



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y
SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS
BACTERIANAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL
PROBIÓTICO**

Tesis presentada como requisito para optar el Título en:

Ingeniero Agroindustrial

Autora:

Ana Belén Benavides Haro

Directora:

Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

Ibarra – Ecuador

2016

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y
SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS ÁCIDO
LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO

Tesis revisada por la Directora y los Miembros del Tribunal, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO/A AGROINDUSTRIAL

APROBADA:



Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

DIRECTORA



Dra. Lucía Yépez, MSc.

ASESORA



Ing. Sania Ortega, MSc.

ASESORA



Ing. Rosario Espín, MSc.

ASESORA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia, y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejamos sentada nuestra voluntad de participar en este proyecto, para lo cual ponemos a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100350421-2		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Benavides Haro Ana Belén		
DIRECCIÓN:	San Antonio, Tanguarín		
EMAIL:	belenlinda20@hotmail.com		
TELÉFONO FIJO	062932-745		
TELÉFONO MÓVIL:	0967148839		
DATOS DE LA OBRA			
TÍTULO:	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO		
AUTORA:	Benavides Haro Ana Belén		
FECHA:	05 de diciembre del 2016		
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO			
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/>	PREGRADO	<input type="checkbox"/> POSTGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial		
DIRECTORA	Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D		

2. AUTORIZACIÓN A FAVOR DE LA SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN Y A LA UNIVERSIDAD

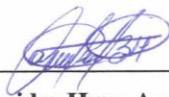
Yo, Benavides Haro Ana Belén, con cédula de identidad número 100350421-2; en calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la SENESCYT y a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación, y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior, Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y soy la titular de los derechos patrimoniales, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la SENESCYT y de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 05 días del mes de diciembre de 2016.

LA AUTORA:



Benavides Haro Ana Belén

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo fue desarrollado por la Srta. Benavides Haro Ana Belén, con cédula de ciudadanía N° 100350421-2 bajo mi supervisión.



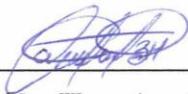
Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

DIRECTORA DE TESIS

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A
FAVOR DE LA SENESCYT Y DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL
NORTE**

Yo, Benavides Haro Ana Belén, con cédula de identidad Nro. 100350421-2 manifiesto mi voluntad de ceder a la SENESCYT y a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de propiedad Intelectual del Ecuador, artículo 4, 5 y 6, en calidad de autora de la obra o trabajo de grado denominado: **DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO**, que ha sido desarrollo para optar el título de : **INGENIERO AGROINDUSTRIAL** en la Universidad Técnica del Norte, quedando la SENESCYT y la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 05 días del mes de diciembre de 2016.



Benavides Haro Ana Belén

1003504212-2

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios, quien me ha dado la vida, la oportunidad de mejorar día a día, las fuerzas y bendiciones necesarias para superar cada reto.

Agradezco a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) por permitirme ser parte del proyecto de investigación en el que logré desarrollar el presente trabajo investigativo, a la Universidad Técnica del Norte, en especial a las autoridades y docentes que conforman la Carrera de Ingeniería Agroindustrial que de manera desinteresada supieron compartirme sus saberes y con ello fomentar en mí nuevos conocimientos y valores para contribuir al mejoramiento de la sociedad.

De manera especial a la Dra. Gabriela N. Tenea, Directora de Tesis, a quien agradezco por su valioso tiempo brindado, por el apoyo incondicional y por enseñarme día a día conocimientos muy valiosos que me han ayudado a crecer profesionalmente.

A la Dra. Lucía Yépez, gracias por el aporte que ha hecho a este trabajo, por su paciencia y por sus sabios consejos.

A mis asesoras Ing. Sania Ortega, Ing. Rosario Espín y al docente Ing. Jorge Torres.

A mis padres, por su apoyo, sus consejos, su comprensión, su amor, su ayuda en los momentos difíciles y, sobre todo, por brindarme los recursos necesarios para culminar con éxito mis estudios.

A David por su cariño y comprensión, gracias, por apoyarme cada día para alcanzar a cumplir mis objetivos.

A Evelyn por su verdadera amistad, porque con su bondad y ayuda conseguí salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida.

A todos ustedes infinitas gracias

Belén Benavides.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta investigación con todo el cariño a:

Dios por darme la vida, por permitirme culminar con éxito mi carrera, por ser luz en mi vida y la fortaleza de cada día.

A mis padres que me han apoyado y han estado conmigo dándome fuerza y alentándome para cumplir con mis obligaciones. Les amo con todo mi corazón y este logro es para ustedes.

A mi apoyo incondicional David, que gracias a su paciencia, amor y afecto puedo día a día luchar y ser mejor.

Belén Benavides.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido Páginas

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 PROBLEMA	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	4
1.3 OBJETIVOS.....	5
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO	5
1.4.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	5
1.4.2 HIPÓTESIS NULA	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 FRUTOS SILVESTRES NATIVOS	6
2.2 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA	6
2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	7
2.4 PROBIÓTICOS.....	8
2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS	9
2.4.1.1 Supresión de microorganismos patógenos.....	10
2.4.2 OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .	10
2.4.3 CLASIFICACIÓN DE PROBIÓTICOS	11

2.4.3.1 Probiótico comercial (Lácteol Fort).....	11
2.4.4 LOS ALIMENTOS PROBIÓTICOS	12
2.5 BACTERIAS PATÓGENAS	12
2.5.1 BACTERIAS PATÓGENAS DE ESPECIE <i>Escherichia coli</i>	13
2.5.2 BACTERIAS PATÓGENAS DE ESPECIE <i>Salmonella sp.</i>	14
2.5.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS EN EL ECUADOR..	15
2.6 ANTIBIÓTICOS	15
2.6.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	15
2.6.1.1 Ampicilina	16
2.6.1.2 Gentamicina.....	16
2.6.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	17
2.7 MEDIOS DE CULTIVOS PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	17
2.7.1 MEDIO DE CULTIVO MRS.....	18
2.7.1.1 Uso.....	18
2.7.1.2 Fundamento	18
2.7.1.3 Características.....	18
CAPÍTULO III.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	19
3.2 MATERIALES Y EQUIPOS	20
3.2.1 MATERIAL biológico.....	20
3.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS	20
3.3 MÉTODOS DEL EXPERIMENTO 1	21
3.3.1 FACTORES EN ESTUDIO	22
3.3.2 TRATAMIENTOS	23
3.3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
3.3.3.1 Tipo de diseño.....	24
3.3.4 CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO.....	25
3.3.5 CARACTERÍSTICAS DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL	25
3.3.6 ESQUEMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
3.3.7 ANÁLISIS FUNCIONAL.....	26
3.3.8 VARIABLES A EVALUARSE.....	26

3.3.8.1	Variables Cuantitativas.....	26
3.4	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	26
3.4.1	MEDIDA DE LA ZONA DE INHIBICIÓN.....	26
3.4.2	TIEMPO DE INCUBACIÓN.....	27
3.5	DIAGRAMA DE PROCESO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	28
3.6	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	29
3.6.1	PREPARACIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO.....	29
3.6.1.1	Cepas en estudio.....	29
3.6.1.2	Microorganismos indicadores.....	29
3.6.2	RESIEMBRA DE CEPAS.....	29
3.6.2.1	Cepas con potencial probiótico.....	29
3.6.2.2	Microorganismos indicadores en estudio: <i>E. coli</i> y <i>Salmonella sp.</i>	29
3.6.3	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	30
3.6.4	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	30
3.6.5	CENTRIFUGACIÓN.....	30
3.6.6	AJUSTAR EL pH.....	30
3.6.7	SIEMBRA N° 1.....	30
3.6.8	INCUBACIÓN N° 1.....	31
3.6.9	SIEMBRA N° 2.....	31
3.6.10	INCUBACIÓN N° 2.....	31
3.6.11	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	31
3.7	MÉTODOS DEL EXPERIMENTO 2.....	32
3.7.1	FACTORES EN ESTUDIO.....	32
3.7.2	VARIABLES A EVALUARSE.....	34
3.7.2.1	Variables Cuantitativas.....	34
3.8	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	34
3.8.1	MEDIDA DEL HALO DE INHIBICIÓN.....	34
3.8.2	TIEMPO DE INCUBACIÓN.....	34
3.9	DIAGRAMA DE PROCESO PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	35

3.10 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE INTERÉS.....	36
3.10.1 MÉTODO POR DISCO DIFUSIÓN.....	36
3.10.2 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS DE CULTIVO	36
3.10.3 RESIEMBRA DE CEPAS.....	37
3.10.4 INCUBACIÓN N°1.....	37
3.10.5 MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA A DO600	37
3.10.6 CÁLCULO DE LAS UFC/ml	37
3.10.7 EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ANTIBIÓTICOS	37
3.10.8 SIEMBRA	37
3.10.9 INCUBACIÓN N° 2.....	38
3.10.10 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	38
CAPÍTULO IV.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE INTERÉS.	39
4.1.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD antimicrobiana frente a <i>E. coli</i>	40
4.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD antimicrobiana frente a <i>Salmonella sp.</i>	52
4.2. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO A DOS ANTIBIÓTICOS: AMPICILINA Y GENTAMICINA.....	82
4.2.1. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA A LA AMPICILINA Y GENTAMICINA PARA EL INÓCULO DE CADA CEPA DE 10 ⁶ UFC/ml.....	83
4.2.2. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA A LA AMPICILINA Y GENTAMICINA PARA EL INÓCULO DE CADA CEPA DE 10 ⁸ UFC/ml.....	91
CAPÍTULO V	100
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	100
5.1 CONCLUSIONES	100
5.2 RECOMENDACIONES	102
 BIBLIOGRAFÍA	 103
 ANEXOS	 109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos conocidos como probióticos.....	8
Tabla 2. Alimentos que pueden estar contaminados de diferentes bacterias patógenas.....	13
Tabla 3. Datos Climatográficos	19
Tabla 4. Descripción de los factores: cepas de interés y probiótico comercial (A), diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial (B) y bacterias patógenas (C).....	23
Tabla 5. ADEVA DEL EXPERIMENTO 1	25
Tabla 6. Interpretación de los resultados Método de difusión del disco - Normas EFSA..	33
Tabla 7. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 3,0	40
Tabla 8. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 4,0	40
Tabla 9. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 3,0	42
Tabla 10. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 4,0	43
Tabla 11. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 3,0	44
Tabla 12. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 4,0	45
Tabla 13. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 3,0	46
Tabla 14. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 4,0	46

Tabla 15. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 3,0	52
Tabla 16. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 4,0	53
Tabla 17. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 3,0	55
Tabla 18. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 4,0	55
Tabla 19. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 3,0	57
Tabla 20. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 4,0	57
Tabla 21. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 3,0	59
Tabla 22. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 4,0	59
Tabla 23. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> a las 18 horas de incubación.	66
Tabla 24. Análisis de Varianza.....	67
Tabla 25. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial).....	68
Tabla 26. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)	68
Tabla 27. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> a las 24 horas de incubación.	69

