2.2 Referencias teóricas

2.2.1 Leche cruda

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente de alimento, ya que, constituye una fuente nutritiva, no superada por ningún otro conocido por el ser humano. Esto se puede evidenciar en la presencia de la leche y de sus derivados en la dieta de la mayoría de las poblaciones a nivel mundial siendo este un pilar fundamental en la nutrición humana en cada una de las etapas de desarrollo del individuo (González, et al 2010: p. 1-2).

La leche constituye una fuente importante de nutrientes para la población, sin embargo, por su composición constituye un medio propicio para el desarrollo de microorganismos patógenos. Además, las actividades de ordeño, almacenamiento y transporte implican riesgos de contaminación por contacto con el hombre o el entorno y por ende la proliferación de patógenos endógeno.

La leche cruda proviene de animales como vacas, cabras, ovejas, entre otros, y es un producto que no ha sido sometido al proceso de pasteurización, para destruir a las bacterias dañinas. Se considera que esta leche puede portar bacterias patógenas y peligrosas para la salud como es el caso de *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, etc., las cuales son responsables de causar enfermedades alimentarias conocidas como "intoxicaciones de tipo alimentario" (FDA, 2020, p. 2).

De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se han registrado alrededor de 127 brotes de enfermedades a causa de la ingesta de leche cruda o de algún producto lácteo elaborado con esta leche como quesos, helados, yogur, entre otros. En el 2020 se registraron en Estados Unidos 1909 enfermedades y 144 hospitalizaciones por intoxicación con este producto. (FDA, 2020, p. 2):

Tabla 1-2: Microorganismos presentes en la leche cruda

Bacterias con alerta alimentaria	Bacterias que permiten la fermentación láctica	Bacterias que deterioran la leche
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus spp</i>	<i>Clostridium spp.</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Propionibacterium spp.</i>	
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Brucella abortus</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		

Fuente: Aguilera, et al. 2014.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

Según la normativa Ecuatoriana NTE INEN 9 se define a la leche como el producto de la secreción normal de las glándulas mamarias de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción (NTE INEN 9, 2015: p. 1-2).

Esta misma normativa define como leche cruda a Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento (es decir que la temperatura no haya superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre - no más de 40°C) o no haya sufrido tratamiento térmico, salvo el de enfriamiento para su conservación, ni ha tenido modificación alguna en su composición (NTE INEN 9, 2015: p. 1-2).

2.2.1.1 Composición química de la leche cruda

La composición química en la leche cruda va en dependencia de factores como la raza, alimentación, edad, época del año, periodo de lactancia y del sistema de ordeño de la vaca. La composición del producto se presenta a continuación (Llumán y Rmírez, 2020, p. 7):

Tabla 2-2: Composición química de la leche cruda

Parámetro	Valor (en 100 Gramos de leche)	Unidad
Agua	87,70	g
Lactosa	4,70	g
Lípidos	3,60	g
Caseína	2,70	g
Proteínas del suero	0,42	g
Nitrógeno no proteico	0,18	g
Vitaminas	0,20	g
Enzimas	0,10	g
Sodio	50	mg
Potasio	50	mg
Calcio	20	mg
Magnesio	12	mg
Fósforo	95	mg
Hierro	0,40	ppm
Cobre	0,22	ppm
Zinc	4,19	ppm

Fuente: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2010.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

2.2.1.2 Contaminantes de la leche cruda

Las muestras de leche cruda pueden presentar contaminantes tanto químicos como microbiológicos que afectan la calidad del producto como se indica a continuación (Martínez et al., 2017, p. 55).

- Contaminantes químicos

Ciertos contaminantes químicos como residuos de detergentes, medicamentos, desinfectantes, micotoxinas, plaguicidas etc., pueden pasar al animal, se acumulan a nivel del tejido adiposo y son eliminadas por las secreciones, como por ejemplo la leche. Dentro de las fuentes de contaminación se encuentran los factores relacionados con la alimentación, medio ambiente, manejo productivo-sanitario o la exposición a agentes contaminantes como roedores e insectos y roedores (Martínez et al., 2017, p. 55).

- Contaminantes microbiológicos

La contaminación de leche con microorganismos surge por la presencia de bacterias en la ubre, organismos que se encuentran en el ambiente y son transferidos por la suciedad de los pezones o la ubre y también por la deficiente limpieza de los utensilios y del equipo de ordeño. Es común detectar la presencia de bacterias como termófilas, mesófilas y psicrótrofas, en altos niveles, con refrigeración a una temperatura mayor a 4°C. Dentro de las principales bacterias patógenas asociadas a enfermedades de transmisión por alimentos se encuentra *Escherichia coli*, *Campylobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*. En la actualidad la bacteria *Mycobacterium bovis* se ha convertido en uno de los microorganismos reemergente al contaminar la leche (Martínez et al., 2017, p. 55).

2.2.1.3 Requisitos de calidad de la leche cruda

De acuerdo con la norma NTE INEN 9 sobre requisitos de la leche cruda, este producto se debe obtener de vacas libres de enfermedades infecciosas y deberá presentar un aspecto normal, libre de sangre o calostro. Además, después del ordeño se debe refrigerar la leche a una temperatura de 4°C con agitación constante (NTE INEN, 2015, p. 2).

- *Requisitos organolépticos*

Dentro de los requisitos organolépticos de la leche cruda se encuentran los siguientes (NTE INEN, 2015, p. 2):

Tabla 3-2: Requisitos organolépticos para leche cruda

Parámetro	Característica
Olor	Debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.
Color	Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento
Aspecto	Debe ser homogéneo, libre de materias extrañas.

Fuente: NTE INEN 9, 2015.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

- *Requisitos físico químicos*

Dentro de los requisitos físico químicos de la leche cruda destacan los siguientes (NTE INEN, 2015, p. 3):

Tabla 4-2: Parámetros físico químicos de calidad en leche cruda

Requisito	Unidad	Min	Max	Método de ensayo
Densidad relativa a 15 °C	g/ml	1,029	1,032	NTE INEN 11 NTE INEN-ISO 2446
a 20 °C		1,030	1,033	
Materia grasa	% ¹	3	-	NTE INEN 13
Acidez titulable como ácido láctico	%	0,13	0,17	NTE INEN 14
Sólidos totales	%	11,2	-	*
Sólidos no grasos	%	8,2	-	NTE INEN 14
Cenizas	%	0,65	-	NTE INEN-ISO 5764
Punto de congelación	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 16
Proteínas (N*6,38)	%	2,9	-	NTE INEN 18
Ensayo de reductasa (azul de metileno)**	h	4	-	
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pasteurización, no se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en masa o 75 % en volumen. Para la leche destinada a ultra pasteurización, no se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en masa o 78 % en volumen.			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes ²	-	Negativo	-	NTE INEN 1500

Presencia de neutralizantes ³	-	Negativo	-	NTE INEN 1500 NTE INEN 1500 y NTE INEN 2401
Presencia de adulterantes ⁴	-	Negativo	-	2401

Fuente: NTE INEN 9, 2015.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

- *Requisitos microbiológicos*

Dentro de los requisitos microbiológicos de la leche cruda destacan (NTE INEN, 2015, p. 3):

Tabla 5-2: Parámetros microbiológicos en leche cruda

Microorganismo	Caso	N	c	m	M	Método de ensayo
Recuento de colonias aerobias	2 ^a	5	2	2 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	NTE INEN 1529-5
Enterobacteriaceae (UFC/g)	6 ^b	5	1	10	10 ²	NTE INEN-ISO 21528-2
S. aureus	7 ^c	5	2	10	10 ²	NTE INEN 1529-14
Recuento de células somáticas/ml			< 5 x 10 ⁵			ISO 13366-1

n= Numero de muestras a analizar

m= Limite de aceptación

M= Límite superando el cual se rechaza

c= Número máximo de muestras admisibles con resultados entre m y M.

2^a= Utilidad: contaminación general, vida útil reducida en percha, deterioro incipiente

6^b= Indicador: riesgo bajo e indirecto

7^c= Riesgo moderado: directo, propagación limitada

Fuente: NTE INEN 9, 2015.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

2.2.1.4 *Perspectiva para mejorar la calidad de la leche cruda*

En varios países se hace énfasis en realizar los controles de los parámetros de calidad en la leche cruda como el conteo total bacteriano, índice crioscópico y el conteo de células somáticas, con el fin de determinar si el producto se ajusta a las normas de calidad. Además, es importante establecer actividades de orientación y educación a los productores con el fin de establecer técnicas de producción como las siguientes (Calderón, 2017, p. 8):

- Buen manejo zootécnico
- Adecuado manejo nutricional de los animales
- Limpieza de las instalaciones de ordeño

- Limpieza de utensilios de ordeño
- Limpieza de los ordeñadores

2.2.2 *Bacterias ácido lácticas*

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están distribuidas ampliamente en el ecosistema y se utilizan a gran escala a nivel de las industrias alimentarias para producir bebidas alcohólicas, alimentos fermentados, levaduras para la cerveza, vinos, fermentaciones cárnicas, elaboración de yogurt, queso, mantequilla, salchichas, pan, cereales, entre otros, mejorando las características nutricionales y sensoriales de los productos (Parra, 2010, p. 95-96).

2.2.2.1 *Características morfológicas de las bacterias ácido lácticas*

Son bacterias Gram positivas, no forman esporas, no poseen movilidad y dan catalasa negativa, tienen forma de cocos o bacilos con una longitud variable y su grosor va de 0,5 a 0,8 micras. Estos microorganismos se caracterizan por ser anaerobios facultativos ya que carecen de actividad respiratoria debido a la ausencia de la enzima citocromo catalasa, además, existen varios factores que influyen el crecimiento de las bacterias como la temperatura que condiciona su velocidad de crecimiento. Sus colonias son de tono blanco lechoso y forma circular convexa (Parra, 2010, p. 96). Estas bacterias se consideran como microorganismos microaerófilos ya que se caracterizan por tolerar bajos rangos de pH lo que les permite superar a otros tipos de bacterias en el proceso de fermentación natural, debido a que resiste el incremento de acidez porque produce el ácido láctico (Vargas, 2018, p. 14).

2.2.2.2 *Clasificación de las bacterias ácido lácticas*

Las bacterias ácido lácticas pertenecen al filum *Firmicutes* y engloba alrededor de 20 géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, entre otros, destacando *Lactobacillus* al ser el género más grande. Estas bacterias se clasifican según la temperatura de crecimiento en termófilas (temperatura de incubación de 40-45°C por 4 horas), tienen un volumen de cultivo del 2-3% y acidez final de 0,9% de ácido láctico como por ejemplo *Lactobacillus* y *Streptococcus*, mientras que, las bacterias mesófilas (temperatura de incubación de 20-25°C por 18-20 horas), con volumen de cultivo del 1-2%, tienen una acidez final de 0,8% de ácido láctico como por ejemplo *Lactococcus* y *Leuconostoc* (Parra, 2010, p. 97).

Según la fermentación de la lactosa, pueden ser bacterias homofermentativas y heterofermentativas (Parra, 2010, p. 98).

- *Homofermentativas*

Este grupo de bacterias produce únicamente ácido láctico, ya que convierte la glucosa en dos moles de ácido láctico, produciendo más del 85% de este compuesto. Estas bacterias poseen las enzimas aldolasa, hexosa isomerasa y carecen de fosfoacetolasa. En este grupo destacan las siguientes bacterias: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Ramírez y Vélez, 2018, p. 116):

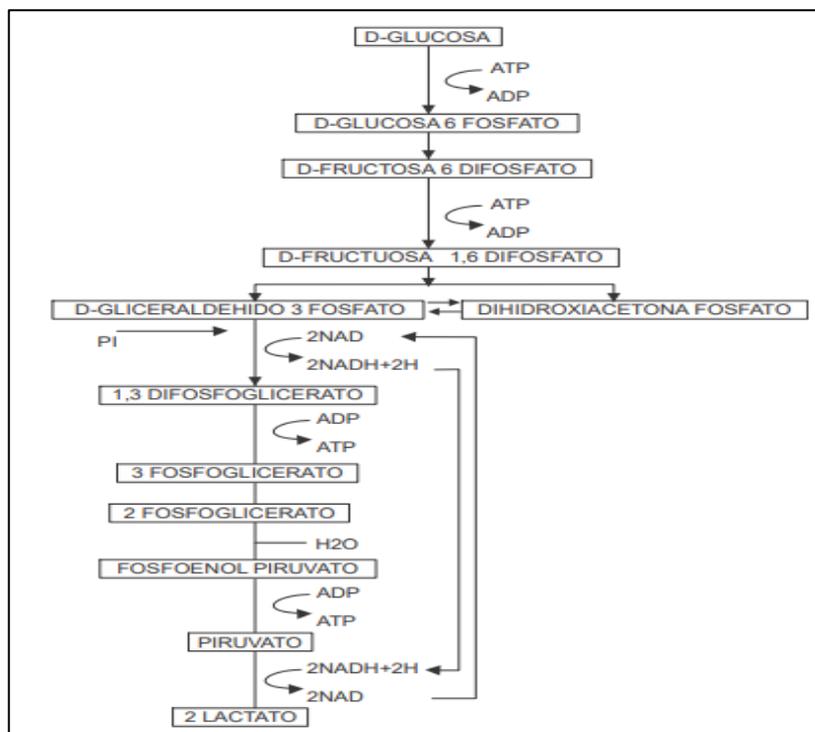


Ilustración 1-2: Fermentación homoláctica en las bacterias

Fuente: Parra, 2010, p. 96.

- *Heterofermentativas*

Son bacterias que producen únicamente 50% de ácido láctico, produciendo en la fermentación ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Poseen la enzima fosfoacetolasa y carecen de la aldolasa y hexosa isomerasa, por lo cual, en la fermentación usan la vía de la pectosa o la hexosa monofosfato. En este grupo destacan los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

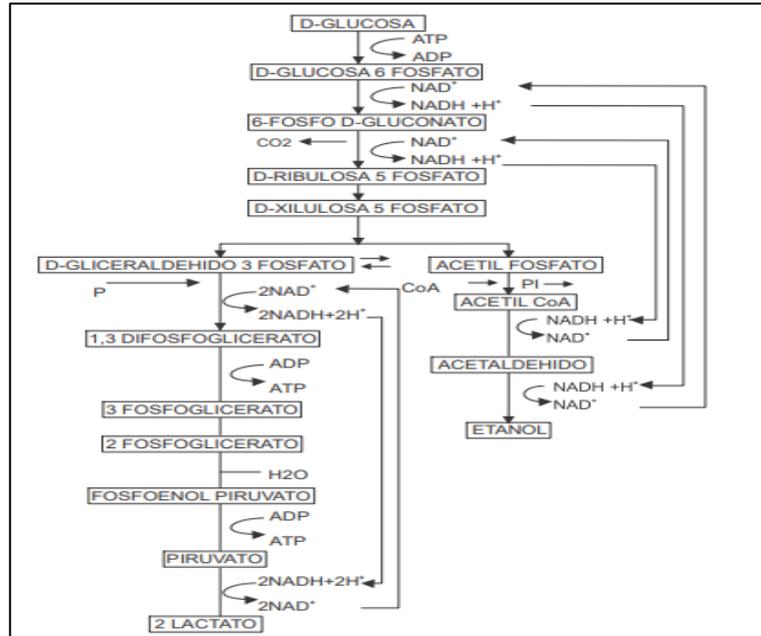


Ilustración 2-2: Fermentación heteroláctica en las bacterias

Fuente: Parra, 2010, p. 97.

2.2.2.3 Principales géneros de bacterias ácido lácticas

La mayoría de los probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) siendo los géneros más relevantes: *Streptococcus spp*, *Lactococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*, *Pediococcus spp* y *Bifidobacterium spp*. En la tabla se pueden evidenciar los géneros más comunes de BAL junto con sus características diferenciales.

Tabla 6-2: Géneros comunes de BAL y sus características diferenciales.

Características									
Familia	Género	Forma	CO2 de la glucosa	Crecimiento a 10° C	Crecimiento a 45° C	Crecimiento en 6.5% de NaCl	Crecimiento en 18% de NaCl	Crecimiento a pH 4.4	Crecimiento a pH 9.6
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	-	-	+
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-	ND	-	ND	-
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+	+	-	+	+
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	+	Variable	+
	<i>Vagococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	variable	variable	variable	variable	-	variable	-
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	variable	variable	variable	-	+	-
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos ^a	+	+	-	variable	-	variable	-
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	variable	-
	<i>Weissella</i>		+	+	-	Variable	-	variable	-
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	variable	-
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-

Notas: ND, no determinado. Algunas cepas de *Weissella* tienen forma bacilar.^b En la literatura antigua los lactococos se conocían como *Streptococcus* del grupo N.

Realizado por: Inca Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

Fuente: Vargas, 2018.

- *Lactococcus*

Son bacterias anaerobias facultativas que se caracterizan por ser esféricas con un tamaño entre 0,5-1,2 micras, agrupadas en cadenas cortas o pares. A este grupo pertenecen siete especies (*L. lactis*, *L. fujiensis*, *L. chungangensis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. piscium* y *L. raffinolactis*) que no son formadoras de esporas, no tienen movilidad y toleran las variaciones de pH, temperatura de crecimiento y sal (Rebello et al., 2016, p. 22).

El mayor referente es *Lactococcus lactis* por su aplicación en la industria láctea, usado para la fermentación de productos como quesos y yogures. Estas bacterias crecen en la leche y producen alta cantidad de ácido láctico y de bacteriocinas (sustancias peptídicas que inhiben el crecimiento de otras bacterias (Rebello et al., 2016, p. 22).

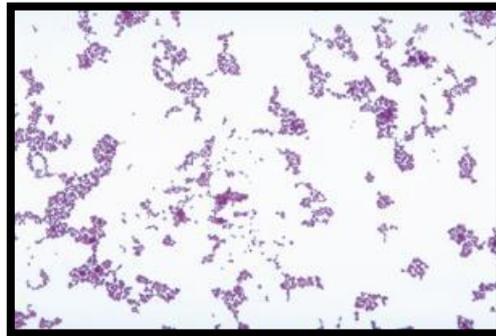


Ilustración 3-2: *Lactococcus lactis*

Fuente: Corrales, L, 2012, p.174.

- *Lactobacillus*

Son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas o microaerófilas y no producen esporas. Algunas especies son homofermentativas y otras son heterofermentativas, además, son aerotolerantes, por lo cual, se usan a nivel de la industria alimentaria para elaborar productos fermentados como el yogurt o el queso. Dentro de este grupo destacan las siguientes bacterias *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* y *L. plantarum* (Cabezas, 2019, p. 7).

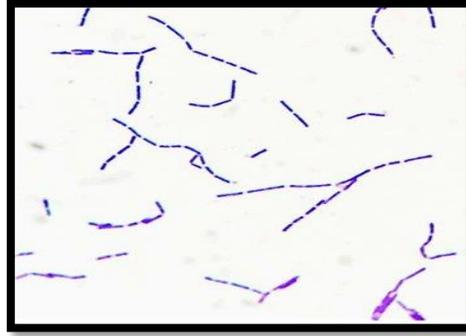


Ilustración 4-2: *Lactobacillus casei*
Fuente: Jones, p.100

- *Streptococcus*

Son bacterias esféricas Gram positivas, de tipo anaerobias facultativas, no poseen movilidad y generalmente están agrupadas formando cadenas de dos. Se considera que la identificación de este grupo por métodos convencionales es difícil por lo cual, se realiza una determinación serológica o se mide su capacidad hemolítica (alfa si tienen hemólisis incompleta, beta si realiza una lisis total o gamma son no hemolíticos). Estas bacterias producen toxinas como proteasas, hemolisinas o superantígenos que favorecen su colonización y multiplicación en el huésped. Dentro de este grupo destacan las siguientes bacterias *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y dentro de los enterococcus se encuentra *E. faecalis* y *E. faecium* (Santos, 2019, p. 39).

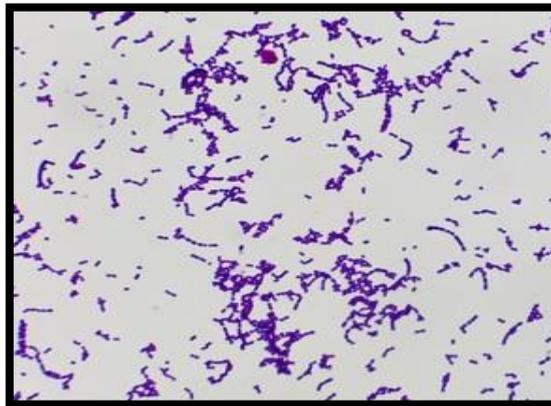


Ilustración 5-2: *Streptococcus spp.*
Fuente: INSST, p.1

- *Propionibacterium*

Son bacterias Gram positivas, anaerobias en su mayor parte, son mesófilas al tener una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C y no tienen movilidad. En el proceso de fermentación propionato, acetato y dióxido de carbono, por lo cual, se usan en la industria alimentaria para la producción de productos como el queso. Dentro de este grupo destacan las siguientes bacterias *P. jensenii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. australiense*, *P. namnetense* y *P. freudenreichii* (Arévalo, 2018, p. 14).

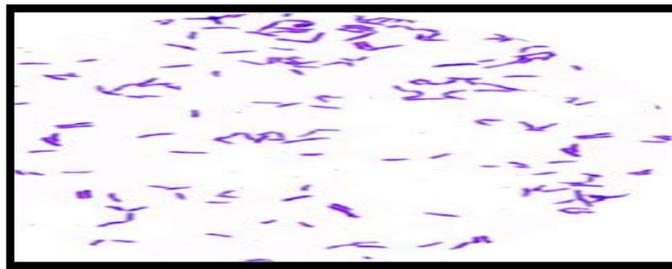


Ilustración 6-2: *Propionibacterium freudenreichii*

Fuente: Kosknen, P. et al. 2015, p. 2.

- *Leuconostoc*

Son bacterias Gram positivas con forma ovoide y se encuentran formando cadenas, son catalasa negativa. En cuanto a la fermentación son heterofermentativos y son capaces de producir dextrano. A nivel de la industria alimentaria se utiliza esta bacteria en conjunto con *Lactobacillus* o *Pediococcus* en la fermentación de la col, mediante el metabolismo anaeróbico, produciendo como metabolito principal el ácido láctico, también se utiliza en la producción de vinos y productos lácteos (Jofré et al., 2017, p. 340).



Ilustración 7-2: *Leuconostoc mesenteroides*

Fuente: Corrales, L. et al. 2012, p. 27.

- *Enterococcus*

Son bacterias Gram positivas con forma de cocos, que se agrupan en parejas o forman cadenas, se caracterizan por ser anaerobios facultativos, catalasa negativo, pueden crecer en condiciones extremas, a temperaturas entre 10-45°C y pH de hasta 9,6, también son gamma hemolíticos en agar sangre. El *Enterococcus faecalis* es el patógeno más representativo con el 60-90% de aislamientos clínicos, el *Enterococcus faecium* es la segunda bacteria mayormente aislada de este grupo con el 5-16% de detección en casos clínicos (Acosta, 2018, p. 2).

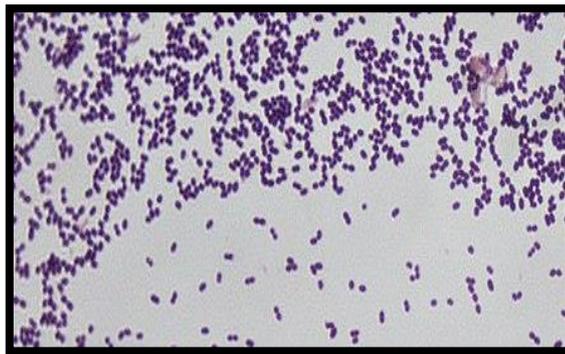


Ilustración 8-2: *Enterococcus faecalis*

Fuente: Solórazno, A, et al. 2018, p. 5.

2.2.2.4 Bioquímica de las bacterias ácido lácticas

Inicialmente la caracterización bioquímica de las bacterias ácido lácticas se basó en la tinción Gram, determinación de la capacidad de producir catalasa, producción de ácido láctico y fermentación de determinados carbohidratos. Sin embargo, a nivel del laboratorio existen diferentes métodos para evaluar las características morfológicas de estas bacterias, considerando los siguientes análisis (Ortíz, 2017, p. 20):

- Crecimiento a distintas temperaturas (10°C, 37°C y 45°C)
- Producción de amoniacó
- Capacidad de tolerar diferentes rangos de cloruro de sodio (2%, 4% y 6,5%)
- Produce acetóina
- Actividad reductora
- Hidroliza la esculina
- Sobrevive a los tratamientos térmicos

- Fermentan carbohidratos como: fructosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, trehalosa, maltosa, glucosa, manosa, xilosa, rafinosa, dextrosa, lactosa, ribosa, amigdalina, melobiosa, sorbitol, sucrosa, entre otros.

Convencionalmente las pruebas bioquímicas de este tipo de bacterias incluyen también la prueba KOH que es un método rápido de confirmación de la tinción Gram, debido a que la bacteria será Gram positiva si presenta KOH negativo, es decir, no se forma un hilo mucoide. Para facilitar la identificación y caracterización de estas bacterias se pueden utilizar test de análisis bioquímicos que funcionan con un sistema multipuebas como por ejemplo (Latorre, 2018, p. 25):

- Galería API
- Galería API 20 Strep
- Galería API 50 CH

2.2.2.5 *Pruebas bioquímicas de aislamiento*

- *Tinción Gram*

Es una de las pruebas bioquímicas más importantes dentro de microbiología para caracterizar una bacteria como Gram positiva o Gram negativa. También es posible determinar el tipo de microorganismo como bacteria o levadura, la morfología como bacilo o coco, la forma en que se encuentran agrupados y las características de la pared celular según su coloración. Las bacterias Gram positivas tienen la capacidad de retener el azul violeta al estar en presencia de alcohol y su pared celular es más gruesa y su componente principal es el peptidoglucano, mientras que, las Gram negativas presentan coloración rosa y tienen una pared más delgada con menos del 10% de peptidoglucano (Rodríguez y Arenas, 2018, p. 1-2).

- *Prueba de catalasa*

La catalasa es la enzima encargada de catalizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el peróxido de hidrógeno está presente en el metabolismo de organismos vivos debido al uso de azúcares en la vía oxidativa. La mayor parte de las bacterias aerotolerantes dan catalasa positiva a excepción de las bacterias ácido-lácticas (Latorre, 2018, p. 25).

- *Pruebas de oxidasa*

Es una prueba que permite identificar las bacterias que poseen enzimas oxidadas por la presencia del sistema citocromo oxidasa, el cual se encuentra en bacterias aerobias o anaerobias facultativas, sin embargo, aquellas bacterias que sean anaerobias carecen de estas enzimas. Se considera que la producción de oxidasa está relacionada con la producción de catalasa y se puede realizar la determinación con los siguientes métodos (ULPGC, 2019, p. 6):

- Método directo en placa
- Método indirecto en papel

- *Prueba de movilidad*

Es una prueba que permite determinar si la bacteria es móvil o inmóvil, para lo cual se realiza la siembra de la bacteria en el medio manitol-movilidad donde las bacterias que sean móviles producirán una especie de enturbiamiento homogéneo a causa de la distribución de los microorganismos, en cambio las bacterias inmóviles permanecerán únicamente en la línea de la siembra realizada (ULPGC, 2019, p. 4).

- *Producción de CO₂ a partir de glucosa*

Es una prueba que permite identificar si las bacterias son heterofermentativas, debido a que estos microorganismos usan la ruta de la fosfoacetolasa que metaboliza los azúcares, produciendo no sólo ácido láctico sino también ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Parra, 2010, p. 96-98).

- *Crecimiento a diferentes temperaturas*

Es una prueba que permite determinar si las bacterias son mesófilas o termófilas según la temperatura ideal de incubación, tomando en consideración los siguientes parámetros (Parra, 2010, p. 97):

- Mesófilas: incubación a 20-25°C, volumen de cultivo entre 1-2%, con un tiempo de incubación de 18-20 horas, teniendo una acidez final de ácido láctico del 0,8%.
- Termófilas: incubación a 40-45°C, volumen de cultivo entre 2-3%, con un tiempo de incubación de 2-4 horas, teniendo una acidez final de ácido láctico del 0,9%.

- *Tolerancia a diferente pH*

Es una prueba donde se someten las bacterias a diferentes rangos de pH, pero es importante considerar que, las bacterias ácido lácticas en su mayoría toleran un pH ácido o alcalino, sin embargo, a medida que se acidifica el medio se reduce el número de especies que son capaces de sobrevivir. Por ejemplo la mayoría de estas bacterias crecen a un pH de 4-4,5, aunque microorganismos como *Lactobacillus plantarum* pueden crecer a un pH de 3,9 y *Streptococcus lactis* puede tolerar pH de hasta 9,6 (Vanegas, 2017, p. 9).

Se considera que, el pH es un factor fundamental en el proceso de fermentación, obteniendo una producción óptima de ácido láctico a pH de 5-7, por lo cual, es importante seleccionar las bacterias ácido lácticas que tengan la capacidad de tolerar ese rango de acidez (Vanegas, 2017, p. 22).

2.2.2.6 *Beneficios de las bacterias ácido lácticas*

Las BAL son uno de los grupos de bacterias más importantes desde el punto de vista industrial, se puede decir que solo son superadas por las levaduras en servicio a la humanidad. Su uso reconocido como (GRAS), las hace útiles en múltiples aplicaciones industriales como cultivos iniciadores, ya que producen ácido láctico lo que provoca entre otros efectos una disminución del pH, evitando así la proliferación de ciertas bacterias patógenas. Por otro lado, algunas cepas son bacterias promotoras de la salud por uso como probióticos (Lahtinem, et al., 2012, p. 7-17).

Numerosos estudios han demostrado que estos microorganismos autóctonos mejoran las propiedades tecnológicas y sensoriales de los sistemas alimentarios, y que también pueden contribuir en la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y deteriorantes (Poltronieri, 2018, p. 161-172). Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir componentes inhibitorios como el ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrogeno, y bacteriocinas, pequeños péptidos con capacidad antimicrobiana (Pringsulaka et al., 2015 p. 66-67).

2.2.3 *Probióticos*

Según la Organización de Alimentos y agricultura, los probióticos son microorganismos vivos que se al ser administrados en una adecuada cantidad causan un beneficio a la salud del huésped. En general cualquier microorganismo podría ser candidato a convertirse en probiótico, sin embargo, los grupos de bacterias más usados son los *Lactobacillus* y las Bifidobacterias, al ser consideradas como seguras, aunque de igual forma se utilizan bacterias de otros géneros como (Mariño et al, 2018, p. 6):

- *Sacchamoryces cerevisiae*
- *Saccharomyces boulardii*
- *Escherichia coli*
- *Bacillus cereus*

Las bacterias ácido lácticas fueron consideradas como probióticos desde la década de los 60, al proporcionar una amplia variedad de beneficios como reducción del pH a nivel intestinal, estimula la producción de vitaminas o enzimas a nivel digestivo, produce sustancias antibacteriales como por ejemplo bacteriocinas, ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, lactonas, entre otras. Además, es importante considerar que el cultivo bacteriano debe encontrarse en la concentración adecuada para ejercer el efecto beneficioso a la salud, teniendo como rango sugerido de 10^6 a 10^7 UFC/Gramo de producto (Parra, 2010, p. 101).

Tabla 7-2: Principales probióticos utilizados en la industria

Género	Probióticos
<i>Lactobacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus salivarius</i> - <i>Lactobacillus lactis</i> - <i>Lactobacillus reuteri</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Lactobacillus buchneri</i> - <i>Lactobacillus fermentum</i> - <i>Lactobacillus johnsonii</i> - <i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bifidobacterium infantis</i> - <i>Bifidobacterium longum</i> - <i>Bifidobacterium lactis</i> - <i>Bifidobacterium breve</i> - <i>Bifidobacterium bifidum</i> - <i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Streptococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus salivarius</i> - <i>Streptococcus termophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Saccharomyces boulardii</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Otros	- <i>Lactococcus</i>
	- <i>Bacillus subtilis</i>
	- <i>Leuconostoc</i>
	- <i>Pediococcus acidilactici</i>
	- <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	- <i>Escherichia coli</i>

Fuente: Mariño et al. 2018, p.6.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

2.2.3.1 *Funciones de los probióticos*

Los probióticos cumplen diferentes funciones tanto a nivel inmunológico y no inmunológico, pero es necesario que cumplan con determinadas características y condiciones como se indica a continuación:

- Ser seguros para el consumo
- Deben tener procedencia humana
- Deben sobrevivir a las condiciones gástricas
- Deben tener acción proteolítica para ser estables frente a ácidos y a la bilis
- No deben conjugarse con sales biliares
- Buena viabilidad
- Buena estabilidad al llegar al sitio de acción
- Se debe adherir a la mucosa intestinal
- Debe prevenir la colonización de bacterias
- Debe presentar efecto positivo en la salud humana
- Su estabilidad debe mantenerse a lo largo de la vida útil del producto

Tabla 8-2: Beneficios de los probióticos

Beneficios inmunológicos	Beneficios no inmunológicos
<ul style="list-style-type: none">- Estimulan la activación de los macrófagos locales- Aumenta la producción de inmunoglobulina A- Es capaz de modular los perfiles de citoquinas para causar una respuesta tolerogénica- Activa una respuesta ante la presencia de patógenos	<ul style="list-style-type: none">- Efectos metabólicos- Modula el metabolismo lipídico- Favorece la absorción de calcio- Previene el estreñimiento- Previene de infecciones intestinales- Disminuye las manifestaciones de atopía- Previene la aparición de infecciones sistémicas- Ayuda en la esteatosis hepática o encefalopatía hepática- Previene las infecciones vaginales- Disminuye la actividad de enzimas como glucoronidasa o nitrorreductasa, implicadas en la aparición de cáncer- Eliminan por fagocitosis los radicales superóxidos

Fuente: Mariño et al. 2018, p.6.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022.

2.2.3.2 *Mecanismos de acción de los probióticos*

Los probióticos actúan a nivel del tracto intestinal causando la estimulación de los mecanismos inmunitarios en la mucosa y los no inmunitarios, mediante la acción antagonista con bacterias patógenas. Se incluyen los siguientes mecanismos de acción (Guarner et al., 2017, p. 15):

- Inducción a pH menor a 4
- Producción de ácido láctico
- Disminuye la permeabilidad del intestino
- Potencia el efecto inmunológico a nivel digestivo
- Incrementa la actividad de la lactasa
- Reduce el tiempo de eliminación del patógeno
- Actúa en la transferencia de los plásmidos
- Compiten con nutrientes que se encuentran en la flora del patógeno
- Causan alteración dificultando la translocación bacteriana
- Incrementa la producción de mucinas ileocolónicas que permiten el recubrimiento del intestino
- Incrementa la producción de los linfocitos T

- Aumenta la secreción de la inmunoglobulina A

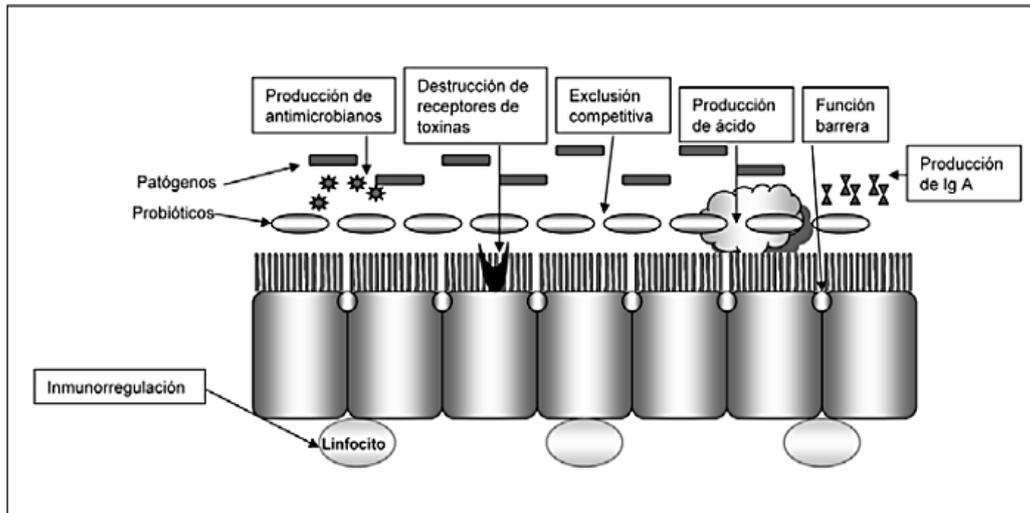


Ilustración 9-2: Mecanismo de la actividad probiótica

Fuente: Guarner et al. 2019, p. 16.

2.2.3.3 Interacción de probióticos con la microbiota intestinal

La microbiota intestinal se considera como un ecosistema diverso de microorganismos, que se han adaptado a las condiciones del intestino, por lo cual, las bacterias intestinales y el hospedador tienen una relación simbiótica. Se considera que, en la microbiota intestinal existen alrededor de 100 billones de bacterias predominando 4 filum como *Fermicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias* y *Actinobactrias*. (Wagner, 2018, p. 6). Los probióticos interactúan con estas bacterias de la mucosa intestinal para antagonizar a los patógenos, mejorando la barrera intestinal, favoreciendo el ambiente intestinal, regulando la inflamación y la respuesta inmunitaria, mediante la producción de componentes bioactivos como (Wagner, 2018, p. 9):

- Estructuras presentes en la pared bacteriana (polisacáridos, proteínas, ácidos lipoteicoicos)
- Secreciones (proteínas bacterianas)
- Ácidos nucleicos
- Metabolitos (ácidos grasos y ácidos orgánicos)

2.2.3.4 Dosis de probióticos

Los probióticos son microorganismos viables donde se requiere de una concentración adecuada para cumplir con el objetivo planteado, tanto en la prevención como en el tratamiento de las patologías, teniendo que la dosis generalmente oscila entre 10^6 hasta 10^{11} UFC/dosis. Sin

embargo, se ha demostrado que ciertas requieren de una dosis menor para ejercer sus efectos, mientras que, otras necesitan de una dosis mayor, como se indica a continuación (Mariño et al. 2018, p. 11):

- *B. infantis* es eficaz en el tratamiento de la sintomatología de intestino y colon irritable al estar en una concentración de 10^{11} UFC/dosis
- *L. ácidophilus* actúa a una concentración de 10^9 UFC/dosis
- *L. casei* actúa a una concentración de $2 * 10^9$ UFC/dosis
- *L. lactis* actúa a una concentración de $25 * 10^9$ UFC/dosis
- *L. plantarum* actúa a una concentración de $7 * 10^8$ UFC/dosis
- *L. bulgaricus* actúa a una concentración de $6 * 10^9$ UFC/dosis
- *L. paracasei* actúa a una concentración de $1 * 10^1$ UFC/dosis

2.2.3.5 Directrices para evaluar los probióticos usados a nivel alimentario

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, en el año 2006 estableció las directrices para evaluar los probióticos usados a nivel industrial, considerando que existen cinco propiedades que deben cumplir los microorganismos que actúan como agentes probióticos, incluyendo los siguientes (Wagner, 2018, p. 11):

- Debe generar sustancias con poder antimicrobiano
- No debe presentar resistencia a antibióticos
- Deben ser tolerantes y resistentes a las condiciones de la diana
- Debe tener capacidad tecnológica al ser fácil de cultivar, no debe perder su viabilidad en la conservación de las bacterias
- Debe presentar una adecuada actividad in vivo

Dentro de los pasos para realizar una evaluación de los probióticos usados en la industria de alimentos, se encuentran los siguientes:

- Identificar la cepa bacteriana mediante métodos genotípicos y fenotípicos
- Evaluar la inocuidad ya sea a nivel in vitro o con experimentación animal (Fase I)
- Realizar la caracterización funcional
- Ejecutar ensayos de doble anonimato usando un placebo (Fase II)
- Evaluar la eficacia de la cepa
- Realizar un segundo estudio para confirmar el resultado
- Comparar los probióticos con el tratamiento estándar para evaluar la efectividad

2.2.4 Actividad probiótica

La actividad de un probiótico es la capacidad que tienen estas cepas de ayudar a la salud del ser humano esta se determina mediante una serie de ensayos entre los que se puede mencionar la capacidad hemolítica, simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares, la resistencia a antibióticos y el efecto antagonista de la cepa de BAL frente a agentes patógenos.

2.2.4.1 Ensayos para determinación de la actividad probiótica

- Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares

- Simulación de tolerancia a jugos gástricos

En la evaluación de la tolerancia de estas cepas a pH ácido luego de activar el microorganismo, se tomaron 100 µl del cultivo y se inoculó en caldo MRS ajustado a pH 2,0 con HCL 6 M y se incubó por 2 h a 37 °C (Cueto, et al., 2010, p. 3-4).

- Simulación de tolerancia a sales biliares

En la determinación de la tolerancia a sales biliares de las cepas evaluadas se tomaron 100 µl del cultivo fresco y se inoculó en caldo MRS enriquecido con sales biliares (0,3%) ajustado a pH: 7,0 y se incubó por 2 h a 37 °C (Cueto, et al., 2010, p. 3-4).