Tabla 28. Análisis de Varianza.....	70
Tabla 29. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zona de inhibición a las 24 horas	71
Tabla 30. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial).....	72
Tabla 31. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)	72
Tabla 32. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y de las cepas en estudio, frente a los patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> a las 36 horas de incubación.	73
Tabla 33. Análisis de Varianza.....	74
Tabla 34. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zonas de inhibición a las 36 horas	75
Tabla 35. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial).....	76
Tabla 36. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)	77
Tabla 37. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> a las 48 horas de incubación	78
Tabla 38. Análisis de Varianza.....	79
Tabla 39. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zona de inhibición a las 48 horas de incubación	80
Tabla 40. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial).....	81
Tabla 41. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)	81

Tabla 42. Método de difusión del disco, Normas EFSA para los antibióticos ampicilina y gentamicina.....	83
Tabla 43. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina	83
Tabla 44. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina	84
Tabla 45. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina	85
Tabla 46. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina	85
Tabla 47. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina	87
Tabla 48. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina	87
Tabla 49. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina	88
Tabla 50. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina.	89
Tabla 51. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina.....	91
Tabla 52. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina	92
Tabla 53. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina.....	93
Tabla 54. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina.....	93

Tabla 55. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina	95
Tabla 56. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina	95
Tabla 57. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina	96
Tabla 58. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>E. coli</i> , después de 18 h de incubación.....	41
Figura 2. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>E. coli</i> , después de 24 h de incubación.....	43
Figura 3. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>E. coli</i> , después de 36 h de incubación.....	45
Figura 4. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formadas por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>E. coli</i> , después de 48 h de incubación.....	47
Figura 5. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 3,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a <i>E. coli</i>	48
Figura 6. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 4,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a <i>E. coli</i>	50
Figura 7. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>Salmonella sp.</i> , después de 18 h de incubación.....	54
Figura 8. Promedio del diámetro de la zona de inhibición forma por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>Salmonella sp.</i> , después de 24 h de incubación.....	56
Figura 9. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>Salmonella sp.</i> , después de 36 h de incubación.....	58
Figura 10. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formadas por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a <i>Salmonella sp.</i> , después de 48 h de incubación.....	60

Figura 11. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 3,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella sp.*..... 61

Figura 12. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 4,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella sp.*..... 62

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Vista de la zona inhibición (zona transparente) formada por los sobrenadantes de las cepas de interés.....	32
Fotografía 2. Vista del halo de inhibición (zona transparente) formado por los antibióticos, en presencia de las BAL.....	38
Fotografía 3. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTNFa 38 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a <i>E. coli</i>	51
Fotografía 4. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTNFa 41 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a <i>Salmonella sp.</i>	63
Fotografía 5. Vista de la zona de inhibición que formaron las cepas UTNFa 37 y UTNFa 39 frente a <i>Salmonella sp.</i>	64
Fotografía 6. Vista de los halos de inhibición formados por ampicilina y gentamicina en presencia del inóculo de la cepa UTNFa 37 (10^6 UFC/ml).....	90
Fotografía 7. Vista de los halos de inhibición formados por ampicilina y gentamicina en presencia del inóculo de la cepa UTNFa 40 y del probiótico comercial (10^6 UFC/ml).....	91
Fotografía 8. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia del probiótico comercial (10^8 UFC/ml).....	98
Fotografía 9. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia de la cepa UTNFa 37 (10^8 UFC/ml).....	99

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	109
MÉTODO DE DIFUSIÓN DEL DISCO - NORMAS EFSA.....	110
ANEXO B	112
REFERENCE GUIDE: MCFARLAND STANDARD PREPARATION	112
ANEXO C	113
GLOSARIO	113
ANEXO D	115
ABREVIATURAS	115
ANEXO E.....	116

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas son conocidas por su potencial biotecnológico. En este estudio, se evaluaron las propiedades *in vitro* de algunas de ellas, aisladas de nichos nativos de la selva subtropical del Ecuador. Estas cepas fueron anteriormente clasificadas en función de sus propiedades morfológicas, su perfil de fermentación, y el perfil de RAPD-ADN probando su potencial probiótico. Los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluación de la capacidad antimicrobiana de cinco cepas de bacterias ácido lácticas frente a dos bacterias patógenas, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*; b) evaluación de la susceptibilidad a dos antibióticos, ampicilina y gentamicina. El ensayo de pruebas de difusión en el agar manifestó que el sobrenadante de las cepas de interés a pH 3,0 y pH 4,0 posee elevada actividad antimicrobiana (zona de inhibición $> 10,67 \pm 1,32$ mm) frente a los dos patógenos. Los análisis mostraron que la cepa UTNFa 41 a pH 3,0 presentó alta actividad antagonista frente al patógeno *E. coli*, formando una zona de inhibición de $19 \pm 2,16$ mm y en el caso de pH 4,0 la cepa UTNFa 38 estableció una zona de inhibición de $15,67 \pm 1,25$ mm, después de 48 horas de incubación. Para el caso del patógeno *Salmonella sp.* la cepa con mejor resistencia fue UTNFa 40 a pH 3,0 ($18 \pm 2,16$ mm) y a pH 4,0, la cepa UTNFa 41 ($17 \pm 3,56$ mm). Las bacterias de interés presentaron diferentes perfiles de susceptibilidad a dos antibióticos. A una concentración de 10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml de las cinco cepas fueron sensibles a la ampicilina. En el caso de gentamicina, las cepas en estudio y el probiótico a 10^6 UFC/ml estuvieron resistentes, a excepción de la UTNFa 37 que presentó sensibilidad. A la concentración de 10^8 UFC/ml todas las cepas se mostraron resistentes a la gentamicina. Al finalizar las dos evaluaciones funcionales, se demostró que las cepas de interés poseen características intrínsecas de los microorganismos probióticos.

SUMMARY

The lactic acid bacteria are known for their biotechnological potential. In this research the properties "*in vitro*" of several lactic acid bacteria, isolated of native niches of the subtropical jungle of Ecuador were evaluated. These were previously classified according to their morphological properties, their fermentation and RAPD–ADN profile and the probiotic potential have been evaluated. The objectives of this research were: a) evaluation of the antimicrobial capacity of five strains of lactic acid bacteria against two pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella sp.*, b) assessment of the susceptibility to two antibiotics, ampicillin and gentamycin. The agar diffusion assay showed that the supernatant of the interest strains at the pH 3,0 and pH 4,0 has elevated antimicrobial activity (inhibition area $> 10,67 \pm 1,32$ mm) against both pathogens. Analysis showed that UTNFa 41 strain at the pH 3,0, showed high antagonistic activity against the pathogen *E. coli*, forming an inhibition area of $19 \pm 2,16$ mm and in the case of pH 4,0, the strain UTNFa 38 formed an inhibition zone of $15,67 \pm 1,25$ mm after 48 hour of incubation. In the case of *Salmonella sp.*, the strain with the higher resistance was UTNFa 40 at the pH 3,0 ($18 \pm 2,16$ mm) and the strain UTNFa 41 at the pH 4,0 ($17 \pm 3,56$ mm), respectively. The bacteria of interest showed different susceptibility profiles for two antibiotics. At a concentration of 10^6 UFC/ml the five strains were sensitive to the ampicillin. In this case of gentamycin, at the 10^6 UFC/ml the strains were resistant, except for the UTNFa 37 that was sensitive. At the concentration of 10^8 UFC/ml, all strains were resistant to the gentamycin. At the end of the two assessments showed that the strains of interest possess characteristics intrinsic of probiotic microorganisms.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

Una de las mayores problemáticas que enfrenta la industria procesadora de alimentos es la contaminación por microorganismos patógenos, causada por mantener hábitos antihigiénicos, así como una atención insuficiente a la adecuada manipulación y conservación de los productos alimenticios, disminuyendo la calidad e incrementando de esta manera enfermedades de origen alimentario en la población.

Otros factores que intervienen reduciendo la resistencia a las enfermedades, como también promueven las alteraciones de la microbiota intestinal, son el uso de antibióticos y la terapia inmunosupresora utilizados como tratamientos; a esto se suma, los cambios de hábitos alimenticios, ya que, si la ingesta no es adecuada, la nutrición será incompleta y la flora intestinal se verá afectada. (FAO, 2004)

Para contribuir en el bienestar de la salud pública, se debe identificar nuevas fuentes de alimentos que contengan características beneficiosas, lo que favorecerá al mejoramiento de la calidad de vida. Conocido por su biodiversidad; el Ecuador, cuenta con material biológico nativo, como las bacterias ácido lácticas, que pueden ser explotadas para uso industrial en la elaboración de alimentos que cumplan las normas de seguridad alimentaria, disminuyendo el deterioro de los productos y la probabilidad de enfermedades relacionadas en la población.

Dado el desconocimiento de las características probióticas que puedan poseer las cepas de bacterias ácido láctico aisladas de la microbiota nativa del Ecuador, como la actividad antimicrobiana y la susceptibilidad a diferentes antibióticos, se pone en juego el aprovechamiento de estos microorganismos en futuras aplicaciones en productos alimenticios.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La resistencia a antibióticos se debe al aumento de microorganismos patógenos ingeridos en alimentos que son clave para la propagación de genes convirtiéndose en un importante problema de salud pública y clínica. La preparación de protocolos de prevención y tratamiento con patrones naturales parece ser indispensable. Investigaciones recientes han demostrado la importancia de las bacterias ácido lácticas como probióticos y su capacidad inhibidora contra patógenos de origen alimenticio; además el consumo de probióticos naturales que pueden estar presentes en algunos alimentos o probióticos comerciales con especialidades farmacéuticas, son utilizados para regenerar la flora intestinal cuando esta se ve afectada por el consumo de antibióticos. (Vinderola, Benetti, Burns, & Reinheimer, 2011)

Habiendo sido aisladas, seleccionadas y caracterizadas fenotípicamente, cepas de bacterias ácido lácticas a partir de frutos silvestres de la Estación La Favorita, actualmente se requiere continuar con la investigación sobre las características probióticas que posean las mismas. Con la finalidad de complementar el estudio investigativo sobre el perfil funcional de las nuevas cepas, que una vez evaluadas mediante la presencia de la actividad antimicrobiana y tolerancia a antibióticos en futuros estudios puedan agregarse a los alimentos, permitiendo proporcionar beneficios a las personas que consuman y por ende con avances en el campo agroindustrial.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antimicrobiana y susceptibilidad a los antibióticos de cepas de bacterias ácido lácticas con posible potencial probiótico.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la actividad antagonista frente a los patógenos de origen alimentario, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, de las cepas en estudio.

Evaluar la susceptibilidad a los antibióticos, gentamicina y ampicilina de las cepas en estudio.

1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.4.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Las cepas en estudio, poseen capacidad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y susceptibilidad a antibióticos.

1.4.2 HIPÓTESIS NULA

Las cepas en estudio, no poseen capacidad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y susceptibilidad a antibióticos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 FRUTOS SILVESTRES NATIVOS

“Los bosques húmedos de Ecuador cuentan con una gran vegetación y frutas, estos frutos por el simple hecho de ser silvestres no necesitan de químicos para que se desarrollen, brindan grandes beneficios y poseen varias cualidades” (Larco, 2012).

En su investigación Lema (s.f.), describe que los frutos silvestres nativos son propios de una zona vegetal, crecen de forma natural y espontánea, es decir para su desarrollo y producción no interfiere la mano del ser humano siendo varios de estos comestibles, además el autor añade que los frutos silvestres aportan a nuestro organismo elementos nutritivos de alto valor biológico, vitaminas, sales minerales y otras muchas sustancias activas de propiedades preventivas y curativas, que en su inmensa mayoría, están todavía por descubrir.

2.2 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA

De acuerdo a Cardozo y Ríos (2015), la fermentación ácido láctica es aquella que se lleva a cabo por las bacterias ácido lácticas (BAL) cuya actividad se desarrolla en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) y se manifiesta en la transformación de los azúcares presentes en vegetales, frutos y otros, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono; la fermentación láctica es causada por algunos hongos y bacterias, los autores mencionan que las bacterias más importantes que producen ácido láctico son del género *Lactobacillus*.

El ácido láctico, o su forma ionizada, el *lactato* (*del lat. lac, lactis, leche*), también conocido por su nomenclatura oficial *ácido 2-hidroxi-propanoico* o *ácido α -hidroxi-propanoico*, es un compuesto químico que juega importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la

fermentación láctica. Es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo, lo que lo convierte en un ácido α -hidroxílico (AHA) de fórmula $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). (Iñiguez & Castillo, 2011)

Tapias (sf), menciona que la fermentación ácido láctica se realiza a partir de la glucosa por acción de microorganismos homofermentativos del tipo de *Streptococos* y *Lactobacillus* (*Streptococcus thermophilus*. Stamen. 1905 - *Lactobacillus bulgaricus*. Ilya. 1908). La producción de ácido láctico ocurre entre un margen bastante amplio de temperaturas (10-50°C) y es llevada a cabo por un gran número de microorganismos.

2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

“Las bacterias lácticas son un grupo de bacterias Gram positivas, anaerobias, que producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación de los carbohidratos”. (FAO, s.f.)

En general las BAL son cocos o bacilos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. (Ramírez, Ulloa P, Velásquez, Ulloa A, & Arce, 2011)

A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento. En el año 2014, Batista y Cruz mencionan que el Agar MRS es un medio de cultivo especial para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas desarrollados por Man, Rogosa y Sharpe (Britania 2014). Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH 5,0, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies.

Según Ajila y Arce (2013), señalan que la importancia industrial de las BAL se evidencia debido a la contribución como flora saprófita de las superficies mucosas humanas. Los géneros básicos

que comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus* así como los *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*.

2.4 PROBIÓTICOS

“El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “*a favor de la vida*” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales” (FAO/OMS, 2001).

“Los probióticos son microorganismos vivos (principalmente bacterias) que colonizan el intestino y proporcionan efectos beneficiosos al huésped. Los probióticos son diferentes de distintos tipos de bacterias en la que están considerados como “buenos” o bacterias “no patógenas” (Lacy, 2013).

Los probióticos son comúnmente aislados del tracto intestinal de humanos y animales.

Lacy (2013), afirma que en nuestro intestino hay más de 500 tipos diferentes de bacterias beneficiosas, las bacterias son una parte normal de la microflora.

Algunos de los microorganismos probióticos incluyen básicamente bacterias y levaduras:

Tabla 1. Microorganismos conocidos como probióticos

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>
<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>Rhamosus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>

Fuente: (Ramírez, Ulloa P, Velásquez, Ulloa A, & Arce, 2011, pág. 8)

2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

Para que una cepa de probiótica sea potencial y pueda ejercer sus efectos beneficiosos, debe poseer ciertas propiedades deseables, que actualmente son comprobadas mediante ensayos *in vitro*:

- Resistir la acción del ácido del estómago y bilis, propiedad que es crucial para la administración oral.
- Capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal, una propiedad importante para la exitosa modulación inmune, exclusión competitiva de patógenos, así como prevención de la adherencia del patógeno y colonización.
- Presentar actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas.

Sin embargo, el valor de estos parámetros está siendo objeto de debate ya que hay cuestiones de relevancia, tanto *in vivo* e *in vitro* las discrepancias y falta de estandarización de los procedimientos que se debe tener en cuenta. Como no hay ningún parámetro específico esencial para todas las aplicaciones de probióticos, el mejor enfoque para establecer propiedades de una cepa es la población a la que va dirigida y estudios específicos de las funciones fisiológicas a lo que serán orientados. (Kechagia, *et al.*, 2013)

En su libro Barboza, Vásquez y Salcedo (2009), mencionan que los microorganismos probióticos deben resistir a las sales biliares, ser capaces de competir con otras bacterias o sus productos tóxicos y aniquilarlos mediante cambios de pH intestinal o por la producción de proteínas antibacterianas llamadas bacteriocinas.

Kechagia *et al.* (2013) añaden que existe una creciente evidencia a favor de las reivindicaciones de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos, incluyendo la mejora de la salud intestinal, mejora de la respuesta inmune, reducción de colesterol sérico y la prevención del cáncer. Mientras que algunos de los beneficios de salud están bien documentados otros requieren estudios adicionales para ser establecidos. De hecho, existe evidencia sustancial para

apoyar el uso de probióticos en el tratamiento de enfermedades diarreicas agudas, prevención de la diarrea asociada a antibióticos y la mejora del metabolismo de la lactosa.

2.4.1.1 Supresión de microorganismos patógenos

Con relación a la protección contra bacterias patógenas, los microorganismos probióticos usan varios mecanismos para ejercer su efecto antimicrobiano: producción de ácido láctico, ácido acético, etanol, bióxido de carbono, peróxido de hidrogeno (Barboza Corona, *et al.*, 2009).

En el año 2013, Fulladosa y Guàrdia mencionan que las bacterias lácticas pueden producir sustancias antagónicas como el diacetilo, el peróxido de hidrógeno, el acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular como la reuterina, la reuteriicina y el ácido piroglutámico y bacteriocinas que frenan el crecimiento de determinados microorganismos patógenos. Estas sustancias antimicrobianas presentan un efecto inhibitorio variable.

En su revista García C., López y García Y. (2010), señalan que la mayoría de bacteriocinas actúa contra bacterias Gram positivas, especialmente en microorganismos relacionados taxonómicamente. Sin embargo, hay bacteriocinas como la acidolina que inhiben ambas bacterias: Gram positivas y Gram negativas. Se conoce que *Lactobacillus acidophilus*. Ernst. 1900, entre otras muchas especies, pueden producir bacteriocinas en proporciones, con un efecto notable contra bacterias patógenas como *Salmonella sp.*, coliformes y *Campylobacters sp.*

2.4.2 OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

El sobrenadante es la fase líquida que se puede obtener mediante una centrifugación rápida de medio de cultivo líquido donde se han sembrado e incubado las bacterias probióticas, siendo liberado de las células bacterianas.

En el sobrenadante de BAL se puede encontrar compuestos de diferente naturaleza con actividad antibacteriana algunos de estos compuestos son: peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono,

diacetilo, reuterina, reuteriicina, bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) y peptidoglucano hidrolasas. (Salminen *et al.*, 2004 citado en Olvera, Serrano & Quirasco, 2015)

2.4.3 CLASIFICACIÓN DE PROBIÓTICOS

Existen diferentes grupos de probióticos que presentan grandes diferencias entre ellos, dos de estos grupos son:

- Probióticos Naturales. - Algunos de ellos se encuentran en los alimentos de consumo diario en forma natural. Los probióticos pueden estar presentes en lácteos fermentados como yogures, soya, cereales, productos cárnicos y bebidas alcohólicas artesanales. Sin embargo, es necesario análisis específicos de laboratorio que garanticen la existencia de cepas probióticas entre la microflora láctica de los alimentos.
- Probióticos Comerciales. - La industria para satisfacer las necesidades de las personas ha comercializado a varios probióticos con especialidades farmacéuticas y como complementos alimenticios. La reglamentación que los regula es diferente según el tipo de presentación comercial. Algunos de los probióticos con especialidades farmacéuticas son: Casenfilus[®](*L. acidophilus*), Infloran[®] (*L. acidophilus*, *B. bifidum*), Lacteol[®](*L. acidophilus*), Lactofilus[®] (*L. acidophilus*). (Cañedo, 2011)

Para la presente investigación se utilizó como control un probiótico comercial de origen farmacéutico que se detalla continuación:

2.4.3.1 Probiótico comercial (Lácteol Fort)

- **Composición:**

Cada cápsula contiene:

*Lactobacillus LB** inactivos: 5 billones

Medio de cultivo fermentado (neutralizado) 80 mg

Excipientes c.s.p.

**Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii*

- **Propiedades farmacológicas:**

- ◆ Antidiarréico de origen microbiano.
- ◆ Acción bacteriostática directa, debida a sustancias químicas contenidas en *Lactobacillus LB**.
- ◆ Estimulación de la flora intestinal acidógena de defensa.
- ◆ Intensa estimulación no específica de la mucosa (síntesis aumentada de IgA).
- ◆ Tratamiento sintomático de diarreas no orgánicas en adultos, niños y bebés. (Lancasco, 2012)

2.4.4 LOS ALIMENTOS PROBIÓTICOS

En el año 2009, Barboza *et al.* sugieren que los alimentos probióticos son aquellos a los cuales se les han adicionado microorganismos que benefician la salud de hospedero, manteniendo un equilibrio en la flora intestinal. En el mercado se puede encontrar una gran variedad de productos probióticos en diferentes presentaciones, que van desde yogurts, productos farmacéuticos, hasta fermentos lácteos agrdulces. Las bacterias que pueden servir como probióticos se pueden aislar de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano, de carnes, de frutas y de vegetales fermentados.

2.5 BACTERIAS PATÓGENAS

Las bacterias patógenas son microorganismos que pueden causar problemas severos desarrollándose en detrimento de este organismo y son capaces de causar enfermedades en personas animales y plantas. (Kioskea.net, 2014)

Las bacterias patógenas u oportunistas pueden ser de vida libre o parasitaria y en su gran mayoría son quimio heterótrofas. Se subdividen por su morfología y características de la pared (pared rígida: cocos, bacilos y espirilos; pared flexible: espiroquetas), motilidad (por deslizamiento, flagelos o flagelos axiales), y condiciones respiratorias (aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas). (Pumarola, 1987)

De acuerdo a Kioskea.net (2014), estas bacterias pueden ser eliminadas de forma natural por las células inmunitarias que las reconocen como extrañas y en caso de una respuesta insuficiente del organismo o de resistencia de estas bacterias, el tratamiento con antibióticos es necesario para combatir su proliferación.