- Hemólisis

Para esta prueba se tiene en cuenta el ensayo sobre la actividad hemolítica, en el cual se inoculó la cepa de estudio sobre el medio de cultivo agar sangre al 5% v/v (de sangre de cordero) por el método de siembra en superficie, se incubó a 37°C por 48h en anaerobiosis. Las cepas se caracterizaron como α -hemólisis, β -hemólisis y γ -hemólisis, según la tabla 6 (Vélez, et al., 2015: p.146-147).

- ***Resistencia a antibióticos***

Para esta prueba se realizó un antibiograma con las cepas activadas en caldo MRS a 37 °C durante 8 h y discos de antibióticos. Estas placas se incubaron a 37 °C por 24 h y luego se determinó el diámetro de inhibición en mm. Los antibióticos utilizados fueron: ciprofloxacina, tetraciclina, estreptomina, vancomicina, eritromicina y cloranfenicol (Cueto, et al., 2010, p. 3-4).

- ***Efecto antagónico***

La evaluación del potencial bactericida de las BAL se realizó por el método de difusión en pozos, con algunas modificaciones. Se empleó el medio de cultivo agar MRS Y M17, se agregó 100µL de una suspensión de bacterias patógenas, por medio de la técnica de siembra en superficie, se hicieron 4 pozos sobre el medio de cultivo y se adiciono 35 µL de cada BAL. Las muestras se refrigeraron a 4°C por tres horas y luego incubaron a 37°C por 48 h en anaerobiosis. La actividad bactericida se detectó por la presencia de una zona clara de inhibición alrededor del pozo (Vélez, et al., 2015: p.144-145).

CAPÍTULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Metodología de la investigación

3.1.1 *Localización de la investigación*

El presente trabajo de integración curricular se ejecutó en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.1.2 *Tipo y diseño de investigación*

El presente trabajo experimental tuvo un diseño experimental basado en la determinación de la actividad probiótica de BAL aisladas e identificadas en muestras de leche cruda. La investigación se ejecutará en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias (ESPOCH).

3.2 Diseño experimental

3.2.1 *Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo*

Estuvo conformada por la leche cruda proveniente de pequeños y grandes productores de la parroquia San Luis seleccionado por conveniencia en el periodo de marzo-octubre 2022.

3.2.2 *Muestra*

El estudio se realizó en 3 muestras de leches que cumplan estrictamente con todos los parámetros y criterios de inclusión, basados en la determinación de la actividad probiótica de las bacterias ácido-lácticas presente en muestras de leche cruda utilizando métodos dependientes de cultivo-

3.2.3 *Método de muestreo*

El tipo de muestreo se realizó mediante selección intencionada o muestreo de conveniencia aleatorio de fácil acceso. Para la recolección de las muestras de leche se tomó en cuenta lo establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2:2013: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico

3.2.4 Criterios de inclusión

Fueron considerados como muestras aquellos tipos de leche que reunieron los siguientes criterios según la normativa: Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2008 Leche cruda. Requisitos:

- Ordeño integro e higiénico de vacas sanas y sin adición o sustracción alguna.
- Exento de calostro y libre de sustancias extrañas a su naturaleza.
- Con requisitos organolépticos (color, olor, aspecto) específicos.

3.2.5 Criterios de exclusión

- Cuando la leche es obtenida de vacas deficientemente alimentadas, cansadas o enfermas.
- Contienen sustancias ajenas a la naturaleza del producto (conservante, adulterante, neutralizante, colorante y antibiótico) en cantidades que superen los límites indicados.

3.3 Instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnica para la recolección de las muestras

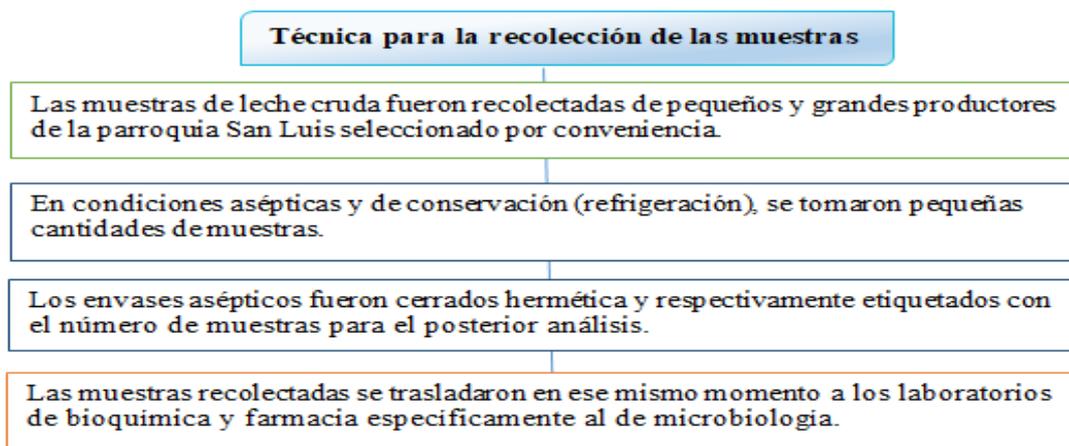


Ilustración 1-3: Técnica para la recolección de las muestras

Fuente: NTE INEN 1529-2, 2013. (NTE INEN para recolección de muestras).

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.2 Técnica de aislamiento y recuento por diluciones

Para realizar el recuento de bacterias ácido lácticas se prepara medios de cultivos selectivos MRS y M17 respectivamente.

3.3.3 Preparación de medios de cultivo

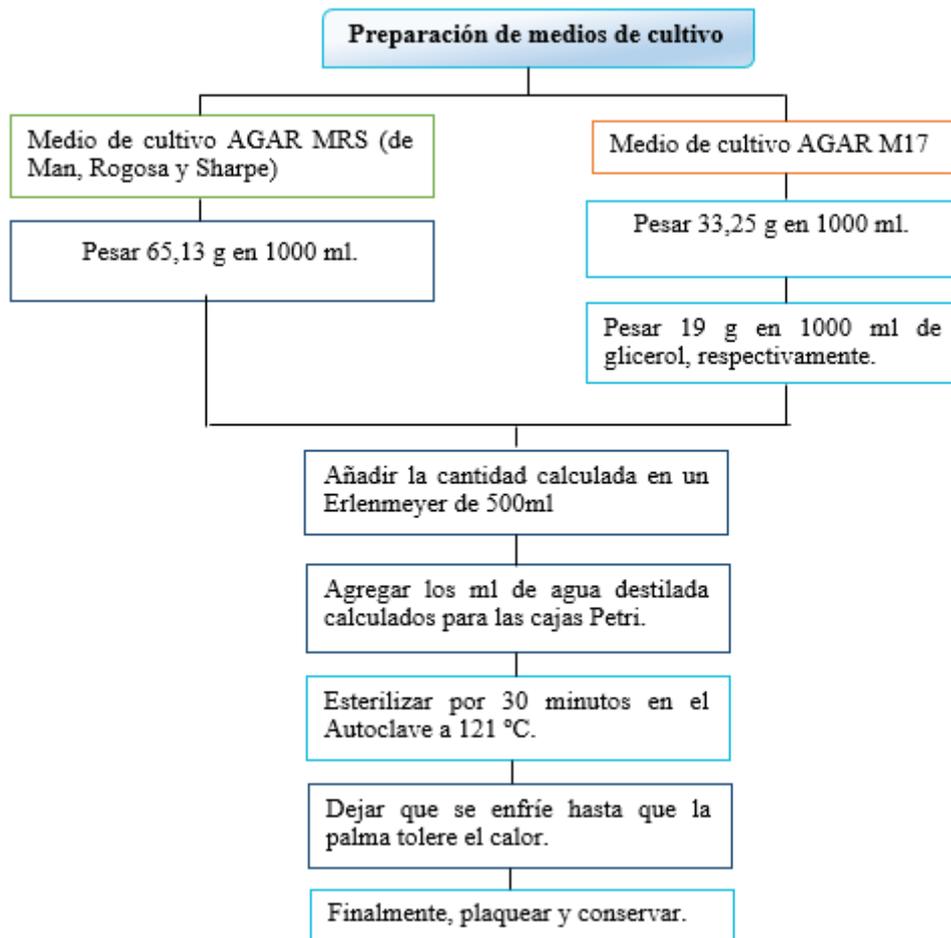


Ilustración 2-3: Procedimiento para la preparación de medios de cultivo

Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013. (NTE INEN para Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos).

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.4. Disoluciones

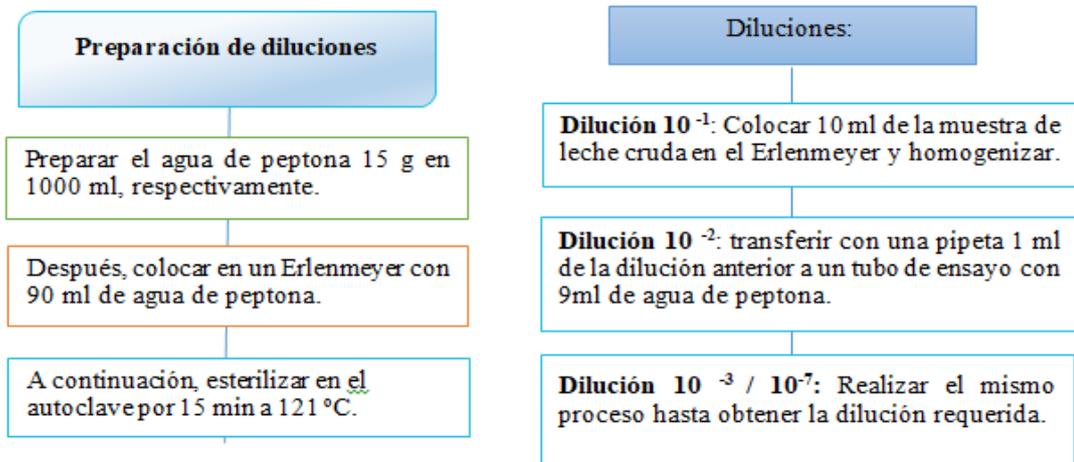


Ilustración 3-3: Preparación de diluciones.

Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013.

Realizado por: Inca, Jocelyne, Martínez, Joao, 2022.

3.3.5 Siembra y Aislamiento de BAL

3.3.5.1 Siembra y Aislamiento de bacilos

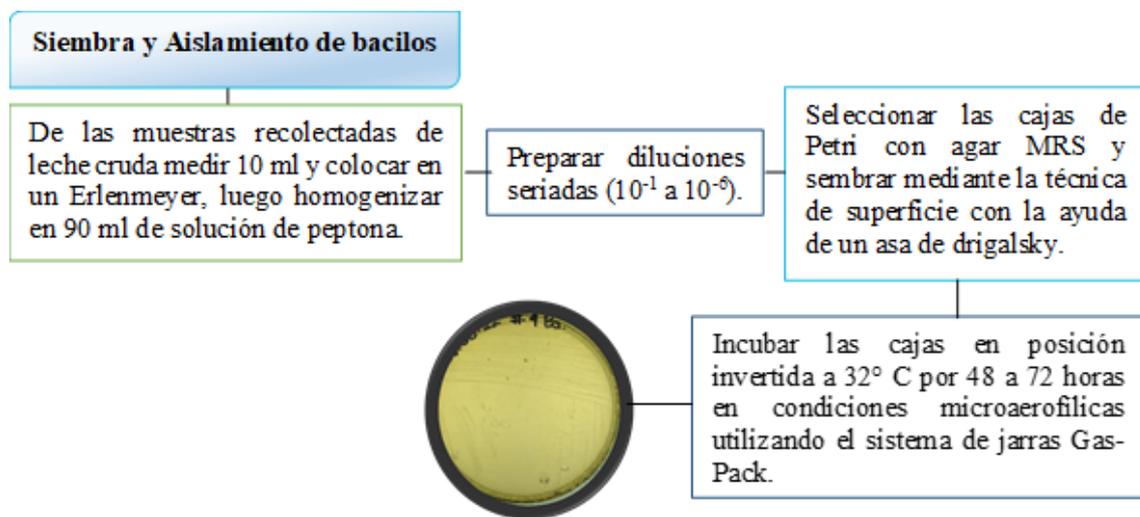


Ilustración 4-3: Procedimiento de Siembra y Aislamiento de bacilos.

Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013.

Realizado por: Inca, Jocelyne, Martínez, Joao, 2022.

3.3.5.2 Siembra y aislamiento de cocos

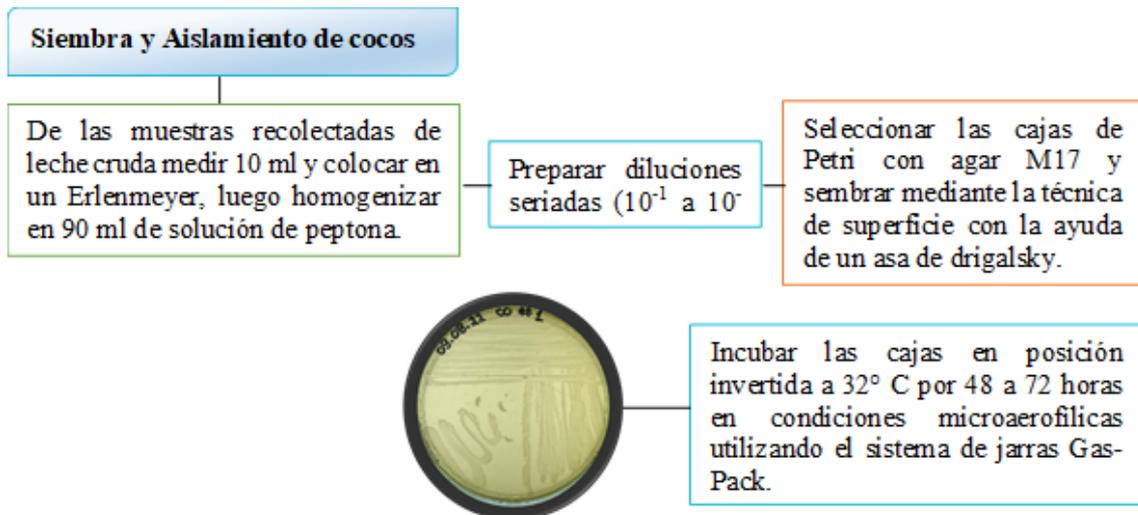


Ilustración 5-3: Procedimiento de Siembra y Aislamiento de cocos

Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013.

Realizado por: Inca Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.6 Pruebas bioquímicas para el aislamiento

3.3.6.1 Tinción Gram

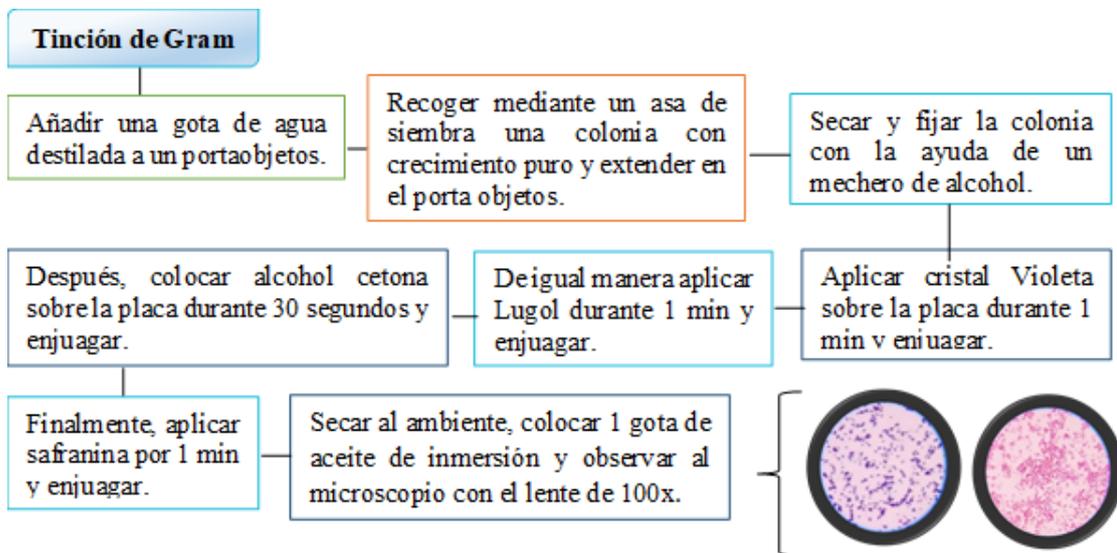


Ilustración 6-3: Procedimiento para la realización de tinción Gram.

Fuente: NTE INEN 1529-1, 2013.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.6.2 Catalasa

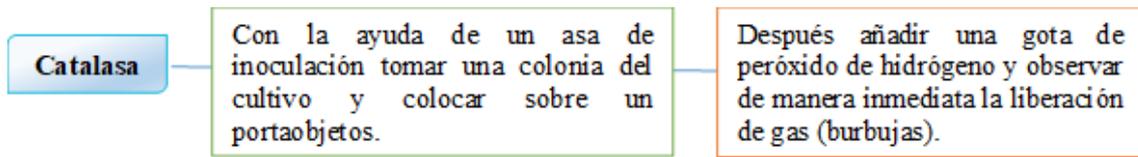


Ilustración 7-3: Determinación de la prueba de catalasa.

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.6.3 Oxidasa

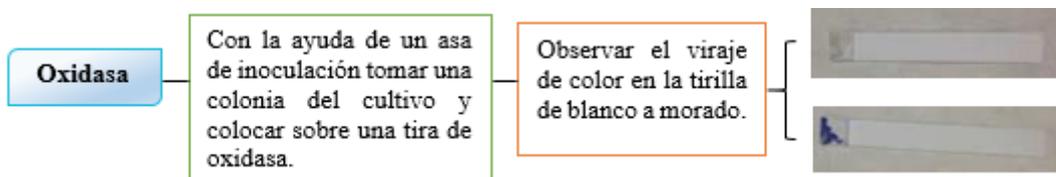


Ilustración 8-3: Determinación de la prueba de oxidasa

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne, Martínez, Joao, 2022.

3.3.7 Pruebas de caracterización

Las colonias ácido lácticas aisladas, estuvieron sometidas diferentes pruebas fenotípicas para confirmar el género al cual pertenecen.