Tabla 2. Alimentos que pueden estar contaminados de diferentes bacterias patógenas

BACTERIA	ALGUNOS ALIMENTOS QUE PUEDEN ESTAR CONTAMINADOS
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche cruda, pescado, carnes rojas, alimentos precocidos, vegetales crudos.
<i>Clostridium botulinum</i>	Enlatados, alimentos secos, zumos de frutas, gelatinas, carnes, agua.
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Lácteos, carnes, superficies (manos, alimentos, equipo, ropa, envases).
<i>Aeromona hidrófila</i>	Pescado, crustáceos, hortalizas y frutas frescas.
<i>Escherichia coli</i>	Panadería, enlatados, lácteos, huevos, pescado, zumos de frutas, agua.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Panadería, enlatados, cereales, lácteos, huevos, pescado, gelatina, carnes.
<i>Bacillus cereus</i>	Panadería, cereales, lácteos, huevos, pescado, zumos, gelatina, carnes.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Lácteos, panadería, huevos, pescado, zumos, hortalizas, frutas, carnes.
<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	Huevos, carne, alimentos precocidos.
<i>Pseudomonas sp.</i>	Agua, pescado, carne.
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Arroz hervido, leche cruda.

Fuente: (Barboza, Vásquez, & Salcedo, 2009, pág. 33)

2.5.1 BACTERIAS PATÓGENAS DE ESPECIE *Escherichia coli*

“La *Escherichia coli* es un bacilo corto Gram negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son

fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anerogénicas” (Rodríguez, Jiménez, Navarro, & Villarejo, 2011).

Según la FAO (2011), publicó que la *E. coli*, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente. *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad para causar una enfermedad grave como resultado de sus elementos genéticos para la producción de toxina, la adhesión y la invasión de las células huésped, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción del tejido.

Las infecciones producidas por cepas patógenas de esta especie pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patógenas: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica. Algunas cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. (Delgado, 2012)

En la publicación de Erika (2013), se indica que esta bacteria contamina las aguas superficiales (bebida y riego), las verduras y frutas y la superficie de las tierras de cultivo. Estas bacterias se multiplican a temperaturas entre 6 y 50° C, con una temperatura óptima alrededor de 37° C. También, pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias, como la *Salmonella* y sobreviven en pH ácidos de 4,4, aunque su pH óptimo es de 6 a 7.

2.5.2 BACTERIAS PATÓGENAS DE ESPECIE *Salmonella sp.*

Típicamente son bacilos de corta longitud que se definen como Gram negativos no esporulados. Son bacterias de respiración anaerobia facultativa que se caracterizan por ser oxidasa negativa. Mayoritariamente son bacterias móviles por la presencia de abundantes flagelos peritricos.

Las cepas de este género pueden desarrollarse en un amplio abanico de temperaturas que oscilan entre los 7 °C y los 48°C. Presentan un pH de crecimiento óptimo entre 4 y 8, y se desarrollan en ambientes con una actividad de agua del orden de 0,93. (Adelantado, *et al.*, s.f.)

2.5.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS EN EL ECUADOR

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2013), en Ecuador las enfermedades más comunes transmitidas por alimentos son: el cólera, fiebre tifoidea y paratifoidea, hepatitis A, infecciones debidas a *Salmonella* (entérica), intoxicaciones alimentarias bacterianas incluidas las producidas por *Escherichia coli*, shigelosis (disentería bacilar). En el año 2013, en la provincia de Imbabura hubo un registro de 1.424 habitantes con infecciones intestinales transmitidas por alimentos; esto equivale al 0,48% de la población.

2.6 ANTIBIÓTICOS

“Los antibióticos son medicamentos potentes que combaten las infecciones bacterianas. Su uso correcto puede salvar vidas. Actúan destruyendo las bacterias o impidiendo que se reproduzcan. Después de tomar los antibióticos, las defensas naturales del cuerpo son suficientes” (MedlinePlus, 2015)

En el año 2013, Lozoya menciona que los antibióticos actúan aniquilando las bacterias o impidiendo que estas se reproduzcan. En el primer caso reciben el nombre de bactericida, mientras que en el segundo se conocen como bacteriostáticos. Aclara también que los antibióticos no tienen ningún efecto contra los virus y sugiere que se debe tener en cuenta que cada vez que se toman antibióticos, las bacterias que se encuentran en el organismo se hacen más resistentes, de ahí la importancia de tomarlos solo cuando sea estrictamente necesario.

2.6.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

En su publicación Lozoya (2013), describe que los antibióticos se pueden clasificar según su mecanismo de acción:

- Betalactámicos (penicilinas), que actúan sobre la síntesis de la pared celular.

- Aminoglucósidos (gentamicina) antibióticos que tienen acción sobre la membrana citoplasmática.
- Azúcares complejos (clindamicina).
- Polipeptídicos (polimixina).
- Rifamicinas (rifampicina).
- Tetraciclinas (clortetraciclina).
- A nivel de síntesis de proteínas están: Amfenicoles (cloramfenicol).
- Macrólidos (eritromicina).
- Misceláneos (vancomicina, cicloserina).
- Quimioterápicos antibacterianos (sulfonamidas, quinolonas).

2.6.1.1 Ampicilina

La ampicilina es un antibiótico de amplio espectro que tiene un efecto bactericida e interfiere con la síntesis de la pared bacteriana, facilitando su destrucción, tanto en cepas susceptibles de bacterias Gram positivas (*Streptococos hemolíticos* α y β , *Streptococos pneumoniae*, *Staphilococcus* no productores de penicilinas, *Bacillus anthracis* y casi todas las cepas de enterococos), como Gram negativas (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y muchas cepas de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*). (Vademecum, 2015)

2.6.1.2 Gentamicina

Es un antibiótico aminoglucósido de administración parenteral, tópica y uso oftálmico. Tiene efecto concentración dependiente, efecto post antibiótico prolongado y acción sinérgica con

antibióticos betalactámicos. Posee un espectro antimicrobiano principalmente frente a bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus*, *Serratia*) y tiene actividad frente a ciertas bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*). En combinación con antibióticos betalactámicos es eficaz en infecciones producidas por *E. fecalis* y *Streptococcus sp.* (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum., 2012)

2.6.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

De acuerdo con el Porta de Salud de la Comunidad Médica (2014), la resistencia antimicrobiana es la capacidad de los microorganismos a sobrevivir o incluso a crecer y multiplicarse, en presencia de un agente antimicrobiano, tales como los antibióticos, a concentraciones normalmente suficientes para inhibir o matar microorganismos.

Lo que menciona en la investigación el autor corporativo es de suma importancia, puesto que la eficacia del tratamiento utilizado contra la infección humana dependerá, entre otros factores, de la posibilidad de que la bacteria sea resistente a los antimicrobianos.

2.7 MEDIOS DE CULTIVOS PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En su investigación Rodríguez (2007), cita que los medios de cultivos más utilizados para aislar bacterias ácido lácticas son: MRS (De Man Rogosa y Sharpe, 1960) para el crecimiento de *Lactobacillus sp.*, M17 (Broth) para *Lactococcus sp.*, MSE (Mayeux, Sandine y Elliker) para *Leuconostoc sp.* A continuación, se detalla las características principales del medio de cultivo MRS que ha sido utilizado en la presente investigación.

Los medios de cultivo para bacterias lácticas típicamente incluyen fuentes de carbohidratos, siendo que la mayoría de estas especies son incapaces de aprovechar la respiración celular.

2.7.1 MEDIO DE CULTIVO MRS

2.7.1.1 Uso

En el año 2010, Laboratorios Britania S.A. describe que el MRS es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas, alimentos (especialmente productos lácteos), suelo, agua y materiales vegetales (flores, frutas).

2.7.1.2 Fundamento

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (Man *et al.*, 1960), y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. El agar es el agente solidificante. (Laboratorios Britania S.A., 2010)

2.7.1.3 Características

Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar oscuro (Laboratorios Britania S.A., 2010).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Las actividades de la presente investigación estuvieron planteadas dentro del Proyecto Prometeo: *Bioprospección y mejoramiento de cepas de bacterias, hongos y levaduras de zonas no explotadas para el desarrollo de nuevos probióticos a ser aplicadas en la producción de alimentos*, que se desarrolló en la Carrera de Ingeniería Agroindustrial en el Laboratorio de Análisis Físico Químico, Microbiológico y de Biología Molecular de la Universidad Técnica del Norte perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, ubicado en la ciudad de Ibarra Av. 17 de Julio 5-21. Sector “El Olivo”.

Tabla 3. Datos Climatográficos

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Ubicación	0° 17' 30" y 0° 22' 30" de latitud norte y sur 78° 05' 00" y 78° 09' 00" de longitud este y oeste.
Altura	2225 m.s.n.m.
Clima	Se caracteriza por un clima templado seco con una temperatura promedio de 18° C.
Precipitaciones	1000 mm a 1400 mm/año.

Fuente: <http://www.ibarra.gob.ec>

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Control: Probiótico comercial (*Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii*.
AXCAN PHARMA S.A Houdan - Francia)
- Cepas indicador: *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

3.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Materiales

- Cajas Petri.
- Tubos de ensayo.
- Asas.
- Porta y cubre objetos.
- Frascos de vidrio autoclavables.
- Frascos Erlenmeyer.
- Pipetas y micro pipetas.
- Vasos de precipitación.
- Hisopos.
- Pinzas.
- Micropipetas.

Equipos

- Espectrofotómetro UV visible MIKRO 200 visible.
- Balanza analítica sensibilidad 0,1g.
- Incubadora 20 l de capacidad temperatura de incubación 37°C.
- Potenciómetro con electrodo para medir pH, temperatura y conductividad.
- Plancha de calor de cerámica 15x15 cm y agitador magnético.

- Autoclave capacidad 50 l mandos digitales.
- Tubos ependorf
- Microscopio binocular con luz alógena y aumento de hasta 100X.
- Cámara de Flujo Laminar con lámpara ultravioleta, sistema de purificación de aire y con mesa de 1m.
- Refrigerador.
- pH – metro digital (rango: 0-14)

Reactivos

- Medios de cultivo: Agar Nutriente, Bacto Agar, Chromocult Coliformen Agar, LB Broth, Miller (Luria Bertani), MRS agar, *Salmonella Shigella* Agar (SS Agar), proveedor Difco.
- Agua destilada.
- Ácido clorhídrico 0,1 Normal.
- Hidróxido de sodio 1 Normal.
- Colorantes: cristal violeta, safranina.
- Lugol.
- Solvente orgánico (alcohol y acetona).
- Discos comerciales con antibióticos:
 - Ampicilina 10 µg (AM 10) y
 - Gentamicina 10 µg (GM 10), proveedor Difco.