3.3.7.1 Prueba de movilidad

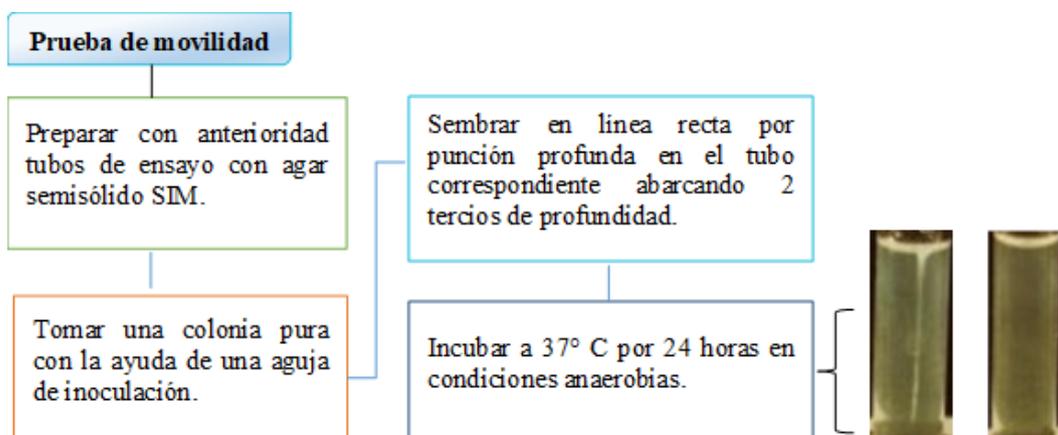


Ilustración 9-3: Proceso de realización de la prueba de movilidad

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.7.2 Producción de CO₂ a partir de glucosa

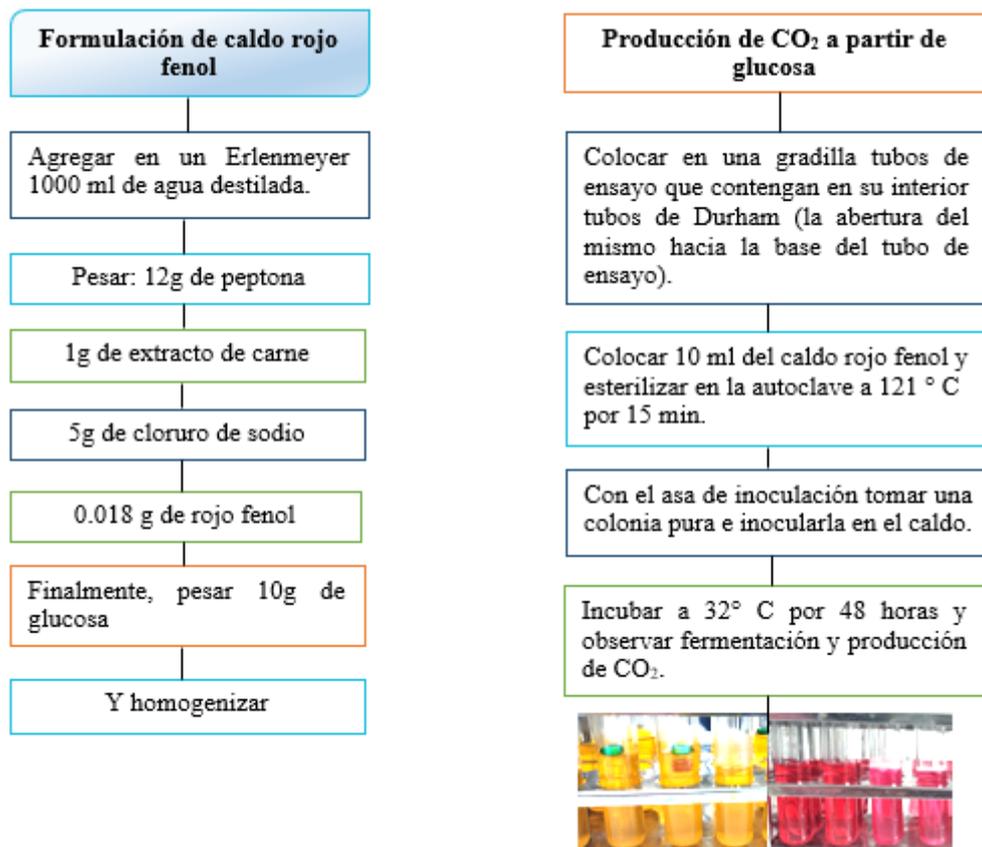


Ilustración 10-3: Proceso de producción de CO₂ a partir de glucosa

Fuente: Vargas, 2018

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.7.3 Crecimiento a diferentes temperaturas

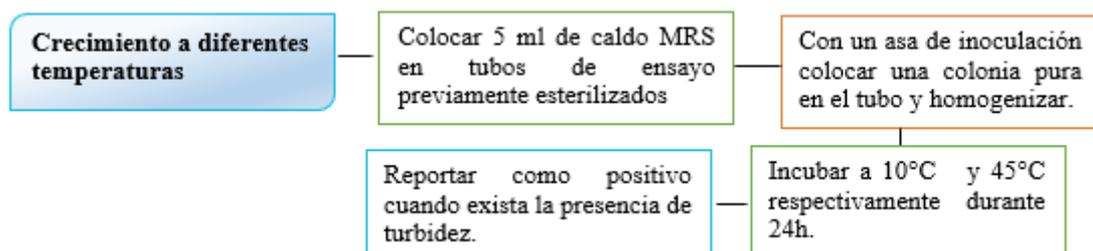


Ilustración 11-3: Proceso de determinación a diferentes temperaturas

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.7.4 Tolerancia a cloruro sódico

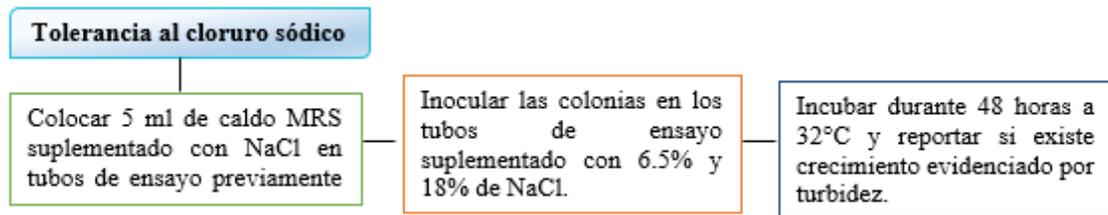


Ilustración 12-3: Proceso de tolerancia al cloruro sódico.

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

3.3.7.5 Tolerancia a distintos pH

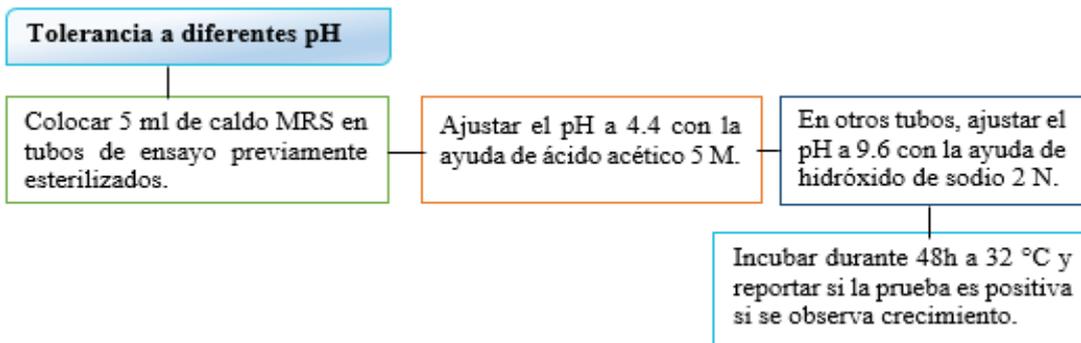


Ilustración 13-3: Proceso de tolerancia a diferentes pH

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8 Pruebas de actividad probiótica

3.3.8.1 Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares

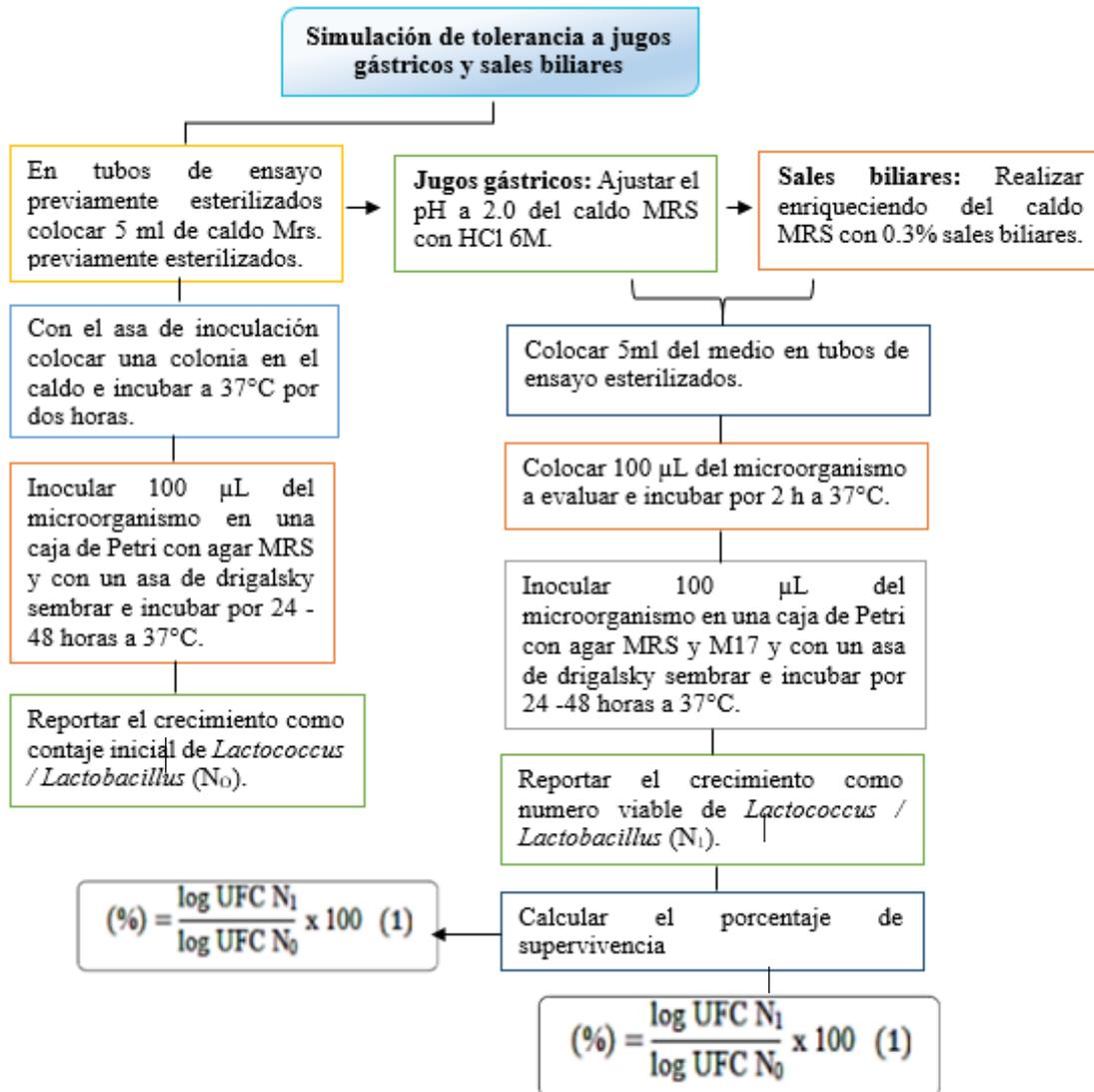


Ilustración 14-3: Proceso de simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares

Fuente: Cueto, 2010.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8.2 Capacidad hemolítica

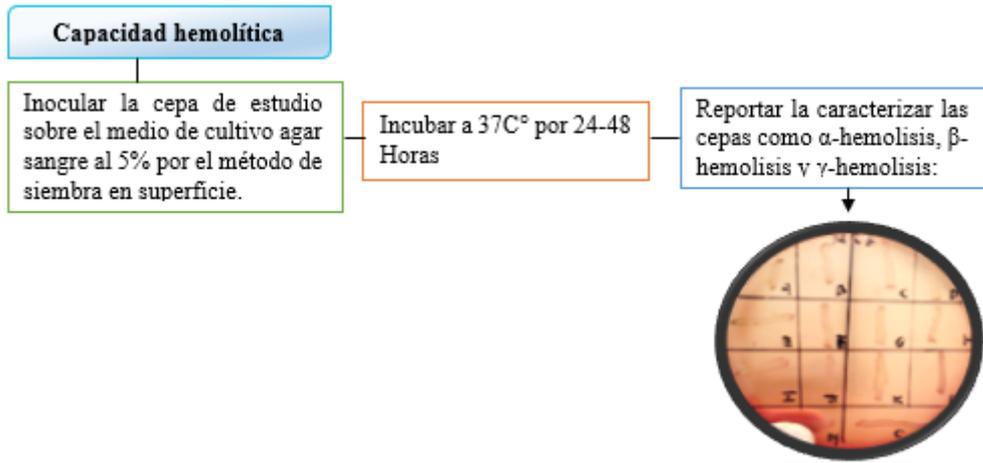


Ilustración 15-3: Proceso para la realización de la capacidad hemolítica

Fuente: Liu, 2020.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8.3 Resistencia a antibióticos

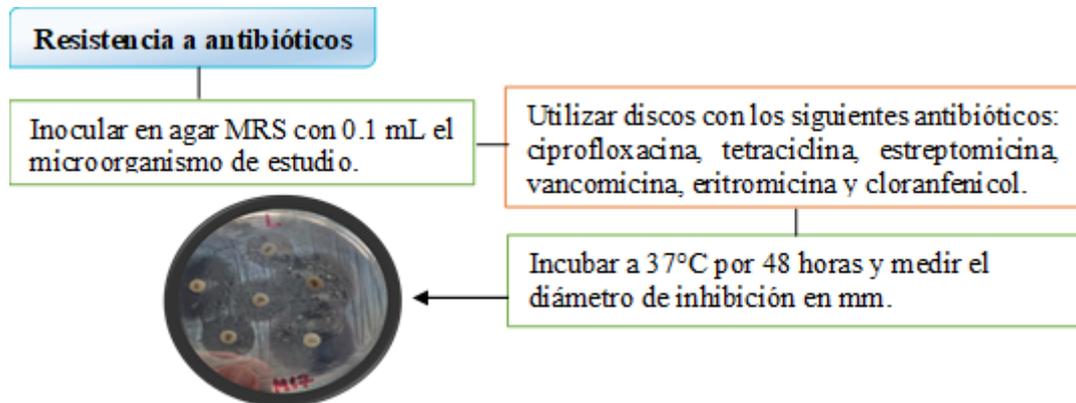


Ilustración 16-3: Proceso para la prueba de resistencia a antibióticos

Fuente: Liu, 2020.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8.4 Evaluación del efecto antagónico

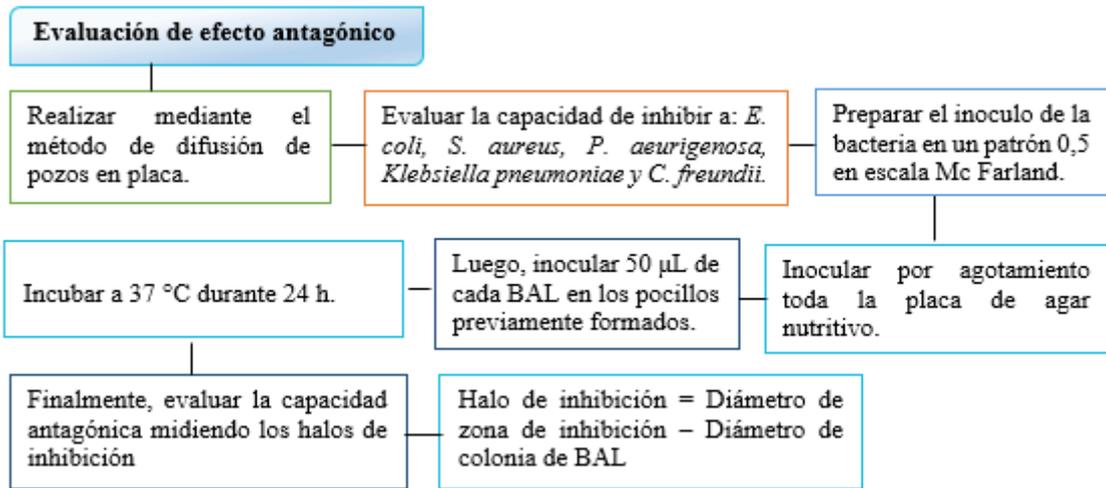


Ilustración 17-3: Proceso para evaluación de efecto antagónico.

Fuente: Ajcet, 2020.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8.5 Técnica de conservación de las cepas con glicerol

Para la conservación de bacterias ácido lácticas a largo plazo se lo realiza en caldo MRS que contenga glicerol al 30% (v/v) a -20° C.

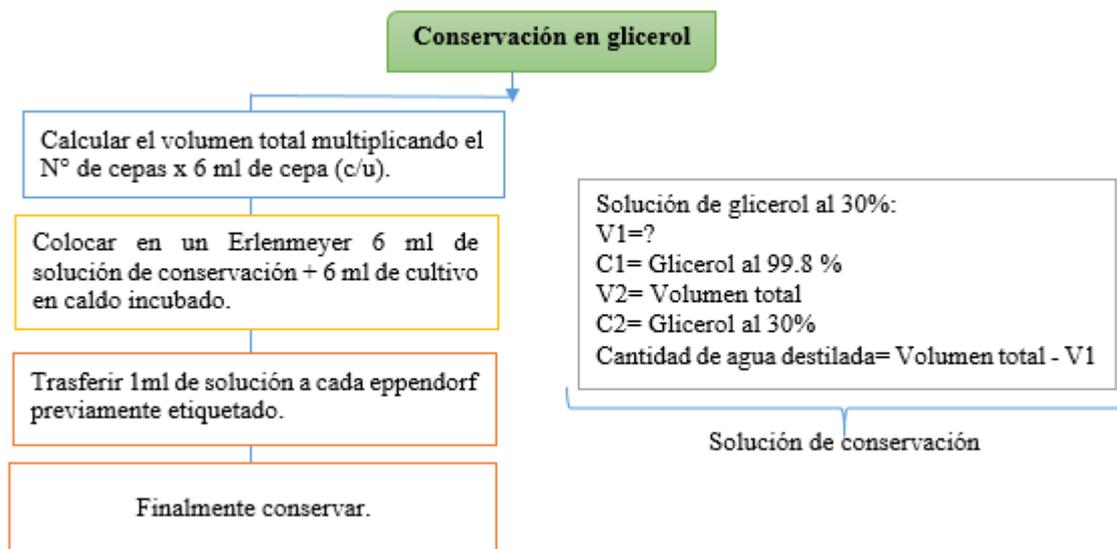


Ilustración 18-3: Proceso de conservación en glicerol

Fuente: Vargas, 2018.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

3.3.8.6 Aislamiento y caracterización de BAL

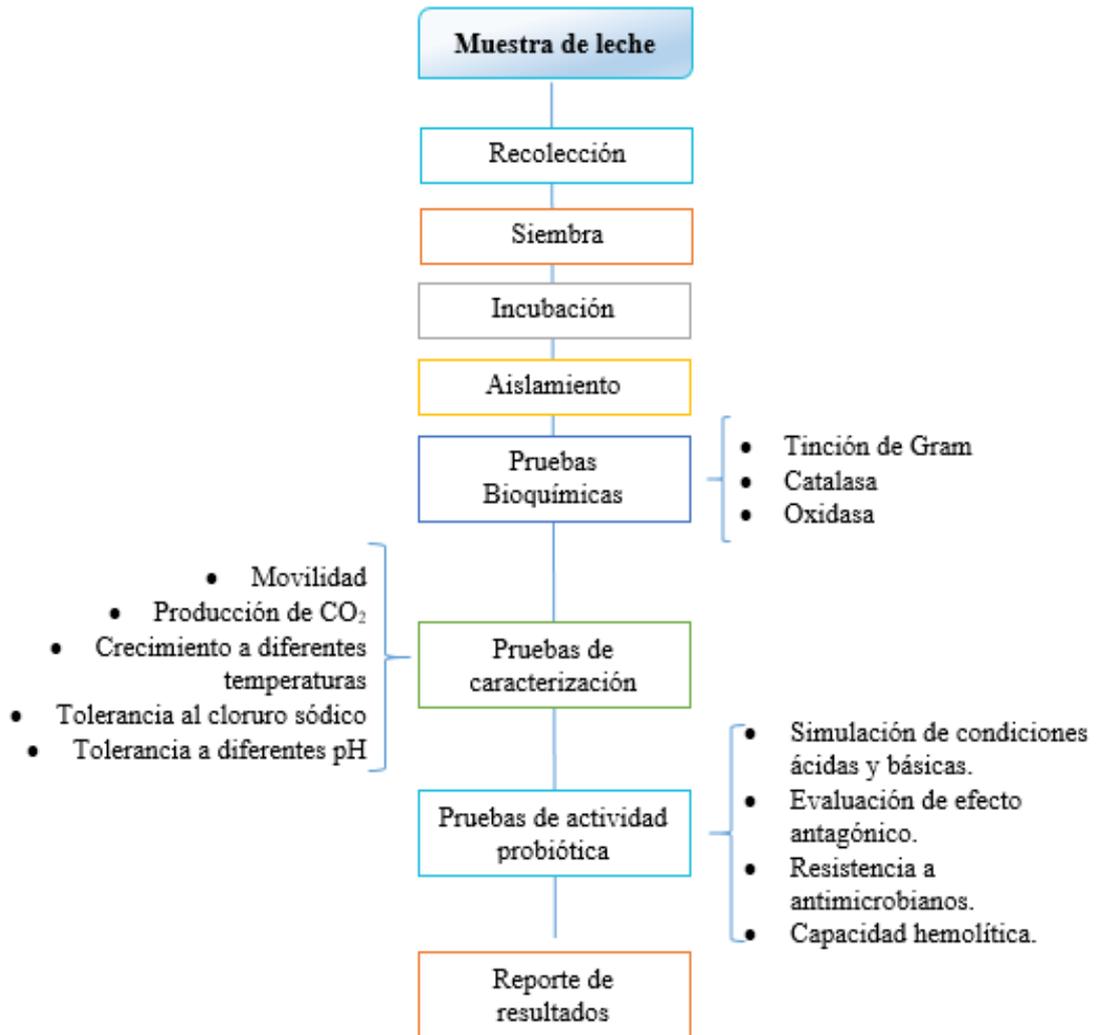


Ilustración 19-3: Proceso general del aislamiento y caracterización de BAL

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

CAPÍTULO IV

4 MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis e interpretación de los datos

4.1.1 Selección de cepas aisladas de las muestras de leche cruda

Una vez evidenciado el crecimiento de las cepas bacterianas en los medios de cultivos MRS y M17 respectivamente se procedió a la primera selección de colonias. Tablas 1-4.

Tabla 1-4: Colonias seleccionadas de las muestras de leche cruda

N°	Muestras	Medio de aislamiento	Morfología según el medio	Número de colonias	Porcentaje	Total Bacilos / Cocos	
1	Muestras de leche 1	MRS	Bacilos	8	8%		
2	Muestras de leche 1	M17	Cocos	9	9%		
3	Muestras de leche 2	MRS	Bacilos	13	13%	50	50
4	Muestras de leche 2	M17	Cocos	15	15%		
5	Muestras de leche 3	MRS	Bacilos	29	29%		
6	Muestras de leche 3	M17	Cocos	26	26%		

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Una vez sembradas las diluciones de las muestras de leche cruda y después de evidenciar el crecimiento en los medios de cultivo respectivos se seleccionaron las colonias más aisladas de cada una de las muestras de leche recolectadas, teniendo una selección de 50 colonias que crecieron en medio de cultivo MRS siendo este el medio selectivo para *Lactobacillus* y una selección de 50 colonias que crecieron en el medio de cultivo M17 siendo este el medio selectivo para *Lactococcus*.

4.1.2 Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas

Una vez realizada la primera selección de las cepas bacterianas se procedió a la purificación y posterior aislamiento y selección de las colonias de bacterias ácido lácticas presentes en los medios de cultivo M17 y MRS mediante pruebas bioquímicas de identificación. Los resultados se muestran en las tablas 2-4 y 3-4.

Tabla 2-4: Pruebas bioquímicas para la identificación de BAL en agar M17

Nº	CÓDIGO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	TINCIÓN GRAM	OXIDASA	CATALASA
1	Col 1	Cocos	Pos	Neg	Pos
2	Col 2	Cocos	Pos	Neg	Pos
3	Col 3	Cocos	Pos	Neg	Pos
4	Col 4	Cocos	Pos	Neg	Pos
5	Col 5	Cocos	Pos	Neg	Pos
6	Col 6	Cocos	Pos	Neg	Pos
7	Col 7	Cocos	Pos	Neg	Pos
8	Col 8	Cocos	Pos	Neg	Pos
9	Col 9	Cocos	Pos	Neg	Pos
10	Col 10	Cocos	Pos	Neg	Pos
11	Col 11	Cocos	Pos	Neg	Pos
12	Col 12	Cocos	Pos	Neg	Pos
13	Col 13	Cocos	Pos	Neg	Neg
14	Col 14	Cocos	Pos	Neg	Neg
15	Col 15	Cocos	Pos	Neg	Neg
16	Col 16	Cocos	Pos	Neg	Neg
17	Col 17	Cocos	Pos	Neg	Pos
18	Col 18	Cocos	Neg	Neg	Pos
19	Col 19	Cocos	Neg	Neg	Pos
20	Col 20	Cocos	Neg	Neg	Pos
21	Col 21	Cocos	Neg	Neg	Pos
22	Col 22	Cocos	Pos	Neg	Pos
23	Col 23	Cocos	Pos	Neg	Pos
24	Col 24	Cocos	Pos	Neg	Pos
25	Col 25	Cocos	Pos	Neg	Neg
26	Col 26	Cocos	Pos	Neg	Neg
27	Col 27	Cocos	Pos	Neg	Neg
28	Col 28	Cocos	Pos	Neg	Neg
29	Col 29	Cocos	Pos	Neg	Pos
30	Col 30	Cocos	Pos	Neg	Pos
31	Col 31	Cocos	Pos	Neg	Pos
32	Col 32	Cocos	Pos	Neg	Pos
33	Col 33	Cocos	Pos	Neg	Pos

34	Col 34	Cocos	Pos	Neg	Pos
35	Col 35	Cocos	Pos	Neg	Pos
36	Col 36	Cocos	Pos	Neg	Pos
37	Col 37	Cocos	Pos	Neg	Neg
38	Col 38	Cocos	Pos	Neg	Neg
39	Col 39	Cocos	Pos	Neg	Neg
40	Col 40	Cocos	Pos	Neg	Neg
41	Col 41	Cocos	Pos	Neg	Pos
42	Col 42	Cocos	Neg	Neg	Pos
43	Col 43	Cocos	Neg	Neg	Pos
44	Col 44	Cocos	Pos	Neg	Neg
45	Col 45	Cocos	Pos	Neg	Neg
46	Col 46	Cocos	Pos	Neg	Neg
47	Col 47	Cocos	Pos	Neg	Neg
48	Col 48	Cocos	Pos	Neg	Pos
49	Col 49	Cocos	Pos	Neg	Pos
50	Col 50	Cocos	Pos	Neg	Pos

Col: Codificación usada para definir colonias seguido del número de colonia analizada.

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Tabla 3-4: Pruebas bioquímicas para la identificación de BAL en agar MRS

N°	CÓDIGO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	TINCIÓN GRAM	OXIDASA	CATALASA
1	Col 1	Bacilos	Pos	Neg	Neg
2	Col 2	Bacilos	Pos	Neg	Neg
3	Col 3	Bacilos	Pos	Neg	Neg
4	Col 4	Bacilos	Pos	Neg	Neg
5	Col 5	Bacilos	Pos	Neg	Pos
6	Col 6	Bacilos	Pos	Neg	Pos
7	Col 7	Bacilos	Pos	Neg	Pos
8	Col 8	Bacilos	Pos	Neg	Pos
9	Col 9	Bacilos	Pos	Neg	Pos
10	Col 10	Bacilos	Pos	Neg	Pos
11	Col 11	Bacilos	Pos	Neg	Pos
12	Col 12	Bacilos	Pos	Neg	Pos
13	Col 13	Bacilos	Pos	Neg	Neg

14	Col 14	Bacilos	Pos	Neg	Neg
15	Col 15	Bacilos	Pos	Neg	Neg
16	Col 16	Bacilos	Pos	Neg	Neg
17	Col 17	Bacilos	Pos	Neg	Neg
18	Col 18	Bacilos	Pos	Neg	Neg
19	Col 19	Bacilos	Pos	Neg	Neg
20	Col 20	Bacilos	Pos	Neg	Neg
21	Col 21	Bacilos	Pos	Neg	Pos
22	Col 22	Bacilos	Pos	Neg	Pos
23	Col 23	Bacilos	Pos	Neg	Pos
24	Col 24	Bacilos	Pos	Neg	Pos
25	Col 25	Bacilos	Pos	Neg	Pos
26	Col 26	Bacilos	Pos	Neg	Pos
27	Col 27	Bacilos	Pos	Neg	Pos
28	Col 28	Bacilos	Pos	Neg	Pos
29	Col 29	Bacilos	Pos	Neg	Pos
30	Col 30	Bacilos	Pos	Neg	Pos
31	Col 31	Bacilos	Pos	Neg	Pos
32	Col 32	Bacilos	Pos	Neg	Pos
33	Col 33	Bacilos	Pos	Neg	Pos
34	Col 34	Bacilos	Pos	Neg	Pos
35	Col 35	Bacilos	Pos	Neg	Pos
36	Col 36	Bacilos	Pos	Neg	Pos
37	Col 37	Bacilos	Pos	Neg	Pos
38	Col 38	Bacilos	Pos	Neg	Pos
39	Col 39	Bacilos	Pos	Neg	Pos
40	Col 40	Bacilos	Pos	Neg	Pos
41	Col 41	Bacilos	Pos	Neg	Neg
42	Col 42	Bacilos	Pos	Neg	Neg
43	Col 43	Bacilos	Pos	Neg	Neg
44	Col 44	Bacilos	Pos	Neg	Neg
45	Col 45	Bacilos	Pos	Neg	Pos
46	Col 46	Bacilos	Pos	Neg	Pos
47	Col 47	Bacilos	Pos	Neg	Pos
48	Col 48	Bacilos	Pos	Neg	Pos
49	Col 49	Bacilos	Pos	Neg	Neg

50	Col 50	Bacilos	Pos	Neg	Neg
Col: Codificación usada para definir colonias seguido del número de colonia analizada.					
Pos: Indica un resultado positivo en la prueba					
Neg: Indica un resultado negativo en la prueba					
Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.					

Como se puede evidenciar en las tabla 2-4 y 3-4 pertenecientes a las bacterias que se desarrollaron en medio de cultivo M17 y MRS respectivamente, una vez realizado el aislamiento y purificación de las cepas se procede a la realización de las pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa cuyos resultados fueron que de las 50 colonias que crecieron en medio M17 solo 16 cumplían con ser catalasa, oxidasa negativos y Gram positivos, mientras que de las 50 colonias que crecieron en medio MRS solo 18 de estas cumplían con los parámetros de catalasa, oxidasa negativos y Gram positivos lo que concuerda con el estudio realizado por (Hernández et al., 2020: p.4-5); (Landa et al., 2019: p.71) y (Vargas, 2018, p 80), en el cual nos indican que las BAL constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se caracterizan fundamentalmente por la producción de ácido láctico, son cocos o bacilos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativo.

4.1.3 Pruebas de caracterización

En la tabla 4-4 y en la tabla 5-4, se muestra los resultados del crecimiento en diferentes condiciones de temperatura, pH y nivel de salinidad, además de los resultados de las pruebas de movilidad y producción de CO₂, tanto en los cocos como en bacilos aislados.

Tabla 4-4: Pruebas de caracterización en agar M17

N°	CÓDIGO	MOVILIDAD	PRODUCCIÓN DE CO ₂ A PARTIR DE GLUCOSA	CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS		TOLERANCIA A CLORURO SÓDICO		TOLERANCIA A DIFERENTE pH	
				10 °C	45 °C	6.5 %	18 %	4.4	9.6
1	CO 13	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
2	CO 14	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
3	CO 15	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
4	CO 16	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
5	CO 25	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
6	CO 26	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
7	CO 27	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
8	CO 28	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
9	CO 37	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
10	CO 38	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
11	CO 39	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg

12	CO 40	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
13	CO 44	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
14	CO 45	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
15	CO 46	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
16	CO 47	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg

CO: Codificación usada para definir colonias de cocos seguido del número de colonia analizada.

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez Joao, 2022

Del total de las cepas aisladas presentan características muy poco variables, facilitando las pruebas de caracterización para la posible identificación de los géneros. Una vez ya identificadas las cepas aisladas en el medio M17 como BAL se seleccionaron 16 colonias y se procedió a la realización de las pruebas de caracterización siendo esta movilidad, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia a NaCl y crecimiento a diferentes pH. En cuanto a la prueba de movilidad las 16 colonias aisladas del medio M17, no presentaron movilidad alguna en agar SIM lo que se puede comprobar en el trabajo realizado por (Fernández, 2019, p 6); (Vargas, 2018, p 80); (Ramírez, 2010, p 10), los cuales nos indican que las cepas de BAL presentan una tinción Gram positiva, no esporuladas y sin movilidad.

En la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa 15 de las 16 colonias son negativas para la producción de gas por ende son homofermentativas y solo en la colonia CO14 se logró evidenciar la presencia de dióxido de carbono, lo cual indicaría que es heterofermentativa, también se pudieron notar diferencias durante la realización de la prueba ya que la colonia CO26, CO28 y CO39 no presentaron cambios de coloración de rojo a naranja. Esto se respalda con lo realizado por (Ramírez y Vélez 2018, p 121), que nos indica que las BAL se pueden clasificar en 2 grandes grupos dependiendo de la ruta metabólica usada para fermentar glucosa. Las homofermentativas, las cuales no producen CO₂ ya que su ruta metabólica convierte la glucosa en ácido láctico mediante glucólisis, el segundo grupo son las heterofermentativas, estas usan la ruta de las pentosas para generar ácido láctico, CO₂, ácido acético y etanol.

En la prueba de tolerancia a diferentes temperaturas, las cepas fueron sometidas a dos temperaturas distintas siendo estas 10 °C y 45 °C y el resultado es que 2 de las 16 cepas analizadas no presentaron crecimiento a 45 °C siendo estas las cepas CO15 y CO26 mientras que las 14 cepas restantes fueron tolerantes al cambio de temperaturas ya que se evidenció el crecimiento en ambas condiciones. Esto concuerda con lo demostrado por (Doyle, 2016, p. 55-92), el cual menciona que las BAL debido a que al estar presentes en los alimentos se encuentran en constante manipulación y cambios abruptos de temperatura y es por esto que las BAL han desarrollado diversos mecanismos adaptativos a nivel genético como son la producción de proteínas de choque térmico en el caso

de presentarse ambientes con temperaturas elevadas o proteínas inducidas por el frío en caso que las condiciones de temperatura sean bajas de tal modo que estas adaptaciones permiten garantizar la supervivencia de la colonia.

Las cepas aisladas en medio de cultivo M17 fueron evaluadas frente a condiciones de salinidad para esto se usó un medio enriquecido con NaCl a un 6.5 y 18% respectivamente dando como resultado que las 16 cepas testeadas 9 fueron positivas en crecimiento a un medio enriquecido con NaCl al 6.5% y en las 7 restantes no se evidenció desarrollo, al analizar el desarrollo de las colonias frente a un medio con una salinidad de 18% se logró evidenciar que no hubo crecimiento alguno en ninguna de las cepas lo que se puede confirmar con lo estipulado por (Vargas, 2018, p. 14), donde menciona que las BAL poseen un desarrollo variable en condiciones de salinidad al 6.5 mientras que no existe crecimiento en concentraciones de 18% a excepción de especies pertenecientes al género de *Tetragenococcus*.

Las cepas aisladas en el medio de cultivo M17 también fueron analizadas frente a distintas condiciones de pH con el objetivo de determinar su tolerancia a distintos pH siendo estos 4.4 y 9.6 respectivamente, dando como resultado que de las 16 cepas analizadas todas crecieron a un pH de 4.4, sin embargo, al someter las colonias a condiciones de pH básico siendo este un pH de 9.6 de las 16 colonias 7 no presentaron crecimiento. Esto concuerda con los resultados obtenidos por (Vargas, 2018, p. 47)., donde analizaron cepas BAL aisladas de queso en la cual se menciona que la tolerancia de las BAL a un pH de 4.4 es variable mientras que en un pH de 9.6 si se desarrollan las cepas BAL a excepción del género *Lactococcus* el cual no tolera estas condiciones (Ray y Arun 2010, p 70-71).

Tabla 5-4: Pruebas de caracterización en agar MRS

Nº	CÓDIGO	MOVILIDAD	PRODUCCIÓN DE CO ₂	CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS		TOLERANCIA A CLORURO SÓDICO		TOLERANCIA A DIFERENTE pH	
				10 °C	45 °C	6.5 %	18 %	4.4	9.6
1	BA 1	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
2	BA 2	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
3	BA 3	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
4	BA 4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
5	BA 13	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
6	BA 14	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
7	BA 15	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
8	BA 16	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
9	BA 17	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
10	BA 18	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
11	BA 19	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
12	BA 20	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg

13	BA 41	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
14	BA 42	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
15	BA 43	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
16	BA 44	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
17	BA 45	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
18	BA 49	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
19	BA 50	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg

BAL: Codificación usada para definir colonias de bacilos seguido del número de colonia analizada.

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Una vez ya identificadas las cepas aisladas en el medio MRS como BAL se seleccionaron 19 colonias y se procedió a la realización de las pruebas de caracterización siendo esta movilidad, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia a NaCl y crecimiento a diferentes pH.

En cuanto a la prueba de movilidad las 19 colonias aisladas del medio MRS analizadas no presentaron movilidad alguna en agar SIM lo que se puede comprobar en el trabajo realizado por (Cobos y Tapia, 2019, p 9); (Requena, 2018, p 3), indican que el género *Lactobacillus* es el agente probiótico más comúnmente usado; son bacterias Gram positivas, no móviles, no forman esporas, catalasa negativa, con forma de bacilos y su principal característica es la formación de ácido láctico como producto prioritario de la fermentación.

En la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa las 19 colonias son negativas para la producción de CO₂ por ende son homofermentativas, pero también se pudieron notar diferencias durante la realización de la prueba ya que la colonia BA15, BA18 y BA42 no presentaron cambios de coloración de rojo a naranja, además las colonias BA42 y BA43 presentaron un crecimiento en la superficie del medio. Esto se respalda con lo realizado por (Sánchez y Tromps 2014, p. 124), los cuales nos indican que las BAL se subdividen en bacterias homo y heterofermentativas como resultado de los productos de su metabolismo las primeras se caracterizan por que el único producto de la fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico mientras que las segundas pueden originar otros productos como CO₂, etanol o ácido acético.

En la prueba de tolerancia a diferentes temperaturas se analizaron las cepas a dos temperaturas distintas siendo estas 10 °C y 45 °C, las 19 cepas fueron tolerantes al cambio de temperaturas ya que se evidenció el crecimiento en ambas temperaturas esto concuerda con lo demostrado por (Vargas, 2018 p. 43-49), se evaluaron BAL aislados de muestras de quesos y sus resultados fueron positivos en el crecimiento de colonias tanto de cocos como bacilos en temperaturas de 10 °C y 45 °C lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

Las cepas aisladas en medio de cultivo MRS fueron evaluadas frente a condiciones de salinidad para esto se usó un medio enriquecido con NaCl a un 6.5 y 18% respectivamente dando como resultado que de las 19 cepas evaluadas 10 fueron positivas en crecimiento a un medio enriquecido con NaCl al 6.5% y en el caso de las 9 restantes no se evidenció desarrollo en esas concentraciones de sal, mientras que al analizar las colonias frente a un medio con una salinidad de 18%, 8 de las colonias crecieron en estas condiciones mientras que 11 de las colonias no crecieron en estas condiciones de salinidad.

Las cepas aisladas en el medio de cultivo MRS también fueron sometidos frente a distintas condiciones de pH con el objetivo de determinar su tolerancia a distintos pH siendo estos 4.4 y 9.6 dando como resultado que de las 19 cepas únicamente 18 crecieron a un pH de 4.4, siendo la colonia BA43 la que no toleró el medio ácido y por ende no existió crecimiento de colonias, sin embargo al someter las colonias a condiciones de pH básicas siendo esta un pH de 9.6 de las 19 colonias 10 de ellas presentaron crecimiento mientras las 9 colonias restantes en las cuales no se presentó crecimiento, siendo la colonia BA43 la única en la que no se evidenció crecimiento en ninguno de las dos condiciones de pH. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el trabajo realizado por (Vargas, 2018, p. 44) en el cual se analizaron 15 cepas BAL de las cuales 12 se desarrollaron en condiciones de pH 4.4 y 10 de estas cepas se desarrollaron a pH 9.6.

Mediante la realización de estas pruebas se puede determinar que de las 35 colonias analizadas 2 podrían tratarse de bacterias del género *Lactococcus cremoris* mientras que 16 de estas colonias podrían tratarse presumiblemente de *Lactococcus lactis*. Esto considerando las características citadas por (Ray y Arun 2010, p 70-71). En la cual se menciona que el género *Lactococcus* no se desarrolla en concentraciones de NaCl de 6.5% o ni tampoco a un pH de 9.5, además también se indica que en este género existen 2 subespecies *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* y se diferencian únicamente debido a la incapacidad que tiene el *Lactococcus cremoris* para crecer en temperaturas de 40 °C. En cuanto a las 17 colonias restantes no se pudieron caracterizar debido a que las BAL tienen perfiles de tolerancia variables lo cual dificulta su caracterización.

Cabe recalcar que estas pruebas no permiten descartar ninguna de las colonias ya que son pruebas para tratar de identificar a que genero pertenece la colonia pero esto es complicado en el caso de las BAL ya que tal como se indica en trabajos realizados como el de (Vargas, 2018, p. 44). Las BAL comparten muchas de estas características y en además algunos de sus perfiles de tolerancia son variables por lo tanto estas pruebas no permiten una caracterización certera de las bacterias.

4.1.4 Pruebas de actividad probiótica

4.1.4.1 Capacidad hemolítica

En la tabla 6-4 se encuentran los resultados obtenidos en la prueba de hemólisis, esta prueba nos permite determinar la capacidad que tiene la cepa para provocar una lisis parcial o completa de los glóbulos rojos presentes en el medio de agar sangre.

Tabla 6-4: Resultados de prueba de capacidad hemolítica

N°	CÓDIGO	CEPAS	β	α	γ
1	CO 13		+	-	-
2	CO 14		-	+	-
3	CO 15		-	+	-
4	CO 16		-	+	-
5	CO 25		-	+	-
6	CO 26	CO#1	-	-	+
7	CO 27		+	-	-
8	CO 28	CO#2	-	-	+
9	CO 37		-	+	-
10	CO 38		-	+	-
11	CO 39	CO#3	-	-	+
12	CO 40		-	+	-
13	CO 44		-	+	-
14	CO 45		-	+	-
15	CO 46		+	-	-
16	CO 47	CO#7	-	-	+
17	BA 1		-	+	-
18	BA 2		-	+	-
19	BA 3		-	+	-
20	BA 4		-	+	-
21	BA 13		-	+	-
22	BA 14		-	+	-
23	BA 15	BA#4	-	-	+
24	BA 16		-	+	-
25	BA 17		-	+	-
26	BA 18	BA#5	-	-	+
27	BA 19		-	+	-
28	BA 20		-	+	-
29	BA 41		-	+	-
30	BA 42	BA#6	-	-	+
31	BA 43		-	+	-
32	BA 44		-	+	-
33	BA 45	BA#8	-	-	+

34	BA 49	-	+	-
35	BA 50	-	+	-

CO#: Codificación usada para la selección de colonias de cocos seguido del número de colonia analizada.