3.3 MÉTODOS DEL EXPERIMENTO 1

La investigación constó de dos experimentos, en el primero se evaluó la capacidad antagonista de las cepas de BAL a dos pHs diferentes, frente a dos patógenos de origen alimentario los factores en estudio se describen a continuación:

3.3.1 FACTORES EN ESTUDIO

Los parámetros en estudio estuvieron constituidos por las cepas con posible potencial probiótico, rangos de pH de las cepas de interés y bacterias patógenas (indicador) para la determinación de la capacidad antimicrobiana.

Factor A: cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial

- A1: UTNFa 37 = BAL 1
- A2: UTNFa 38 = BAL 2
- A3: UTNFa 39 = BAL 3
- A4: UTNFa 40 = BAL 4
- A5: UTNFa 41 = BAL 5
- A6: *Lactobacillus LB** (Probiótico comercial) = Lac1

Factor B: Diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial.

- B1: pH 3,0
- B2: pH 4,0

Factor C: bacterias patógenas

- C1: *Escherichia coli*
- C2: *Salmonella sp.*

3.3.2 TRATAMIENTOS

Se evaluó 24 tratamientos, resultado de la combinación de factores en estudio, fueron:

Tabla 4. Descripción de los factores: cepas de interés y probiótico comercial (A), diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial (B) y bacterias patógenas (C).

Nº	SIMBOLOGÍA DE LOS TRATAMIENTOS	TRATAMIENTOS	COMBINACIÓN FACTORIAL
1	T 1	A1B1C1	BAL 1 + pH 3,0 + <i>E. coli</i>
2	T 2	A1B1C2	BAL 1+ pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
3	T 3	A1B2C1	BAL 1 + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
4	T 4	A1B2C2	BAL 1 + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>
5	T 5	A2B1C1	BAL 2 + pH 3,0 + <i>E. coli</i>
6	T 6	A2B1C2	BAL 2 + pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
7	T 7	A2B2C1	BAL 2 + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
8	T 8	A2B2C1	BAL 2 + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>
9	T 9	A3B1C1	BAL 3 + pH 3,0 + <i>E. coli</i>
10	T 10	A3B1C2	BAL 3 + pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
11	T 11	A3B2C1	BAL 3 + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
12	T 12	A3B2C2	BAL 3 + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>
13	T 13	A4B1C1	BAL 4 + pH 3,0 + <i>E. coli</i>

14	T 14	A4B1C2	BAL 4 + pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
15	T 15	A4B2C1	BAL 4 + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
16	T 16	A4B2C2	BAL 4 + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>
17	T 17	A5B1C1	BAL 5 + pH 3,0 + <i>E. coli</i>
18	T 18	A5B1C2	BAL 5 + pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
19	T 19	A5B2C1	BAL 5 + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
20	T 20	A5B2C1	BAL 5 + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>
21	T 21	A6B1C1	<i>Lac 1</i> + pH 3,0 + <i>E. coli</i>
22	T 22	A6B1C2	<i>Lac 1</i> + pH 3,0 + <i>Salmonella sp.</i>
23	T 23	A6B2C1	<i>Lac 1</i> + pH 4,0 + <i>E. coli</i>
24	T 24	A6B2C2	<i>Lac 1</i> + pH 4,0 + <i>Salmonella sp.</i>

3.3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.3.1 Tipo de diseño

Por tratarse de un experimento en donde todas las condiciones fueron controladas, se optó por aplicar un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), con tres repeticiones y arreglo factorial A x B x C más un testigo comercial, en la evaluación de la capacidad antimicrobiana.

Cuando se detectó diferencia significativa entre tratamientos se utilizó las pruebas de Tukey y Duncan para analizar los factores, además se calculó el coeficiente de variación para todas las variables en estudio.

3.3.4 CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO

Repeticiones 3

Tratamientos 24

Unidades Experimentales 72

3.3.5 CARACTERÍSTICAS DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL

En el experimento se trabajó con 72 unidades experimentales.

3.3.6 ESQUEMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El esquema del análisis estadístico se presenta en el siguiente cuadro:

Tabla 5. ADEVA DEL EXPERIMENTO 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	71
Tratamientos	23
Factor A	5
Factor B	1
Factor C	1
A x B	5
A x C	5
B x C	1
A x B x C	5
Error Experimental	48

3.3.7 ANÁLISIS FUNCIONAL

- Prueba de Tukey al 5% para tratamientos
- DMS al 5% para factores A
- DMS al 5% para factores B
- DMS al 5% para factores C

3.3.8 VARIABLES A EVALUARSE

3.3.8.1 Variables Cuantitativas

- Medida del diámetro de la zona de inhibición (mm).
- Tiempos de incubación (horas).

3.4 MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.4.1 MEDIDA DE LA ZONA DE INHIBICIÓN

Se midió el diámetro de la zona de inhibición en cada placa.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión agar (Kirby - Bauer) con algunas modificaciones. La lectura se llevó a cabo, después de la incubación a 37°C las cepas de interés a dos pH aparecieron zonas de inhibición. Los diámetros de estas zonas se midieron cuidadosamente por la parte posterior de la placa con una regla. Fue necesario, ubicar la placa a contra luz o utilizar una fuente de luz brillante.

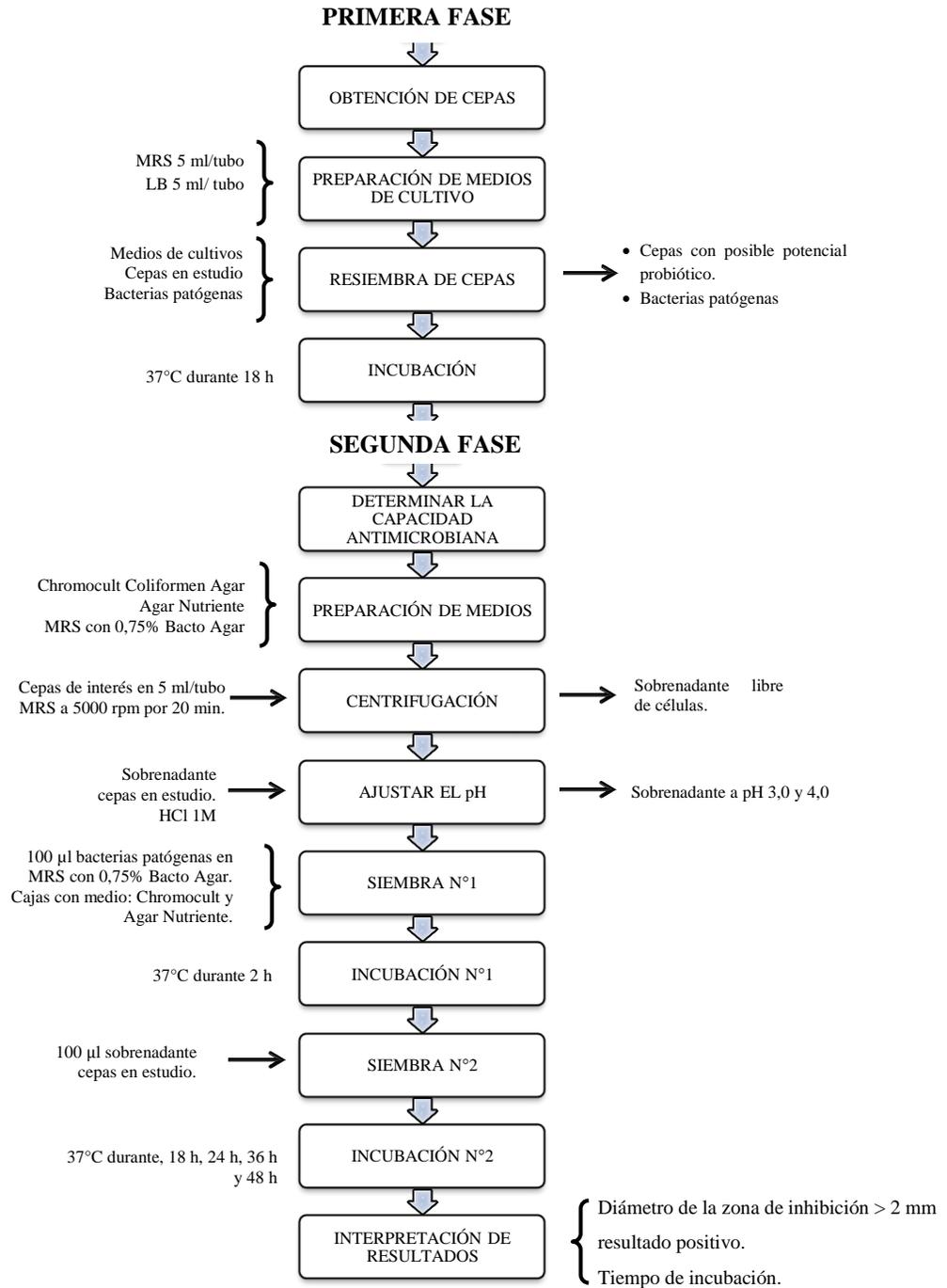
Las mediciones se realizaron con una aproximación de 1 mm. El operador debe tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por el efecto de paralaje. Si la medida de la zona de inhibición formada

por los microorganismos en estudio es mayor a 2 mm, se dice que presentan actividad antimicrobiana, caso contrario la actividad antagonista es nula. (López Teves & Torres, 2006)

3.4.2 TIEMPO DE INCUBACIÓN

Los valores del diámetro de la zona de inhibición se registraron en diferentes intervalos de tiempo de incubación durante dos días (18 horas, 24 horas, 36 horas y 48 horas), el experimento se realizó tres veces en el mismo horario y se procedió a calcular la media aritmética. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril (no presentó zona de inhibición después del tiempo de incubación).

3.5 DIAGRAMA DE PROCESO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.



3.6 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

3.6.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO

3.6.1.1 Cepas en estudio

Previamente en el laboratorio se aislaron numerosos microorganismos ácidos lácticos de los cuales para este estudio se seleccionaron cinco cepas. Estas cepas fueron aisladas y purificadas de cinco muestras de frutos silvestres de la estación experimental La Favorita, Ecuador. Los microorganismos previamente se identificaron y se caracterizaron fenotípicamente mediante análisis bioquímicos y microbiológicos para determinar el posible potencial probiótico.

3.6.1.2 Microorganismos indicadores

Se obtuvo dos bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* aisladas de alimentos (queso y piel de pollo) de consumo en el mercado Amazonas de la ciudad de Ibarra.

3.6.2 RESIEMBRA DE CEPAS

3.6.2.1 Cepas con potencial probiótico

Para realizar la resiembra de las cepas puras, se preparó medio MRS líquido (5ml/tubo). Se incubó a 37 °C durante 18 horas.

3.6.2.2 Microorganismos indicadores en estudio: *E. coli* y *Salmonella sp.*

Se preparó medio LB caldo (5 ml/tubo), con el fin de enriquecer el crecimiento de bacterias patógenas. Se dejó incubar a 37 °C durante 18 horas.

3.6.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Para la prueba de actividad antimicrobiana, se utilizó el método de difusión en agar (agar well diffusion method) conocido también como el método de sobrenadante en pocillos (Pakistan, 2007).

3.6.4 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se preparó dos medios de cultivo: agar nutriente repartido en cajas Petri, para ser utilizado en la siembra de *Salmonella sp.* y medio Chromocult Coliformen Agar repartido en cajas Petri para la siembra de *E. coli*.

3.6.5 CENTRIFUGACIÓN

Transcurrido el tiempo de incubación de las cepas de interés, se centrifugaron a 5000 revoluciones por 20 minutos. Para la obtención de una cultura libre de células, el sobrenadante se filtró mediante el uso de filtros de porosidad de 0,45 micras.

3.6.6 AJUSTAR EL PH

El sobrenadante fresco de las cepas en estudio, se ajustó a pH 3,0 y 4,0 utilizando una solución de ácido clorhídrico (HCl 1M).

3.6.7 SIEMBRA N° 1

Se inoculó 100 µl de cada bacteria patógena desarrollada previamente en medios de cultivos específicos, en 3,5 ml de MRS con 0,75% de agar, inmediatamente se repartió en las cajas Petri que contenían Agar Nutriente y Chromocult Coliformen Agar; se sembró con hisopos

previamente estériles, con el fin de conseguir un crecimiento en toda la caja a manera de un césped.

3.6.8 INCUBACIÓN N° 1

Se incubó las bacterias patógenas a 37°C por 2 horas.

3.6.9 SIEMBRA N° 2

Al finalizar el tiempo de incubación de las cepas patógenas, se hicieron orificios en los medios de cultivo, donde se colocó 100 µl de sobrenadante de las cepas en estudio libre de células, incluyendo un orificio para el control negativo donde se colocó agua estéril purificada.

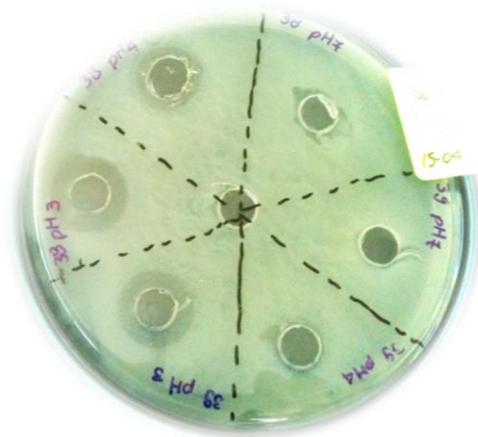
3.6.10 INCUBACIÓN N° 2

Se incubó por 18 horas, 24 horas, 36 horas y 48 horas a 37°C; en cada intervalo de tiempo se midieron las zonas de inhibición.

3.6.11 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La formación de una zona transparente (zona de inhibición) fue considerado un resultado positivo.

Si el diámetro de la zona de inhibición era mayor que 2 mm el resultado de la actividad antagonista sería positivo, se establecieron diferentes tiempos de incubación. En el transcurso de cada periodo de incubación se realizó tablas de datos que contenían los diámetros respectivos a cada zona de inhibición.



Fotografía 1. Vista de la zona inhibición (zona transparente) formada por los sobrenadantes de las cepas de interés

3.7 MÉTODOS DEL EXPERIMENTO 2

En la segunda parte experimental se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos, gentamicina y ampicilina de las cepas en estudio, los factores en estudio se describen a continuación:

3.7.1 FACTORES EN ESTUDIO

Los parámetros de estudio estuvieron constituidos por las cepas de interés, rangos de concentración (UFC/ml) de las BAL en estudio y dos antibióticos.

Factor A: cepas de interés y un probiótico comercial

- A1: BAL 1 = UTNFa 37
- A2: BAL 2 = UTNFa 38
- A3: BAL 3 = UTNFa 39
- A4: BAL 4 = UTNFa 40

- A5: BAL 5 = UTNFa 41
- A6: *Lactobacillus LB** (Probiótico comercial) = Lac1

Factor B: concentraciones de las cepas en estudio y del probiótico comercial.

- B1: 10^6 UFC/ml
- B2: 10^8 UFC/ml

Factor C: antibióticos

- C1: Ampicilina 10 μ g (AM 10)
- C2: Gentamicina 10 μ g (GM 10)

Tabla 6. Interpretación de los resultados Método de difusión del disco - Normas EFSA

Bacterias	Antimicrobiano	Resistente Halo (mm)	Sensibilidad media Halo (mm)	Sensible Halo (mm)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
<i>Lactobacillus brevis</i>				
<i>Lactobacillus casei</i>	Ampicilina	≤ 12 mm	13 – 15 mm	≥ 16 mm
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>				
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Gentamicina			
<i>Bifidobacterium Longum</i>		≤ 12 mm	- mm	≥ 13 mm
<i>Lactococcus lactis</i>				
<i>Bacillus coagulans</i>				

Fuente: European Food Safety Authority, 2012 Citado en Cano, 2014.

3.7.2 VARIABLES A EVALUARSE

3.7.2.1 Variables Cuantitativas

- Medida del diámetro del halo de inhibición (mm).
- Tiempo de incubación (horas).

3.8 MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.8.1 MEDIDA DEL HALO DE INHIBICIÓN

Después de diferentes periodos de incubación a una temperatura de 37°C, se midió el diámetro del halo de inhibición.

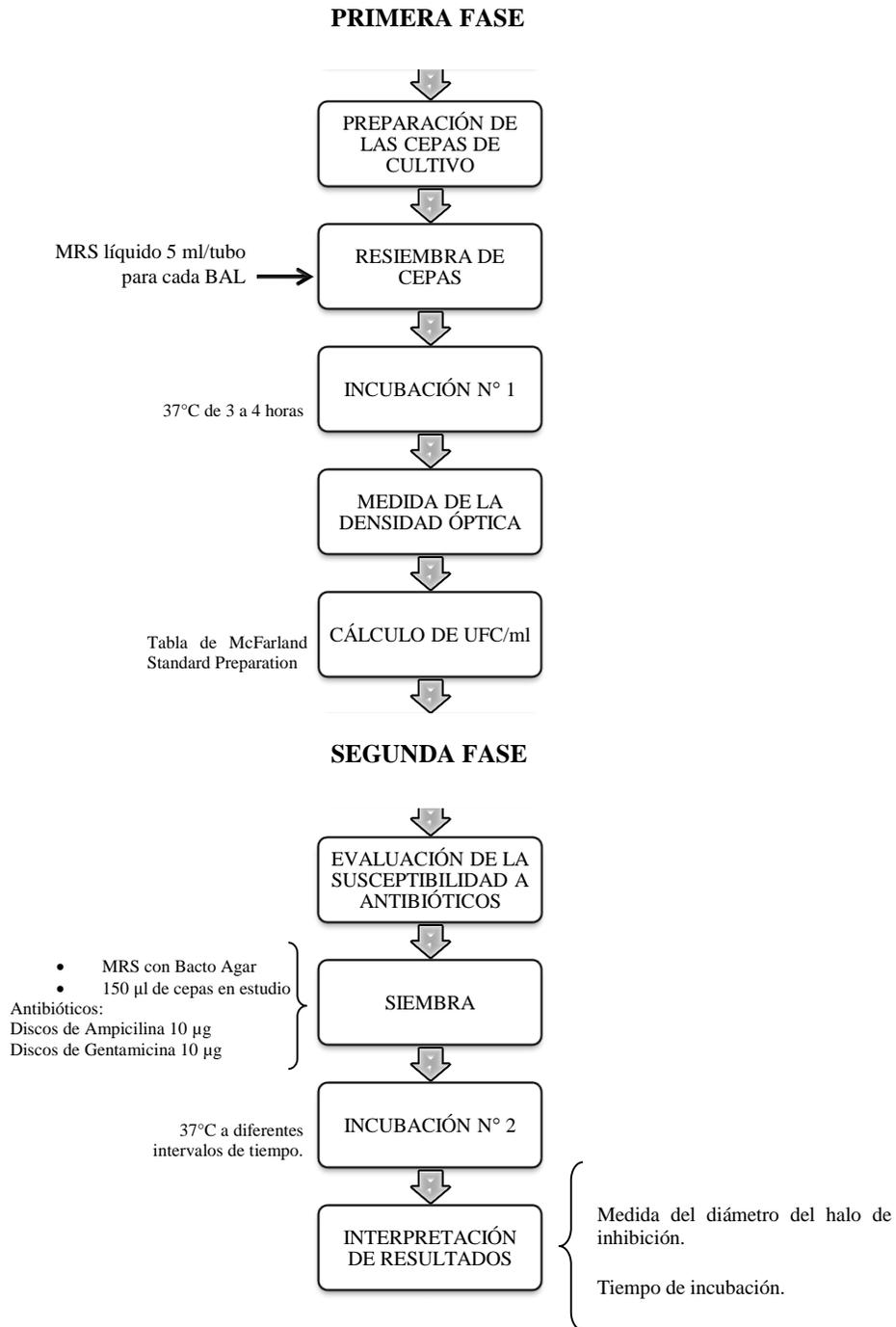
Esta actividad de los antimicrobianos tiene un reflejo macroscópico que se pudo medir de manera *in vitro*, conocido como antibiograma. En este procedimiento se utilizó discos de papel que contenían el antibiótico de interés (Kirby Bauer). (Maldonado & Prieto, 2008)

En un cuadro de datos constaron las medidas. La interpretación consiste en medir los halos de inhibición (incluidos los discos de antibióticos) con una regla, que se expresa en milímetros, para obtener una medida correcta se debió ubicar las placas a contra luz y se tomó la medida desde la parte posterior. Se interpretó las medidas de inhibición como: Resistente, sensibilidad media y sensible en correlación con cada uno de los antibióticos comparando dicho antibiograma con las Normas EFSA.

3.8.2 TIEMPO DE INCUBACIÓN

En cuadros de datos se registraron los valores de los halos de inhibición de cada cepa de interés incluido el control comercial en diferentes intervalos de tiempos de incubación a 37°C por dos días cada 12 horas (12, 24, 36 y 48 h), se realizó tres repeticiones.

3.9 DIAGRAMA DE PROCESO PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.



3.10 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE INTERÉS

Para la evaluación de tolerancia, se utilizó el método por disco difusión.