BAL#: Codificación usada para la selección de colonias de bacilos seguido del número de colonia analizada.

β: Hemólisis beta / **α:** Hemólisis alfa/ **γ:** Hemólisis gama

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Se aplicó la prueba de capacidad hemolítica a 16 cepas de cocos y las 19 cepas de bacilos teniendo como resultado que, de los 16 cocos, 4 colonias son consideradas como **γ**-hemólisis siendo estas las colonias CO26, CO28, CO39 y CO47, 3 colonias son positivas en **β**-hemólisis siendo estas CO13, CO27 y CO46, además 9 dieron resultados positivos para **α**-hemólisis. Al referirnos a las colonias aisladas en medio MRS de las 19 cepas, 4 colonias presentaron **γ**-hemólisis siendo estas las colonias BA15, BA18, BA42 y BA45, en las 15 cepas restantes se logró evidenciar la presencia de **α**-hemólisis. Estos resultados nos permiten descartar las cepas que presentan **β**-hemólisis y **α**-hemólisis ya que estas cepas no podrían ser usadas como probióticos tal y como lo indica (Palacios y Rivas, 2019, p. 83), los lactobacilos presentan en su mayoría una hemólisis **γ** lo que indicaría que es una bacteria no patógena debido a que no produce lisis en las células sanguíneas contenidas en el agar sangre cumpliendo así con el primer requisito para seleccionarlas como probióticas.

De la misma manera (Castañeda et al., 2018: p.433); (Nandi et al., 2017: p.12-21); (Pereira et al. 2017: p. 123), afirma que una de las características más importante que se debe tener en cuenta para determinar y seleccionar bacterias con posible actividad probiótica es la ausencia de actividad hemolítica, propiedad presente en algunas bacterias patógenas potenciales. Esta actividad está determinada por la producción de hemolisina, un factor de virulencia que produce lisis de los eritrocitos. Las cepas hemolíticas son causantes frecuentes de anemia y edema, motivo por el cual es preferible no seleccionarlas. Es por esto por lo que en este estudio se descartaron las bacterias productoras de hemolisina debido a su potencial patogenicidad.

4.1.4.2 Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares

En la tabla 7-4, se observan los resultados del porcentaje de supervivencia en condiciones de simulación a jugos gástricos con un pH ajustado de 3 de las colonias seleccionadas de bacterias ácido lácticas (cocos y bacilos).

Tabla 7-4: Porcentaje de supervivencia a la simulación de tolerancia a jugos gástricos (pH 3)

N°	CEPAS	UFC (N ₁)		UFC (N ₀)		% DE SUPERVIVENCIA
1	CO#1	2.7 × 10 ⁶	UFC/ml	2.06 × 10 ¹⁰	UFC/ml	64,75
2	CO#2	2.62 × 10 ⁷	UFC/ml	7.8 × 10 ⁹	UFC/ml	76,64
3	CO#3	6.6 × 10 ⁶	UFC/ml	8.1 × 10 ⁹	UFC/ml	70,88
4	BA#4	1.85 × 10 ⁶	UFC/ml	1.345 × 10 ¹⁰	UFC/ml	64,34
5	BA#5	1.265 × 10 ⁶	UFC/ml	1.625 × 10 ¹⁰	UFC/ml	62,34
6	BA#6	1.535 × 10 ⁶	UFC/ml	1.19 × 10 ¹⁰	UFC/ml	63,90
7	CO#7	1.505 × 10 ⁶	UFC/ml	5.4 × 10 ⁹	UFC/ml	56,33
8	BA#8	2.61 × 10 ⁶	UFC/ml	2.29 × 10 ⁹	UFC/ml	70,74

CO#: Codificación usada para definir colonias de *Lactococcus* seguido del número de colonia analizada.

BA: Codificación usada para definir colonias de *Lactobacillus* seguido del número de colonia analizada

UFC: Unidades formadoras de colonias

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022

Como se puede evidenciar en la Tabla 7-4 las bacterias aisladas de leche cruda demostraron una tolerancia a jugos gástricos con un pH de 3.0, mostrando tasas de supervivencia superiores al 50% esto concuerda con análisis realizados con otras bacterias con actividad probiótica como es el caso de la investigación realizada por (Ramírez et al. 2020: p. 310), donde evaluó la tolerancia de *Lactobacillus pentosus* a jugos gástricos con un pH de 2.0 dando como resultado que algunas de las cepas aisladas no crezcan en esas condiciones es por eso que optó por la modificación a un pH de 3.0 en el cual se evidenció la tolerancia de todas las cepas aisladas. En este artículo se menciona que la resistencia a pH bajo (2,0-3,0) es un factor crítico para la selección de un probiótico debido a que los microorganismos deben ser capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables en el estómago durante el tránsito digestivo. Se sabe que la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en condiciones ácidas varía de una especie a otra y depende directamente de la concentración de iones hidronio que se acumulan en el interior de la célula (Ramírez et al. 2020: p. 310).

Tabla 8-4: Porcentaje de supervivencia frente a la simulación de tolerancia a sales biliares

N°	CEPAS	UFC (N ₁)		UFC (N ₀)		% DE SUPERVIVENCIA
1	CO#1	1 × 10 ⁹	UFC/ml	2.06 × 10 ¹⁰	UFC/ml	88,07
2	CO#2	7 × 10 ⁸	UFC/ml	7.8 × 10 ⁹	UFC/ml	90,11
3	CO#3	3.3 × 10 ⁸	UFC/ml	8.1 × 10 ⁹	UFC/ml	86,90
4	BA#4	2.925 × 10 ⁸	UFC/ml	1.345 × 10 ¹⁰	UFC/ml	84,64
5	BA#5	7.5 × 10 ⁸	UFC/ml	1.625 × 10 ¹⁰	UFC/ml	87,76
6	BA#6	6.2 × 10 ⁸	UFC/ml	1.19 × 10 ¹⁰	UFC/ml	88,09
7	CO#7	7.5 × 10 ⁸	UFC/ml	5.4 × 10 ⁹	UFC/ml	91,78

8	BA#8	3.11×10^8	UFC/ml	2.29×10^9	UFC/ml	91,38
---	-------------	--------------------	--------	--------------------	--------	-------

CO#: Codificación usada para definir colonias de *Lactococcus* seguido del número de colonia analizada.

BA: Codificación usada para definir colonias de *Lactobacillus* seguido del número de colonia analizada

UFC: Unidades formadoras de colonias

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Como se puede evidenciar en la Tabla 8-4 las bacterias aisladas de leche cruda demostraron una fuerte tolerancia a sales biliares con una concentración de 0.3%, mostrando tasas de supervivencia superiores al 80% esto concuerda con análisis realizados con otras bacterias con actividad probiótica como es el caso de la investigación realizada por (Ramírez et al. 2020: p. 310), donde evaluó la tolerancia de *Lactobacillus pentosus* a las sales biliares dando como resultado tasas de supervivencia similares a las obtenidas. En este artículo se menciona que la capacidad de resistir la acción bactericida de las sales biliares está directamente relacionada con la síntesis de hidrolasas que provocan su desconjugación, evitando así la disolución de las membranas celulares de las BAL.

4.1.4.3 Resistencia a antibióticos

En la tabla 9-4 se reportan los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad a antibióticos más comunes usados para tratar las enfermedades de infección gastrointestinal.

Tabla 9-4: Resultados de resistencia a antibióticos

N°	CÓDIGO	CEPAS	ST	E	CIP	TE	V	C
1	CO 26	CO#1	R	S	I	R	S	S
2	CO 28	CO#2	R	S	I	R	I	S
3	CO 39	CO#3	R	S	I	R	I	S
4	CO 47	BAL#4	R	I	R	R	I	S
5	BA 15	BAL#5	R	S	R	S	I	S
6	BA 18	BAL#6	R	R	R	R	S	S
7	BA 42	CO#7	R	S	I	R	I	S
8	BA 45	BAL#8	R	S	R	R	I	S

CO: Cocos seleccionados para análisis

BA: Bacilos seleccionados para análisis

ST: Estreptomina

E: Eritromicina

CIP: ciprofloxacina

TE: tetraciclina

V: vancomicina

C: cloranfenicol

R: resistente

S: sensible

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana (AST) se realizó para todas las colonias en las que se pudo evidenciar una hemólisis gamma utilizando el método de difusión en disco denominado método Kirby Bauer se determinó la resistencia, resistencia intermedia y sensibilidad para cada microorganismo mediante la comparación de los resultados obtenidos en la medición del halo de inhibición con la referencia del diámetro en mm para cada antibiótico. Debido a que no logró encontrar una tabla para la determinación de la AST en bacterias ácido lácticas se tomó como referencia el trabajo realizado por (Reuben et al. 2020: p. 1226), en el cual se realizó la prueba AST a cepas aisladas de BAL considerando los siguientes parámetros: Los aislamientos se clasificaron como sensibles (≥ 21 mm), intermedios (16–20 mm) o resistentes (≤ 15 mm). Usando estas medidas de corte como referencia se logró evidenciar que las 8 cepas aisladas son resistentes a la Estreptomina, en el caso de la Eritromicina 6 de las colonias presentan sensibilidad mientras que la colonia CO47 tuvo una sensibilidad intermedia y la colonia BA18 demostró resistencia. Al evaluar la resistencia con frente a Ciprofloxacina se pudo observar que 4 colonias presentan una sensibilidad intermedia siendo estas CO26, CO28, CO39 y BA42, mientras que las colonias CO47, BA15, BA18 y BA45 demostraron ser resistentes al medicamento. En la evaluación frente a la Tetraciclina se evidenció que 7 de las cepas son resistentes siendo la única en presentar sensibilidad la colonia BA15. El último medicamento para evaluar fue el Cloranphenicol cuyos resultados fueron que todas las cepas fueron sensibles a este fármaco.

4.1.4.4 Evaluación del efecto antagónico

Determinar el efecto de inhibición de una bacteria ácido láctica sobre cepas patógenas es transcendental para establecer su potencial probiótico, los resultados se muestran en la Tabla 10-4.

Tabla 10-4: Evaluación del efecto antagónico

N°	Bacteria patógena	CO#1	CO#2	CO#3	BAL#4	BAL#5	BAL#6	CO#7	BAL#8
1	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
2	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
3	<i>P. aeurigenosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
4	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
5	<i>C. freundii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Resistente

S: Sensible

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Como se aprecia en la Tabla 10-4 ninguna de las cepas aisladas de leche cruda presentó antagonismo frente a las cepas patógenas analizadas: *E. coli*; *S. aureus*; *P. aeurigenosa*; *K. pneumoniae* y *C. freundii*. Pero esto no es un indicativo de que no presenten antagonismos frente a otras cepas de bacterias patógenas. En el artículo realizado por (Rivera et al. 2017: p. 792), en el cual se obtuvieron 55 aislamientos bacterianos aisladas a partir de muestras de quesos artesanales de México y fue evaluada su capacidad antagonica frente a *Salmonella enterica var. Typhimurium* y cuyo resultado fue que de estas 55 cepas 31 aislamientos bacterianos fueron considerados como BAL y 11 de estos presentaron un efecto inhibitor frente a *Salmonella enterica var. Typhimurium*, de estas 11 cepas se lograron identificar colonias de: *Lactococcus lactis*; *Lactococcus cremoris* y *Leuconostoc spp.* Otra investigación realizada por (Gámez et al. 2016: p. 23), evaluó la actividad antagonica del *Lactococcus lactis* frente a *Yersinia pseudotuberculosis*. Para esto se usaron diferentes volúmenes de *Lactococcus lactis* en caldo siendo estos de 50; 75; 100 y 150 µl y cuyos resultados fueron la presencia de halos de inhibición de 3; 4; 4; 3 mm de diámetro respectivamente, en este mismo artículo se indica que esta capacidad inhibitoria se debe a que el *Lactococcus lactis* produce compuestos como ácidos, peróxido de hidrogeno y nisina lo cual le otorga la capacidad antimicrobiana.

Un trabajo realizado por (Gámez y Jarrin, 2015, p. 53-54) se evaluó el efecto antagónico de *Lactobacillus lactis* ATCC® 11454 a tres volúmenes de caldo diferentes 25; 50 y 100 µl frente a *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC® 25241, *Clostridium perfringens* ATCC® 13124 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 y cuyos resultados fueron que la cepa de *L. lactis* fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de *C. perfringens* y *E. coli* en los tres volúmenes, en el caso de la cepa de *S. typhimurium* solo se evidenció un halo de inhibición con el volumen de 100 µl y por ultimo frente al *S. aureus* no se evidenció la presencia de inhibición.

La discrepancia de los resultados obtenidos en este proyecto de integración curricular con el trabajo realizado por (Gámez y Jarrin, 2015, p. 53-54) se puede deber a que en ese trabajo se usaron cepas de bacterias ATCC® siendo estas cepas bacterianas estandarizadas por la industria alimentaria y farmacéutica para su uso en experimentación y control de calidad, debido a que las bacterias en general tienen una gran variabilidad genética dada por mecanismos de recombinación genética que permiten su adaptación, las colonias pueden presentar distintas susceptibilidades o resistencias aunque estas pertenezcan a la misma especie (Benator et al. 2016: p. 59).

Tabla 11-4: Identificación mediante PCR de las bacterias BAL seleccionadas.

N°	CODIGO	CEPAS	Género
1	CO 26	CO#1	<i>Lactococcus cremoris</i>
2	CO 28	CO#2	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
3	CO 39	CO#3	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
4	CO 47	BAL#4	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
5	BAL 15	BAL#5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
6	BAL 18	BAL#6	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>

CO: Cocos seleccionados para análisis

BAL: Bacilos seleccionados para análisis

Fuente: Laboratorio IDGEM, 2022.

Realizado por: Inca, Jocelyne; Martínez, Joao, 2022.

Las colonias bacterianas seleccionadas fueron enviadas al laboratorio IDGEM de la ciudad de Quito para la realización de pruebas moleculares y su correcta identificación dando como resultado la identificación de la cepa CO#1: *Lactococcus cremoris* con un 99.53% de fiabilidad siendo ésta una especie deseable dado que contribuye con propiedades organolépticas; además de brindar un presuntivo efecto de protector contra patógenos y es ampliamente usada en productos lácteos. Y las cepas CO#2, CO#3, BAL#4, BAL#5 y BAL#6: *Lactococcus lactis subs. lactis* con una fiabilidad media de 99.7%. Estos resultados se los puede observar a más detalle en el Anexo J en el cual se presenta el informe emitido por el laboratorio IDGEM en el que constan los detalles técnicos, las condiciones de extracción de ADN, las subunidades de ADN usadas para la identificación y el resultado de la prueba de electroforesis.

CONCLUSIONES

- Se aislaron cepas de bacterias ácido lácticas de diferentes muestras de leche cruda de la parroquia San Luis, mediante la técnica de siembra por extensión y purificación, de las cuales según su morfología y crecimiento en agar selectivo M17 para cocos y agar MRS para bacilos, permitió seleccionar 50 cepas de bacilos y 50 cepas de cocos para posterior análisis e identificación, finalmente se obtuvo el aislamiento de 8 bacterias ácido lácticas con un porcentaje de pureza media del 90.6% lo que se pudo constatar con el informe de los resultados de las pruebas de PCR que se le realizaron a 6 de estas 8 colonias bacterianas dando como resultado la identificación de los géneros *Lactococcus cremoris* en un 16.6% de las muestras evaluadas y *Lactococcus lactis subsp lactis* en un 83.3%.
- Las cepas fueron sometidas a diferentes pruebas de identificación bioquímica propias de bacterias ácido lácticas, donde se seleccionaron en agar M17 que corresponde a 16 *Lactococcus* y en agar MRS a 19 *Lactobacillus*, que cumplieron con la caracterización microscópica de ser Gram positivas, oxidasa y catalasa negativa, asimismo cada una de las colonias fueron analizadas frente a diferentes pruebas fenotípicas de caracterización específicas dando como resultado la presunta identificación de colonias pertenecientes al género *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus cremoris*.
- Se realizaron las pruebas de actividad probiótica a las 8 colonias obtenidas, dando como resultado que las mismas cumplen con 3 de los requisitos para ser consideradas probióticas. En su totalidad presentaron tolerancia frente a simulación a jugos gástricos y sales biliares, las colonias presentaron hemólisis gamma y resistencia a antibióticos, por el contrario al momento de realizar la prueba de actividad antagónica estas no presentaron antagonismo frente a los agentes patógenos analizados siendo estos: *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomona aeruginosa*; *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, las cepas evaluadas fueron enviadas al laboratorio IDGEM de la ciudad de Quito en donde se realizó la prueba de identificación molecular de 6 de las 8 cepas evaluadas dando como resultado la identificación de los géneros *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis subsp. Lactis*.

RECOMENDACIONES

- Fomentar la continuidad de la investigación realizando estudios posteriores de una mayor evaluación in vitro, donde estas cepas de BAL podrían considerarse a futuro posible candidatas a probióticos con aplicación en la industria alimentaria como también llevar a cabo la caracterización de aquellas cepas que no pudieron ser identificadas en este estudio.
- Las bacterias BAL identificadas en el presente trabajo fueron en su mayoría *Lactococcus lactis sub. lactis*, se requiere un análisis más profundo y con mayor estudio ya que las mismas presentaron diferencias notorias durante las pruebas realizadas.
- Continuar con la investigación de la capacidad probiótica probando nuevos procesos y técnicas avanzadas que ayuden a corroborar que las cepas bacterianas aisladas e identificadas cumplan con la totalidad de ser considerados bacterias ácido lácticas con actividad probiótica.

BIBLIOGRAFÍA

AJCET, M y ALFARO, K. *Evaluación del crecimiento de bacterias ácido-lácticas aisladas de un gallo criollo en biopreparado y análisis de su actividad probiótica in vitro. (Trabajo de titulación) (Licenciatura). Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Zamorano-Honduras. 2020. pp. 22.*

ALBUJA, A. et al. *Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus aureus aislado en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba-Ecuador". PERFILES [en línea], 2018, (Ecuador) 2(20), pp. 20-26. Disponible en: http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9391/1/per_n20_v2_09.pdf.*

ÁLVAREZ, M et al. *Uso de probióticos para estimulación del sistema inmune en pollos de engorde". ECUADOR ES CALIDAD [en línea], 2020, (Ecuador). Disponible en: <https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/download/85/243/>.*

AGUILERA, A et al. *Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria". Ciencia y Agricultura [en línea], 2014, (Colombia). Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/article/view/3860/3398.*

AMOROCHO, C. *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja gurrá. (Trabajo de titulación) (Doctorado). Universidad politécnica de valencia, Departamento de biotecnología. Valencia-España. 2018. pp. 189.*

ARÉVALO, P. *Viabilidad del cultivo iniciador y propionibacterium freudenreichii subesp shermanii durante el proceso de maduración del queso emmenthal y su impacto nutricional. (Trabajo de titulación) (Pregrado). Pontificia universidad javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá-Colombia. 2018. pp. 14.*

AYYASH, M et al. *In-vitro investigation into probiotic characterisation of Streptococcus and Enterococcus isolated from camel milk. LWT - Food Science and Technology [en línea], 2018, (Emiratos Arabes Unidos). pp. 478-485 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817306941>.*

BANERJEE, G y RAY, A. *The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries.* Research in Veterinary Science [en línea], 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>

BETANCOR, L et al. *Temas de bacteriología y virología médica.* 3ra Ed. Montevideo, Uruguay: UDELAR. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, 2008, pp. 65-90. Disponible en: <http://130.206.160.21/rid=1NQMWD86S-1N93KN5-R6/GeneticaBacteriana.pdf>.

BRUNSER, O. *Inocuidad, prevención y riesgos de los probióticos.* Revista Chilena de Pediatría [en línea], 2017. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v88n4/art15.pdf>.

CABEZAS, M. *Evaluación de la Capacidad de Colonización Intestinal de un Lactobacillus sp Proveniente de un Fermento Comercial.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y ambiente. Quito-Ecuador. 2018. pp. 9.

CALDERÓN, A et al. *Indicators of Raw Milk Quality in Different Regions of Colombia".* Revista MVZ Cordoba [en línea], 2006. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006&script=sci_abstract&tlng=pt.