3.10.1 MÉTODO POR DISCO DIFUSIÓN

En la investigación de Taroco, Seija y Vignoli (2008), describen que el método por disco difusión es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la susceptibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por disco difusión está basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores.

El método por disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar como el medio Mueller Hinton (MH) previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

La lectura de los halos de inhibición se interpretó como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el EFSA. (Anexo. A)

3.10.2 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS DE CULTIVO

Se preparó MRS líquido 5 ml por cada tubo.

3.10.3 RESIEMBRA DE CEPAS

En tubos con MRS preparados previamente, se sembró una célula de las cepas en estudio.

3.10.4 INCUBACIÓN N°1

Se incubó los microorganismos en estudio a 37°C de 3 a 4 horas.

3.10.5 MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA A DO600

En un espectrofotómetro UV visible MIKRO 200 visible se midió la densidad óptica de cada cepa en estudio. Para realizar dicha medición se tomó como referencia el método del turbidímetro citado en (Gamazo, Sánchez, & Camacho, 2013), donde indica que la turbidez (densidad óptica) de una suspensión celular está correlacionada con su concentración celular. Esta medida puede determinarse directamente mediante un espectrofotómetro, o bien mediante comparación con la escala de McFarland. Esta última consiste en una serie de tubos con turbidez creciente según una escala de 0,5 a 10 y es de gran utilidad para tener una idea aproximada de la población bacteriana de una muestra.

3.10.6 CÁLCULO DE LAS UFC/ml

Una vez registrados los datos de la densidad óptica, se transformaron a UFC/ml utilizando la tabla de McFarland Standard Preparation; se obtuvo dos concentraciones diferentes de cada cepa: 10^6 UFC /ml y 10^8 UFC /ml.

3.10.7 EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ANTIBIÓTICOS

Fue necesario cajas Petri con medio MRS agar y discos de antibióticos impregnados con ampicilina y gentamicina con concentración de 10 µg (Difco, BRL).

3.10.8 SIEMBRA

Se inoculó 150 µl de las dos concentraciones diferentes de cada cepa: 10^6 UFC /ml y 10^8 UFC/ml, se sembró con hisopos previamente estériles, con el fin de conseguir un crecimiento

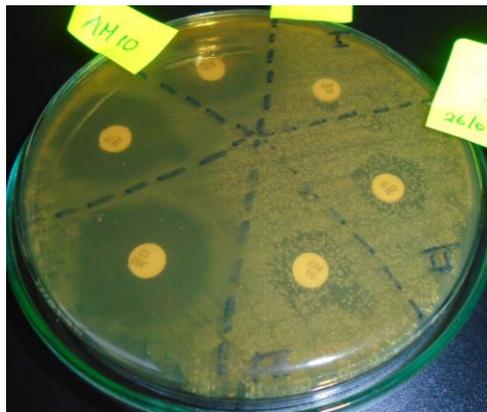
uniforme en toda la caja a manera de un césped. Los discos de antibióticos se colocaron en las cajas Petri a distancias apropiadas.

3.10.9 INCUBACIÓN N° 2

Las cajas se incubaron en condiciones anaerobias durante 37 °C a diferentes intervalos de tiempo empezando a las 12 horas siguiendo con la medida a las 24, 36 y 48 horas de incubación.

3.10.10 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se midieron los halos de inhibición formados alrededor de los discos de antibióticos, estos valores se registraron en milímetros, incluyendo el diámetro de los discos de antibióticos y se compararon los resultados con las sensibilidades establecidas en las Normas del EFSA. Se realizó tablas de datos. Dependiendo de los valores de la medida, los microorganismos se clasificaron como: Resistente, Intermedio sensible y Sensible.



Fotografía 2. Vista del halo de inhibición (zona transparente) formado por los antibióticos, en presencia de las BAL

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana y la susceptibilidad a los antibióticos de algunas bacterias ácido lácticas aisladas a partir de microflora nativa de Ecuador. Se ha elegido para este ensayo cinco cepas nativas y una cepa comercial.

4.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE INTERÉS.

Las cepas de interés en este estudio fueron:

BAL 1: UTNFa 37

BAL 2: UTNFa 38

BAL 3: UTNFa 39

BAL 4: UTNFa 40

BAL 5: UTNFa 41

Probiótico comercial: *Lactobacillus LB** = Lac1

Patógenos: *E. coli* y *Salmonella sp.*

Las zonas de inhibición formadas por las cepas de interés y el probiótico comercial a pH 3,0 y 4,0 fueron medidas en cuatro tiempos distintos de incubación (18, 24, 36 y 48 horas), en todos los periodos de incubación la temperatura fue constante de 37°C. Se aplicó la estadística básica y la estadística con análisis de varianza, la comparación de datos fue establecida tomando como

base los 5 mm de diámetro para las zonas de inhibición, al ser menor la actividad antagonista sería nula y al ser mayores los valores presentaría inhibición.

4.1.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *E. coli*

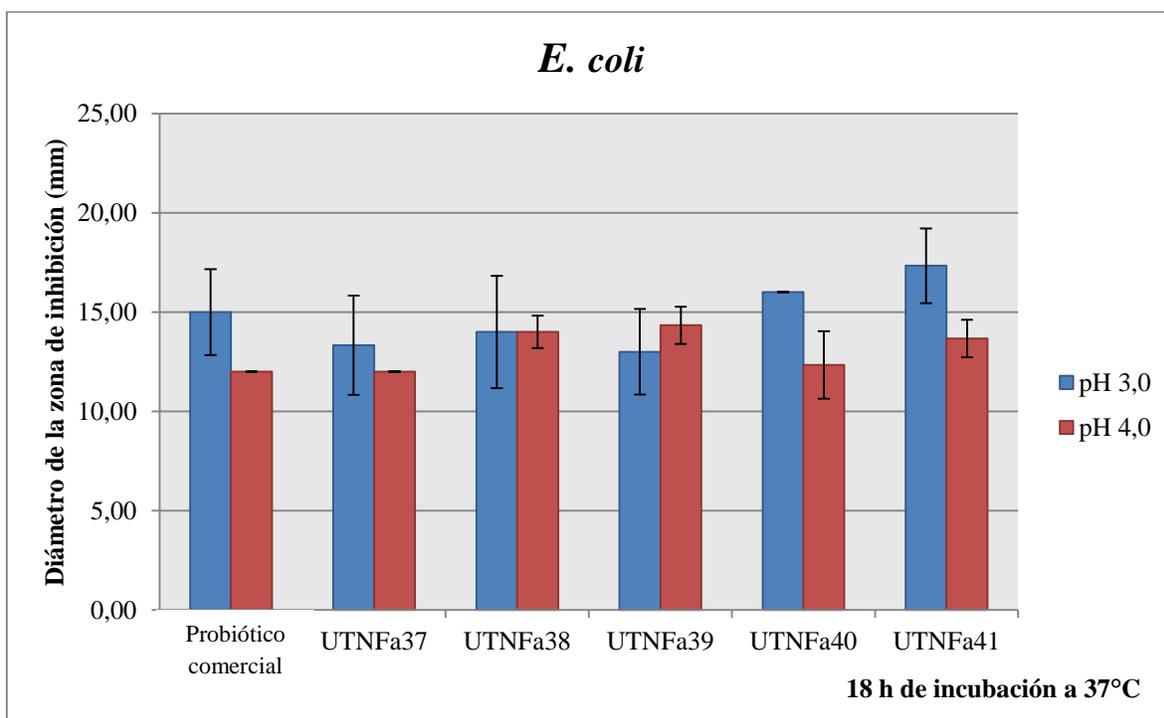
Tabla 7. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 3,0

18 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	12	17	16	15,00	2,16
UTNFa37	10	16	14	13,33	2,49
UTNFa38	10	16	16	14,00	2,83
UTNFa39	10	14	15	13,00	2,16
UTNFa40	16	16	16	16,00	0,00
UTNFa41	20	16	16	17,33	1,89

Tabla 8. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 4,0

18 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	12	12	12	12,00	0,00
UTNFa37	12	12	12	12,00	0,00
UTNFa38	14	13	15	14,00	0,82
UTNFa39	15	15	13	14,33	0,94
UTNFa40	10	13	14	12,33	1,70
UTNFa41	15	13	13	13,67	0,94

En la Tabla 7 y Tabla 8, se encuentran detalladas las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición que fueron formadas a las 18 horas de incubación por las cepas de interés y el probiótico comercial frente al patógeno *E. coli*. El ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se hizo el cálculo de los promedios y la desviación estándar; en la Tabla 7 el sobrenadante de las cepas en estudio estuvo a pH 3,0 y en la Tabla 8 a pH 4,0. En el control negativo (agua destilada estéril) no se registró la formación del halo de inhibición.



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 1. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *E. coli*, después de 18 h de incubación.

En la Figura 1, se observa la comparación entre las medidas de las zonas de inhibición cuando el sobrenadante de cada BAL estuvo a pH 3,0 y pH 4,0 con el mismo tiempo y temperatura de incubación (18 horas a 37°C), los valores de los diámetros varían en mínimas cantidades, de 1

a 3 mm; siendo todos mayores a 5 mm, mostrando elevada actividad antimicrobiana frente al patógeno *E. coli*. El probiótico comercial presentó elevada actividad antimicrobiana frente al patógeno alimentario antes mencionado, sin embargo, la cepa con código UTNFa 41 a pH 3,0 y la cepa UTNFa 39 a pH 4,0 formaron diámetros más grandes en comparación con el testigo comercial. Alrededor del control negativo (agua estéril) no se identificó la presencia de la zona de inhibición.