CASTAÑEDA, E et al. *Identificación molecular de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas aisladas del intestino posterior de tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus).* Revista de Investigaciones Altoandinas [en línea], 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v20n4/a06v20n4.pdf>.

CHASI, W. *Aislamiento de microorganismos probióticos del tracto intestinal de Gallus gallus en tres estadios fisiológicos de pollos.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias. Riobamba-Ecuador. 2015. pp. 20-30.

CUETO, M et al. *Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño".* Actualidades Biológicas [en línea], 2010, (Colombia). 32(93), pp. 129-138. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v32n93/v32n93a1.pdf>.

COBOS, E y TAPIA, H. *Caracterización de bacterias ácido-lácticas a partir de leche bovina del cantón Cayambe con potencial probiótico en animales.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad politécnica salesiana del Ecuador. Quito-Ecuador. 2019. pp. 9.

CORRALES, L et al. *Estudio descriptivo de las prácticas de manufactura en la industria panelera de los trapiches San Francisco y La Esmeralda en Boyacá y Caldas*". NOVA [en línea], 2012, (Colombia) 10(18), pp. 135-250. Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Figura-11-Lactococcus-lactis-Observacion-microscopica-con-objetivo-de-40x-Discusion-La_fig5_316655509.

DOYLE, M. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. New York: Springer, 2016, pp. 55-92.

FAO/OMS. *Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*". *Estudio FAO alimentación y nutrición* [en línea], 2002, (Argentina). 85(1), pp. 1-8. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s.pdf>.

FDA. *Los peligros de la leche cruda*. Food and Drugs Administration [en línea], 2020, (United State of America). pp. 1-4. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/food/published/The-Dangers-of-Raw%20Milk-Spanish.pdf>.

FERNÁNDEZ, P. *Caracterización fenotípica de tres cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de un consorcio presente en una leche fermentada natural*. (Trabajo de fin de grado) (Postgrado). Universidad de León. Leon-España. 2019. pp. 6.

GAMBOA, Y et al. *Resistencia microbiana a los antibióticos: Un problema de salud creciente*". *Hallazgos21* [en línea], 2022, (Ecuador) 7(1), pp. 103-114. Disponible en: <https://revistas.pucese.edu.ec/hallazgos21/article/view/562/517>.

GÁMEZ, H et al. *Cinética, prueba de crecimiento y efecto de inhibición de Lactococcus lactis sobre Yersinia pseudotuberculosis*. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustria* [en línea], 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a03.pdf>.

GÁMEZ, H y JARRÍN, V. *Cinética de crecimiento de Lactobacillus lactis y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas*. *Revista Biosalud* [en línea], 2015, (Colombia) 14(2), pp. 49-62. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v14n2/v14n2a05.pdf>.

GONZÁLES, G et al. *Calidad de la leche cruda. [Foro] Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz*. [en línea], 2010, (México). pp. 1-10. Disponible en: https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf.

GONZÁLES, J et al. *La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio*". *Acta Médica Peruana* [en línea], 2019, (Perú) 36(1), pp. 145-151.. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172019000200011.

GUARNER, F et al. *Probióticos y prebióticos*". *Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología*. [en línea], 2019, (Unated State of America). pp. 15. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>.

HERNÁNDEZ, J et al. *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de abejas adultas apis mellifera*". *Salud Animal* [en línea], 2020, (Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v42n2/2224-4700-rsa-42-02-e07.pdf>).

INTE. *Proyecto Nacional de Lechería del INTA. [Blog]. 2018. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.* [Consulta: 15 Octubre 2022]. Disponible en: http://rafaela.inta.gov.ar/proy_nac_lecheria/articulo_1.pdf.

INSST. *Streptococcus spp.* [Blog]. 2022. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-spp>.

JOFRÉ, L et al. *Infección por Leuconostoc en pacientes con síndrome de intestino corto, nutrición parenteral y alimentación enteral continua.* *Revista Chilena de Infectología* [en línea], 2017, (Chile), pp. 340. [Consulta: 20 Junio 2022]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v23n4/art08.pdf>.

JONES, R. *Chapter 9 - The use of Lactobacillus casei and Lactobacillus paracasei in clinical trials to improve human health* [En línea]. Atlanta-USA: Academic Press, 2017. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128040249000094#!>.

KOSKINEN, P et al. *Complete genome sequence of Propionibacterium freudenreichii DSM 20271T.* *Standarts in Genomic Science* [en línea], 2015, (Finlandia). 10(83), pp. 2. [Consulta: 20 Junio 2022]. Disponible en: <https://environmentalmicrobiome.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40793-015-0082-1#Fig2>.

LAHTINEN, S et al. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* 4ª ed. New York- United State of America: CRC Press, 2012, pp. 7-17.

LANDA, P et al. *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano.* Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias [en línea], 2019, (México). 10(1), pp. 71. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v10n1/2448-6698-rmcp-10-01-68.pdf>.

LASCANO, J. *Análisis microbiológico y resistencia a antibióticos de la leche cruda de bovino comercializada en el mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador. 2016. pp. 10-12.

LATORRE, I. *Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas de ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid-España. 2011. pp. 25.

LIU, W et al. *Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria".* Journal of Dairy Science [en línea], 2020, (Mongolia). 103(5), pp. 102-105. Disponible en: <https://www.journalofdairyscience.org/action/showPdf?pii=S0022-0302%2820%2930157-0>.

LLUMÁN, M y RAMÍREZ, P. *Evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda almacenada en centros de acopio de la provincia de Chimborazo.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2019. pp. 7.

MARIÑO, A et al. *Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos.* Pediatría Integral [en línea], 2028, (Cuba). 19(5), pp. 337-354. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/actamedica/acm-2016/acm161g.pdf>.

MARTÍNEZ, A et al. *Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba".* Salud Animal [en línea], 2017, (Cuba). 38(1), pp. 51-61 Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n1/rsa07117.pdf>.

MOSQUERA, E. *Características tecnológicas de bacterias ácido lácticas (BAL) en leche de cabra.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Quito-Ecuador. 2019. pp. 6-8.

NANDI, A et al. *Probiotic Potential of Autochthonous Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of Four Freshwater Teleosts*. Springer [en línea], 2017, (United State of America). 174(1), pp. 12-21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27557836/>.

NTE INEN 9: 2015. *Leche cruda. Requisitos* [en línea]. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_009_6r.pdf.

NTE INEN 1529-2: 2013. *Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.* [en línea]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-2.pdf>.

NTE INEN 1529-1: 2013. *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos.* [en línea]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-1-1R.pdf>.

OLIVEIRA, J. *Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso , para el control de Clostridium spp. responsables del defecto de “ hinchazón tardía”.* (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de la República de Uruguay, Facultad de Agronomía. Montevideo-Uruguay. 2018. pp. 130.

OLIVEIRA, J. *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo-Mexico. 2017. pp. 20.

PALACIOS, J y RIVAS, E. *Aislamiento y caracterización de bacterias acidolácticas (BAL) obtenidas de Oreochromis niloticus (tilapia) cultivadas en jaulas flotantes en el lago de Ilopango El Salvador.* (Trabajo de titulación) (Licenciatura). Universidad de El Salvador. San Salvador-El Salvador. 2019. pp. 83.

PARRA, R. *Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos.* BIO-AGRO [en línea], 2010, (Colombia). 8(1), pp. 93-104 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.

POLTRONIERI, P. *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities.* Verona-Italia: Wiley-Blackwell, 2018, pp. 161-172.

PRINGSULAKA, O et al. *In vitro screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics*". Livestock Science [en línea], 2015, (Tailandia). 174(1), pp. 66-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.016>.

QUIGLEY, L et al. *The complex microbiota of raw milk*. FEMS Microbiology [en línea], 2013, (Irlanda). 37(1), pp. 664-665. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808865/>.

RAMÍREZ, J et al. *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Fuente [en línea], 2018, (México). 1(7), pp. 10. Disponible en: <http://dspace.uan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/436>.

RAMÍREZ, M et al. *Lactobacillus pentosus ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage*". Revista Argentina de Microbiología [en línea], 2020, (México). 52(4), pp. 305-314. [Consulta: 23 Julio 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119301270?via%3Dihub>.

RAMÍREZ, C y VÉLEZ, J. *Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra*. Información Tecnológica [en línea], 2018, (Chile). 27(6), pp. 115-128. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000600012&script=sci_abstract.

RAMÍREZ, F. *Aislamiento de bacterias Lactobacillus s.p y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonica in vitro*. (Trabajo de titulación) (Maestría). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 2010. pp. 10.

RAMOS, B et al. *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropica*". Universidad y Ciencia [en línea], 2009, (México). 25(2), pp. 15-17. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000200006.

REBELLO, Á et al. *Lactococcus lactis autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo*. Latu [en línea], 2016, (Uruguay). 1(12), pp. 15-26. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163652005/html/>.

REUBEN, R et al. *Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties.* Journal of Dairy Science [en línea], 2020, (Bangladesh). 103(2), pp. 1223-1232. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31759592/>.

RIVERA, J et al. *Identificación de bacterias ácido lácticas antagónicas de Salmonella enterica var. Typhimurium aisladas de queso artesanal.* Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas [en línea], 2017, (Mexico). 8(4), pp. 785-797. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n4/2007-0934-remexca-8-04-785-en.pdf>.

RODRÍGUEZ, P y ARENAS, R. *Hans Christian Gram y su tinción". Hospital General Manuel Gea González* [en línea], 2018, (México). 16(2), pp. 1-2. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

SALAS, X. *Identificación de Lactobacillus y Levaduras Aisladas de Excretas Fermentadas de Aves con Potencialidades Probióticas.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2012. pp. 10-15.

SANCHÉZ, L y TROMPS, J. *Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico.* Salud Animal [en línea], 2014, (Cuba). 36(2), pp. 124-125 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2014000200008.

SANTOS, J. *BACTERIAS GRAM POSITIVAS: Staphylococcus y Streptococcus* [Presentación]. [Consulta: 22 Abril 2022]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/jsantossantana/estafilococos-y-estreptococos>.

SOLÓRZANO, A et al. *Endocarditis infecciosa por Enterococcus Faecalis en una niña con derivación ventrículo atrial.* [Presentación], 2018, (Colombia). Disponible en: <https://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4419/Enterococcus%20faecalis%20Zayra.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

SOTOMAYOR, M y BALCÁZAR, J. *Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas.* AcuaTic [en línea], 2016, (España). 1(16), pp. 9-15. [Consulta: 1 Abril 2022]. ISSN 1578-4541. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/494/49401902.pdf>.

TABASCO, R. *Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales.* (Trabajo de titulación) (Doctorado). Universidad Autónoma de Madrid. Madrid-España. 2020. pp. 213.

TAPIA, V. *Análisis de la microflora asociada a Aplysina sp., recolectada en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena (Ecuador), en la búsqueda de nuevos probióticos para uso acuícola.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Recursos Naturales. Valparaíso-Chile. 2015. pp. 30-34.

TMS. *Análisis del mercado de probióticos 2018-2026* [Blog]. 2017. Disponible en: <https://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>.

TORRES, E. *Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de Lactobacillus sp. contra Salmonella sp, Salmonella typhi y Escherichia coli.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas. Quito-Ecuador. 2013. pp. 2-5.

ULPGC. *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias* [Manual de proceso]. [Consulta: 30 Mayo 2022]. Disponible en: https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf.

VENEGAS, C. *Obtención de bacterias ácido lácticas mediante aislamiento en el kéfir de leche, para la optimización en la síntesis de ácido láctico por fermentación.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química. Bogotá-Colombia. 2019. pp. 9.

VARGAS, J. *Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga.* (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2018. pp. 14.

VÉLEZ, J et al. *Molecular identification and evaluation of the probiotic ability of lactic acid bacteria from sow colostrum.* CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [en línea], 2015, (Colombia) 10(2), pp. 141-149. [Consulta: 20 Noviembre 2021]. ISSN 1900-9607. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v10n2/v10n2a06.pdf>.

WAGNER, C. *Uso de probióticos en la regulación de la microbiota intestinal humana y su impacto en la salud.* (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de la Laguna, Facultad de Ciencias de Salud, Sección de Farmacia. San Cristóbal de la Laguna-España. 2018. pp. 6-22.



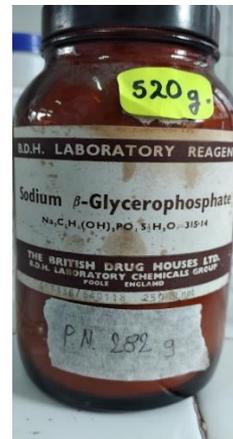
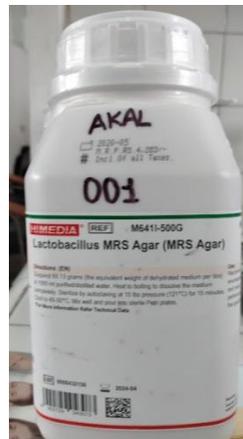
ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA



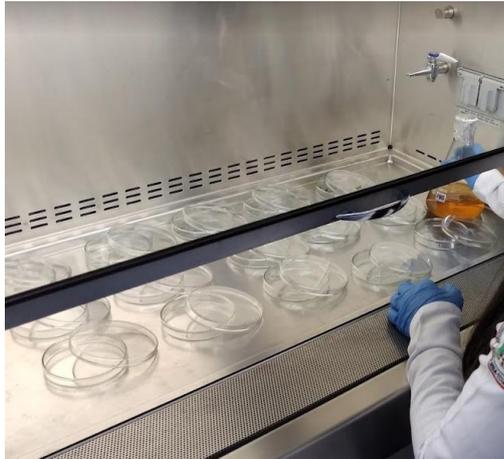
Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO B: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO C: TÉCNICA DE PLAQUEO EN PLACA PETRI DE VIDRIO



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO D: SIEMBRA MEDIANTE TÉCNICA DE SUPERFICIE CON ASA DE DRIGALSKY



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO E: INCUBACIÓN POR 24-48H EN JARRAS GAS-PACK



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO F: CEPAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA

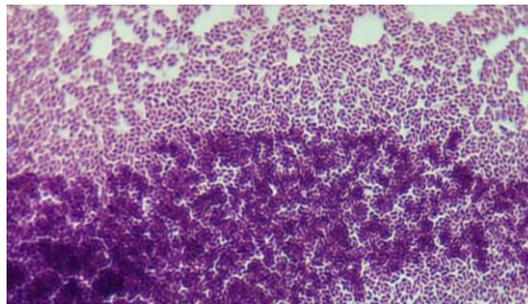
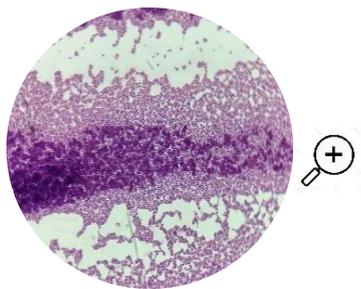


Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

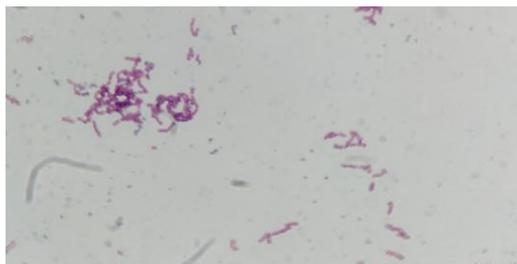
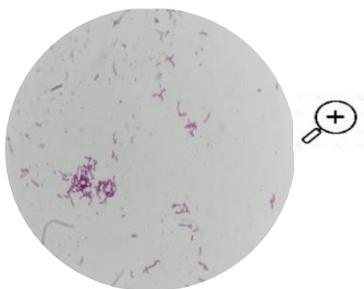
ANEXO G: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Tinción Gram

COCOS



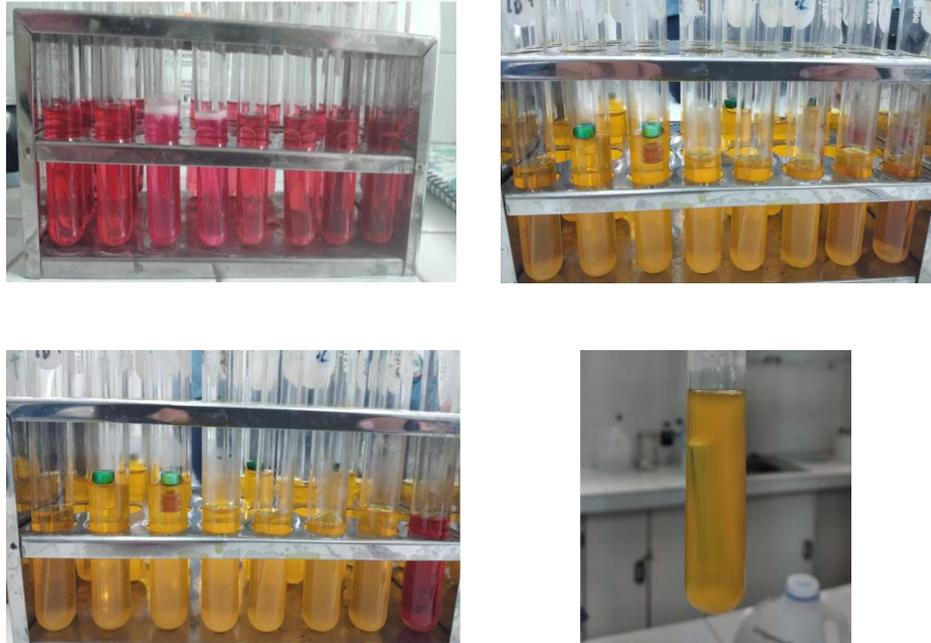
BACILOS



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO H: PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN

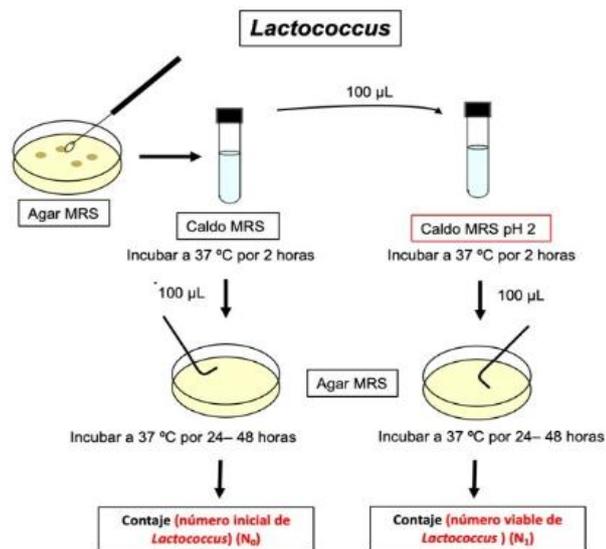
a) Producción de CO₂.



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

ANEXO I: PRUEBAS DE ACTIVIDAD PROBIÓTICA

- a) Simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares.
- Proceso de simulación de tolerancia a jugos gástricos y sales biliares.



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022



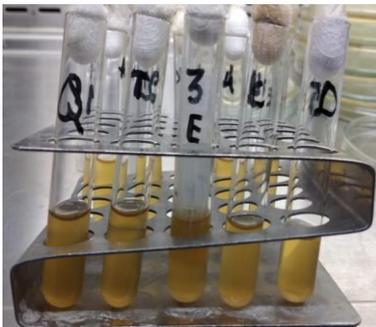
Activación de las cepas de MRS en caldo MRS.



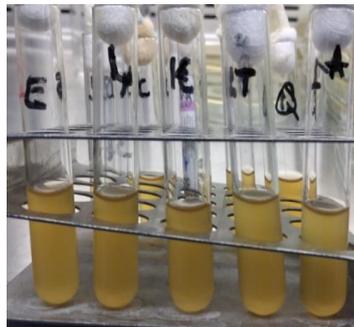
Activación de las cepas de M17 en caldo MRS.



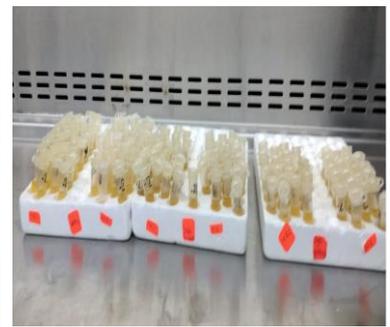
Medición de pH 2.



Incubación de las cepas de MRS después de 2 horas a 32° C.



Incubación de las cepas de M17 después de 2 horas a 32° C.



Realización de las diluciones en jugos gástricos, sales biliares y control.

JUGOS GÁSTRICOS CO#1

SALES BILIARES CO#1

CONTROL CO#1



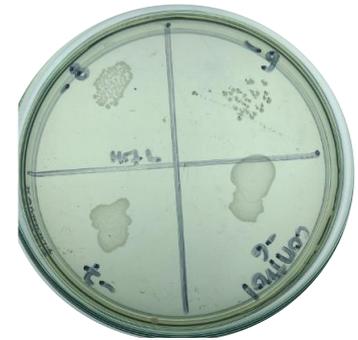
Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

JUGOS GÁSTRICOS BA#6



Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

SALES BILIARES BA#6



Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

CONTROL BA#6



Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

Siembra de 100 ul del caldo de MRS e incubación a 37° C por 24 – 48 h.

Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

- Contaje de simulación de tolerancia a jugos gástricos.

N°	CEPAS	UFC N ₁		UFC N ₀	
1	CO#1	24x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁶	82X10 ⁻⁸	33X10 ⁻⁹
2	CO#2	84x10 ⁻⁵	44x10 ⁻⁶	46X10 ⁻⁸	11X10 ⁻⁹
3	CO#3	42x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁶	52X10 ⁻⁸	11X10 ⁻⁹
4	BA#4	80x10 ⁻⁴	29x10 ⁻⁵	49X10 ⁻⁸	22X10 ⁻⁹
5	BA#5	63x10 ⁻⁴	19x10 ⁻⁵	125X10 ⁻⁸	20X10 ⁻⁹
6	BA#6	77x10 ⁻⁴	23x10 ⁻⁵	98X10 ⁻⁸	14X10 ⁻⁹
7	CO#7	81x10 ⁻³	22x10 ⁻⁴	48X10 ⁻⁸	6X10 ⁻⁹
8	BA#8	92x10 ⁻⁴	43x10 ⁻⁵	68X10 ⁻⁷	39X10 ⁻⁸

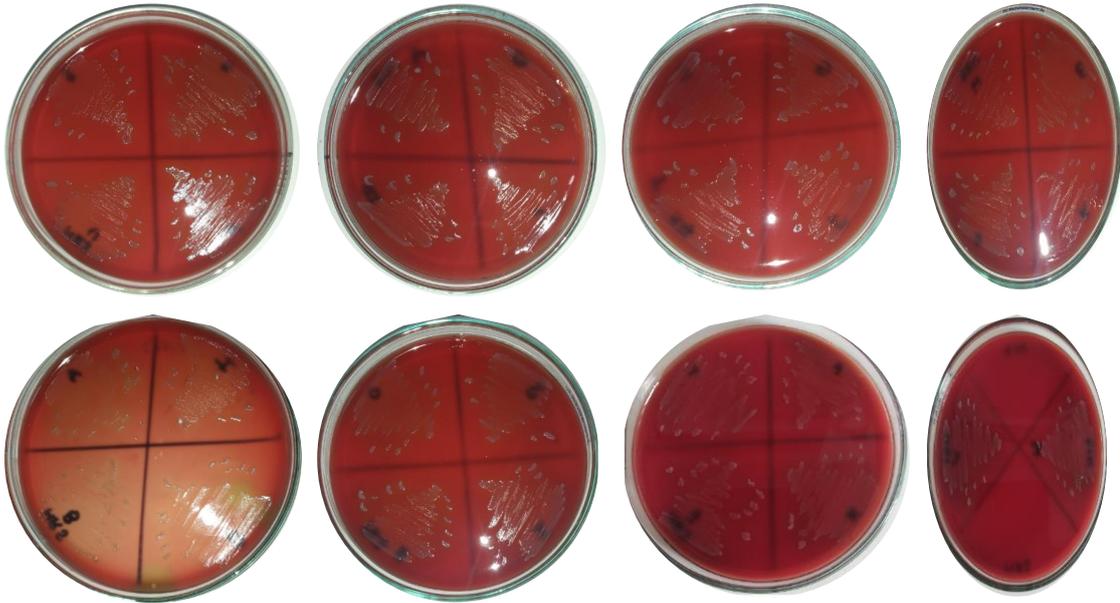
Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022

- Contaje de simulación de tolerancia a sales biliares.

N°	CEPAS	UFC N ₁		UFC N ₀	
1	CO#1		100X10 ⁻⁷	82X10 ⁻⁸	33X10 ⁻⁹
2	CO#2		70X10 ⁻⁷	46X10 ⁻⁸	11X10 ⁻⁹
3	CO#3		33X10 ⁻⁷	52X10 ⁻⁸	11X10 ⁻⁹
4	BA#4	105X10 ⁻⁶	48x10 ⁻⁷	49X10 ⁻⁸	22X10 ⁻⁹
5	BA#5		75X10 ⁻⁷	1X10 ⁻⁸	20X10 ⁻⁹
6	BA#6		62x10 ⁻⁷	98X10 ⁻⁸	14X10 ⁻⁹
7	CO#7		75x10 ⁻⁷	48X10 ⁻⁸	6X10 ⁻⁹
8	BA#8	112x10 ⁻⁶	51x10 ⁻⁷	68X10 ⁻⁷	39X10 ⁻⁸

Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

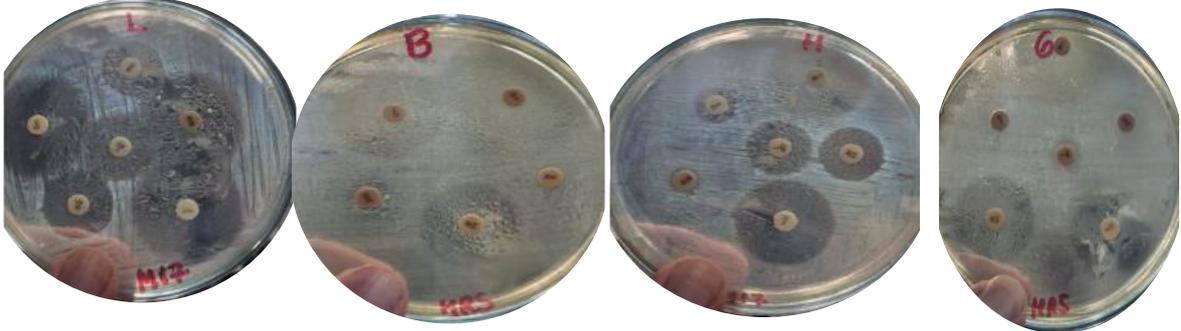
b) Resultados de Hemólisis.



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

c) Resistencia a antibióticos.

- Halos de inhibición.



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

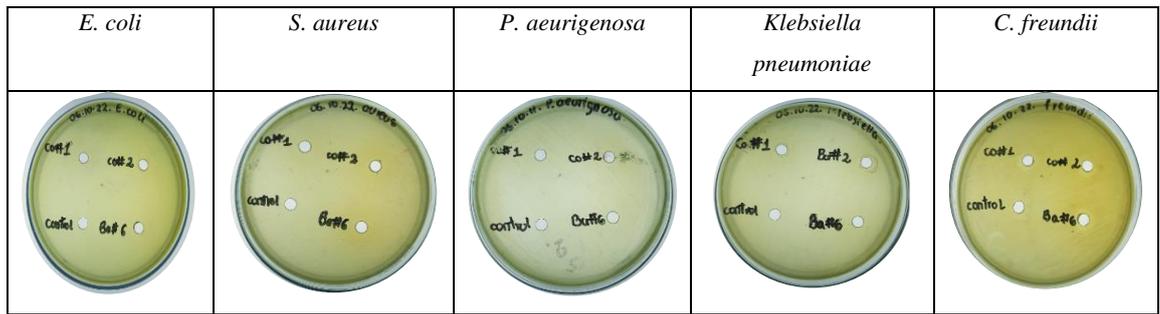
- Medición de los halos de inhibición.

Cepas	Estreptomicina (S)	Eritromicina (E)	Ciprofloxacina (CIP)	Tetraciclina (TE)	Vancomicina (V)	Cloranfenicol (C)
CO#1	7 mm	26 mm	18 mm	R	22 mm	30 mm
CO#2	7 mm	26 mm	18 mm	R	20 mm	30 mm
CO#3	R	26 mm	20 mm	R	20 mm	32 mm
CO#4	R	18 mm	8 mm	R	20 mm	30 mm
BA#5	R	22 mm	9 mm	10 mm	22 mm	30 mm
BA#6	R	14 mm	9 mm	8 mm	22 mm	26 mm
BA#7	7 mm	26 mm	18 mm	8 mm	20 mm	26 mm
BA#8	9 mm	22 mm	14 mm	10 mm	20 mm	28 mm

Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

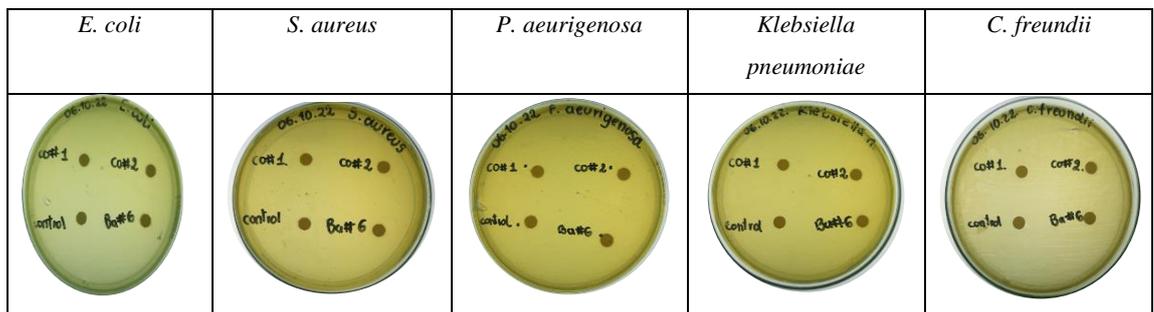
d) Evaluación del efecto antagónico

- Técnica mediante pocillo



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022

- Técnica mediante disco en blanco



Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022

- Medición de los halos de inhibición.

Bacterias patógenas	CO#1	CO#2	CO#3	CO#4	BA#5	BA#6	BA#7	BA#8
<i>E. coli</i>	Resistente							
<i>S. aureus</i>	Resistente							
<i>P. aeruginosa</i>	Resistente							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente							
<i>C. freundii</i>	Resistente							

Realizado por: Inca Jocelyne, Martínez Joao, 2022.

INFORME DE RESULTADOS #B-226

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de organismos ESPOCH II

Informe: B-226

Analista: Francisco Mosquera-Yuqui, Ing. (ORCID: 0000-0001-8459-2653)

Fecha: 13 de septiembre del 2022

RESUMEN

Código muestra	Código BioSin	Long (pb)	Calidad (%)	Barcode	Organismo	Identidad (%)	Nº Acceso GenBank/ezBioCloud
CO#1	BB219	631	90.5	rpoB	<i>Lactococcus cremaris</i>	99.53	AP025520.1
CO#2	BB220	1400	90.1	16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99.79	MH891684.1
CO#3	BB221	1409	92.8	16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99.79	MT573719.1 BALX01000047
Ba#4	BB222	1407	90.8	16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99.57	CP065737.1 BALX01000047
Ba#5	BB223	1417	88.6	16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99.43	BALX01000047

SOFTWARE UTILIZADO

- FinchTV v1.4.0
- Geneious v11.1.

BASES DE DATOS UTILIZADAS

- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://www.ezbiocloud.net/>

ANEXOS

A1. Electroferogramas

<https://drive.google.com/drive/folders/1EKazTCc2Viz8lgB8FbuSv9GDsN87emzJ?usp=sharing>

A2. Secuencias consenso de las hebras molde y complementaria

<https://drive.google.com/file/d/1nQRtp8UarUE3yhbog5xYWKx-8SULLmsx/view?usp=sharing>

DETALLE DE RESULTADOS

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de organismos ESPOCH II

Informe: B-226

Analista: Francisco Mosquera-Yuqui, Ing. (ORCID: 0000-0001-8459-2653)

Fecha: 13 de septiembre del 2022

Estudio

Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcodes, purificación, secuenciación Sanger, limpieza y ensamblaje de productos de secuenciación, y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos

Muestras usadas: Aislado en caja Petri.

Método de determinación: Identificación molecular por barcoding.

Procedimiento

- La extracción de ADN se realizó por método convencional mecánico-químico utilizando aproximadamente 0.25 mg de biomasa (Figura 1).
- El ADN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro nanodrop, donde todos cumplieron con parámetros de concentración y calidad.
- Se realizó una PCR convencional amplificando el barcode 16S utilizando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), o el barcode rpoB con los primers rpoBF (5'-ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT3') y rpoBR (5'-ACACCCTTGTTACCGTGACGACC-3'). El volumen de reacción fue de 25 uL (Tabla 1) y las condiciones de PCR son indicadas en Tabla 2.
- Luego de correr una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% a 100V por 30 min (Figura 2), los productos de PCR fueron purificados.
- La secuenciación SANGER se realizó para las hebras molde y complementarias.
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando los programas bioinformáticos FinchTV v1.5.0 y Geneious v11.1.5.

Tabla 1. Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada

COMPONENTE	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 uL
Primer forward (10 μM)	1.0 uL
Primer reverse (10 μM)	1.0 uL
ADN template	100-150 ng
Agua libre de nucleasas	a 25 uL
Volumen total	25 uL

Tabla 2. Condiciones de PCR convencional para barcode 16S.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	0.5 min	35
Alineamiento	54	0.5 min	
Extensión	72	1.5 min	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 2. Condiciones de PCR convencional para barcode rpoB.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	0.5 min	35
Alineamiento	57	0.5 min	
Extensión	72	1.5 min	
Extensión final	72	7 min	1

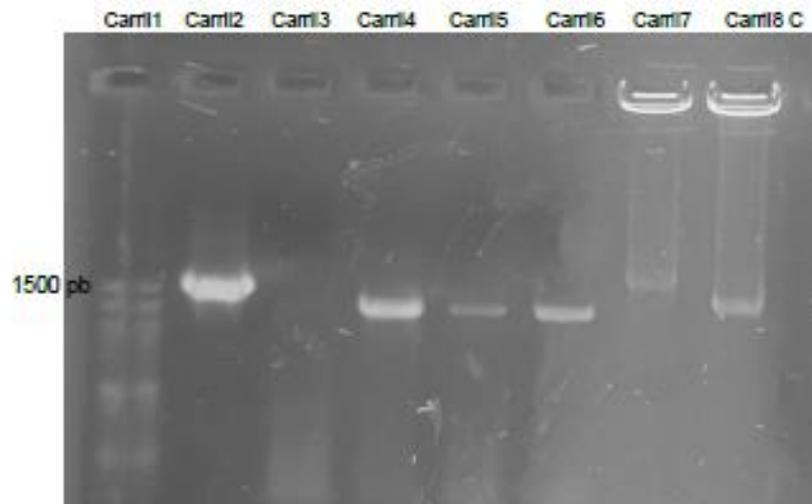


Figura 2. Electroforesis horizontal de productos de PCR convencional. Marcador molecular 100bp SRL (Carril 1), muestra BB219 (Carril 2), BB220 (Carril 3), BH221 (Carril 4), BH222 (Carril 5), BH223 (Carril 6), BH223 (Carril 6), control negativo (Carril 11). Gel de agarosa al 1% buffer TBE 1X (Carril 1).

CONCLUSIÓN

A partir de una extracción satisfactoria de ADN genómico de los aislados CO#1, CO#2, CO#3, Ba#4, Ba#5, se amplificó el barcode 16S ó rpoB y se identificaron molecularmente como *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, respectivamente.



FIRMA AUTORIZADA
Francisco Mosquera-Yuqui, Ing.
ORCID: 0000-0001-8459-2653
BioSin-Biociencias

INFORME DE RESULTADOS #B-228S

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de organismos ESPOCH II

Informe: B-228S

Analista: Francisco Mosquera-Yuqui, Ing. (ORCID: 0000-0001-8459-2653)

Fecha: 30 de octubre del 2022

RESUMEN

Código muestra	Código BioSin	Long (pb)	Calidad (%)	Barcode	Organismo	Identidad (%)	Nº Acceso GenBank
Ba#6	BB224	1403	96.7	16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99.93	MK878423.1 BALX01000047

SOFTWARE UTILIZADO

- FinchTV v1.4.0
- Geneious v11.1.5

BASES DE DATOS UTILIZADAS

- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://www.ezbiocloud.net/>

ANEXOS

A1. Electroferogramas

<https://drive.google.com/drive/folders/1EKazTCc2Viz8lgB8FbuSv9GDsN87emzJ?usp=sharing>

A2. Secuencias consenso de las hebras molde y complementaria

<https://drive.google.com/file/d/1nQRtp8UarUE3yhboq5xYWKx-8SUIImsw/view?usp=sharing>

Realizado por: LABORATORIO IDGEM, 2022.

DETALLE DE RESULTADOS

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de organismos ESPOCH II

Informe: B-228S

Analista: Francisco Mosquera-Yuqui, Ing. (ORCID: 0000-0001-8459-2653)

Fecha: 30 de octubre del 2022

Estudio

Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcode 16S, purificación, secuenciación Sanger, limpieza de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos

Muestras usadas: Aislado en caja Petri.

Método de determinación: Identificación molecular por barcoding.

Procedimiento

- La extracción de ADN se realizó por método convencional mecánico-químico utilizando aproximadamente 0.25 mg de biomasa.
- El ADN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro nanodrop, donde todos cumplieron con parámetros de concentración y calidad.
- Se realizó una PCR convencional amplificando el barcode 16S se usaron los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). El volumen de reacción fue de 25 μ L (Tabla 1) y las condiciones de PCR son indicadas en Tabla 2.
- Luego de correr una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Figura 1), los productos de PCR fueron purificados.
- La secuenciación SANGER se realizó para las hebras molde y complementaria.
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas usando los programas bioinformáticos FinchTV v1.5.0 y Geneious v11.1.5.

Realizado por: LABORATORIO IDGEM, 2022.

Tabla 1. Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada.

COMPONENTE	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 uL
Primer forward (10 μ M)	1.0 uL
Primer reverse (10 μ M)	1.0 uL
ADN template	100-150 ng
Agua libre de nucleasas	a 25 uL
Volumen total	25 uL

Tabla 2. Condiciones de PCR convencional para barcode 16S.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	0.5 min	35
Alineamiento	54	0.5 min	
Extensión	72	1.5 min	
Extensión final	72	7 min	1

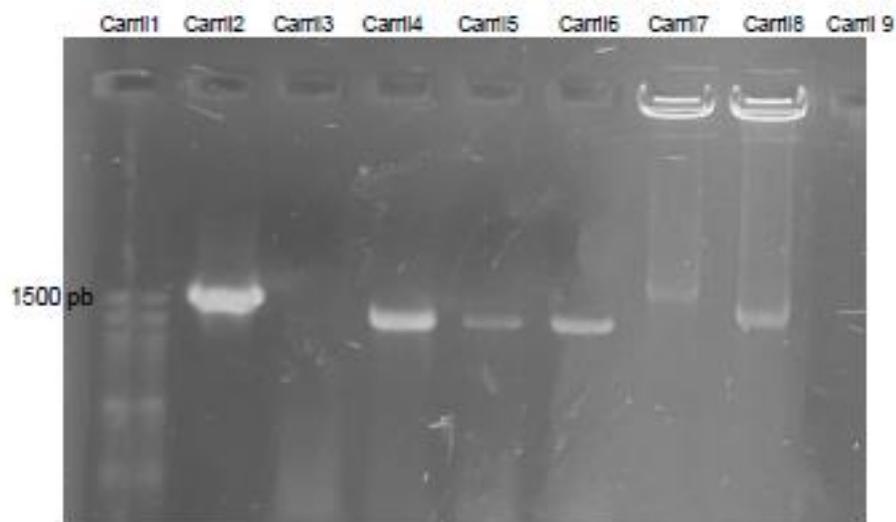


Figura 1. Electroforesis horizontal de productos de PCR convencional. Marcador molecular 100bp SRL (Carril 1), muestra BB219 (Carril 2), BB220 (Carril 3), BH221 (Carril 4), BH222 (Carril 5), BH223 (Carril 6), BH224 (Carril 8), control negativo (Carril 9). Gel de agarosa al 1% buffer TBE 1X (Carril 1).

CONCLUSIÓN

A partir de una extracción satisfactoria de ADN genómico del aislado Ba#6, se amplificó el barcode 16S y se identificó molecularmente como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.



FIRMA AUTORIZADA
Francisco Mosquera-Yuqui, Ing.
ORCID: 0000-0001-8459-2653
BioSin-Biociencias

Realizado por: LABORATORIO IDGEM, 2022



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 23 / 01 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: INCA USHPA JOCELYNE LISSETH MARTÍNEZ BALDA JOAO PAOLO
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Título a optar: BIOQUÍMICA/O FARMACÉUTICO
f. Analista de Biblioteca responsable: Ledo. Holger Ramos, MSc.

0162-DBRA-UPT-2023