Tabla 9. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 3,0

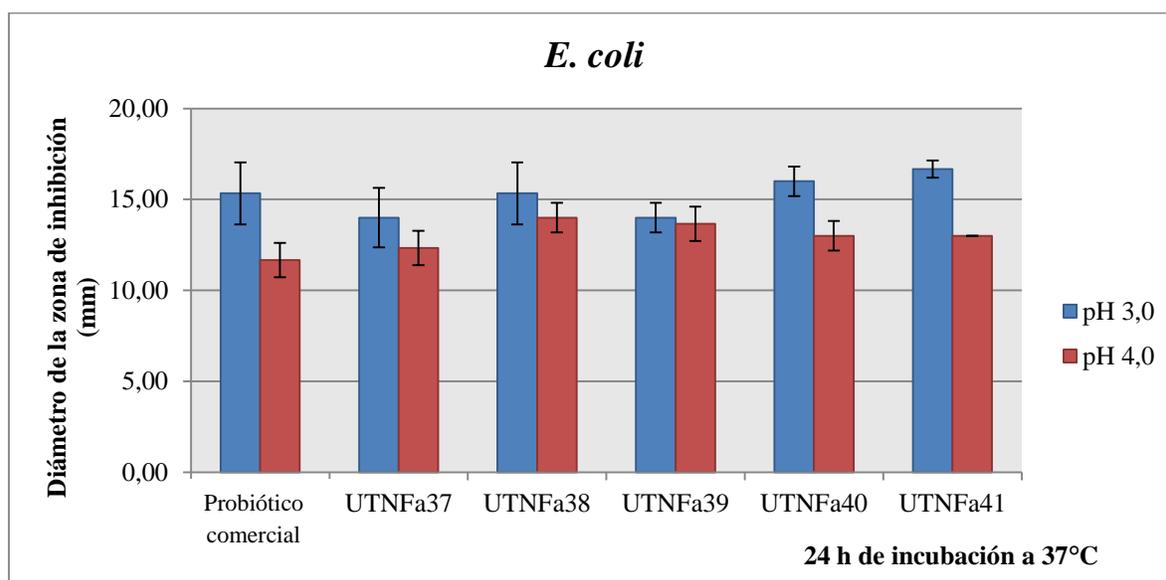
24 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	13	17	16	15,33	1,70
UTNFa37	12	16	14	14,00	1,63
UTNFa38	13	16	17	15,33	1,70
UTNFa39	13	14	15	14,00	0,82
UTNFa40	16	15	17	16,00	0,82
UTNFa41	16	17	17	16,67	0,47

En la Tabla 8, se puede observar las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición a las 24 horas de incubación, el sobrenadante estuvo a pH 3,0; la cepa UTNFa 41 tuvo el promedio más alto de 16,67 ($\pm 0,47$) mm el halo de inhibición formado por esta cepa fue mayor al del testigo comercial, sin embargo, todas las cepas presentan actividad antagonista frente a *E. coli*.

Tabla 10. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas; pH: 4,0

24 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	11	11	13	11,67	0,94
UTNFa37	11	13	13	12,33	0,94
UTNFa38	13	14	15	14,00	0,82
UTNFa39	13	15	13	13,67	0,94
UTNFa40	12	14	13	13,00	0,82
UTNFa41	13	13	13	13,00	0,00

En la Tabla 10, se detallan las medidas de las zonas de inhibición de las BAL y del probiótico comercial formados cuando el pH de los sobrenadantes fue 4,0, a las 24 horas de incubación. Los valores, en comparación a las 18 horas de incubación disminuyeron en 1 a 2 mm, la cepa UTNFa 38 con un promedio de 14,00 mm en su diámetro de inhibición, mostró que presenta la mejor actividad inhibitoria frente a la bacteria *E. coli*, incluso el diámetro fue mayor que el del control comercial.



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 2. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *E. coli*, después de 24 h de incubación.

En la Figura 2, se presentan las comparaciones entre los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición formadas por los sobrenadantes de las cepas de interés a un pH 3,0 y pH 4,0, los valores de los diámetros disminuyen cuando el sobrenadante está a pH 4,0. Todas las cepas en estudio y el testigo comercial presentan elevada actividad antimicrobiana frente al patógeno indicador con diámetros mayores a 10 mm, es importante señalar que se presenta mayor actividad antagonista cuando los sobrenadantes están a pH 3,0 siendo el caso del probiótico comercial y las cepas: UTNFa 38, UTNFa 40 y UTNFa 41 que sus diámetros fueron mayores a 15 mm.

Tabla 11. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 3,0

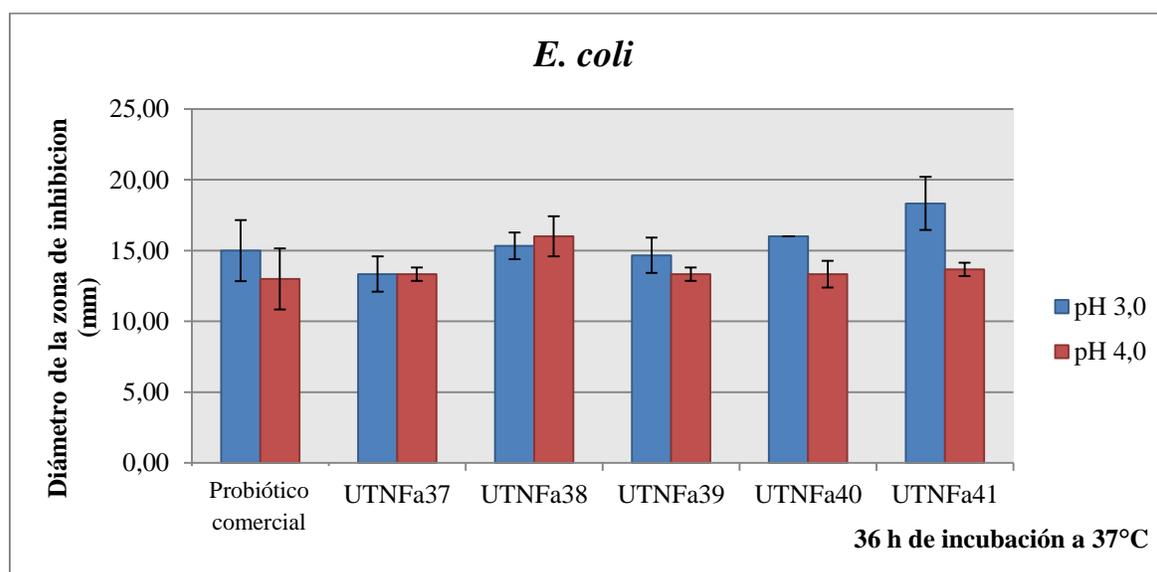
36 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	12	17	16	15,00	2,16
UTNFa37	12	15	13	13,33	1,25
UTNFa38	14	16	16	15,33	0,94
UTNFa39	16	13	15	14,67	1,25
UTNFa40	16	16	16	16,00	0,00
UTNFa41	21	17	17	18,33	1,89

A las 36 horas de incubación los promedios indican que las cepas de interés y el probiótico comercial presentan elevada actividad antimicrobiana. El sobrenadante a pH 3,0 de la cepa UTNFa 41 formó el halo con promedio más alto de 18,33 ($\pm 1,89$) mm, a este periodo la zona de inhibición aumentó alrededor de 2 mm más, en comparación con el valor de la Tabla 9; esta BAL ha demostrado mejor capacidad antagonista incluso superándole al probiótico comercial ($15 \pm 2,16$ mm).

Tabla 12. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas; pH: 4,0

36 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	16	11	12	13,00	2,16
UTNFa37	13	14	13	13,33	0,47
UTNFa38	17	17	14	16,00	1,41
UTNFa39	13	14	13	13,33	0,47
UTNFa40	12	14	14	13,33	0,94
UTNFa41	14	14	13	13,67	0,47

Como se puede observar en la Tabla 12, a pH 4,0 los promedios de las zonas de inhibición de las BAL y del testigo comercial, aumentaron en 1 mm en relación con los promedios de los periodos anteriores de incubación; la cepa UTNFa 38 fue la que mejor inhibió al patógeno *E. coli* a este pH.



Probiótico comercial = *Lactobacillus LB**

Figura 3. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *E. coli*, después de 36 h de incubación.

La Figura 3, muestra la comparación de los promedios de las zonas de inhibición a dos pH diferentes; a pH 3,0 continúan siendo los valores más significativos que a pH 4,0, sin embargo, como se mencionó anteriormente, las cepas y el control comercial presentan elevada actividad antagonista con sobrenadantes a los dos pHs.

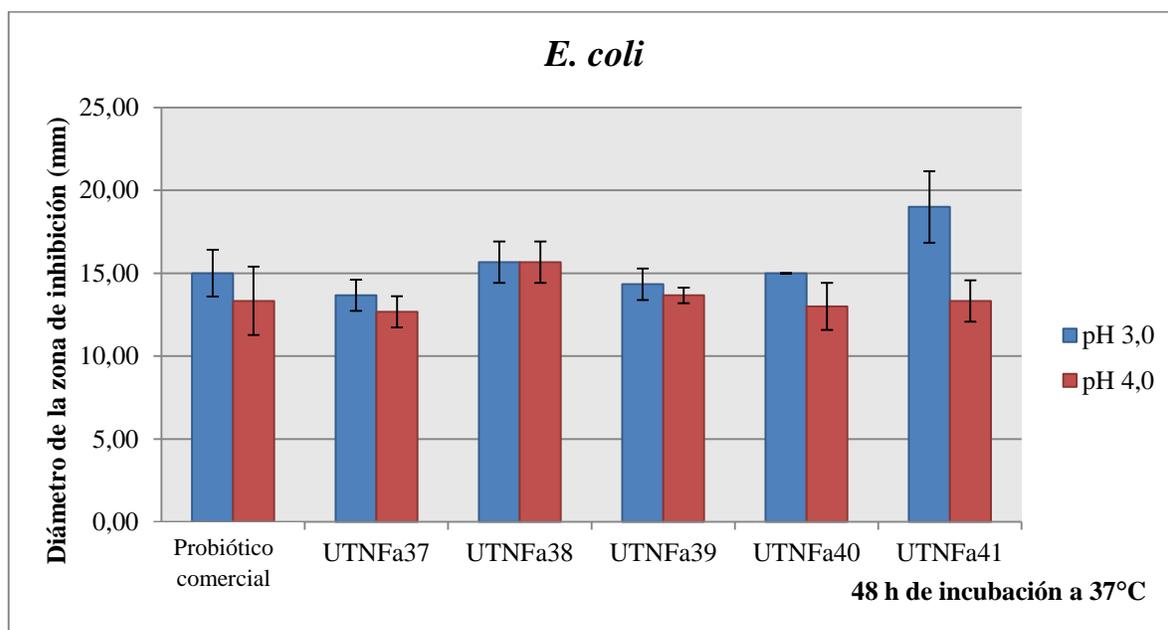
Tabla 13. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 3,0

48 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	13	16	16	15,00	1,41
UTNFa37	13	15	13	13,67	0,94
UTNFa38	14	17	16	15,67	1,25
UTNFa39	15	13	15	14,33	0,94
UTNFa40	15	15	15	15,00	0,00
UTNFa41	22	17	18	19,00	2,16

Tabla 14. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas; pH: 4,0

48 horas	<i>E. coli</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	16	11	13	13,33	2,05
UTNFa37	12	14	12	12,67	0,94
UTNFa38	16	17	14	15,67	1,25
UTNFa39	14	14	13	13,67	0,47
UTNFa40	11	14	14	13,00	1,41
UTNFa41	12	15	13	13,33	1,25

En la Tabla 13 y 14, se detallan los valores y promedios de los diámetros de inhibición con cada desviación estándar promedio, al finalizar el periodo de incubación de la actividad antagonista de las BAL en estudio frente al patógeno *E. coli* a una temperatura de 37°C, las cepas con códigos UTNFa 41 y UTNFa 38 mantuvieron los diámetros más altos de toda la medición, incluso fueron mayores al probiótico comercial. El control negativo (agua estéril) no presentó inhibición.

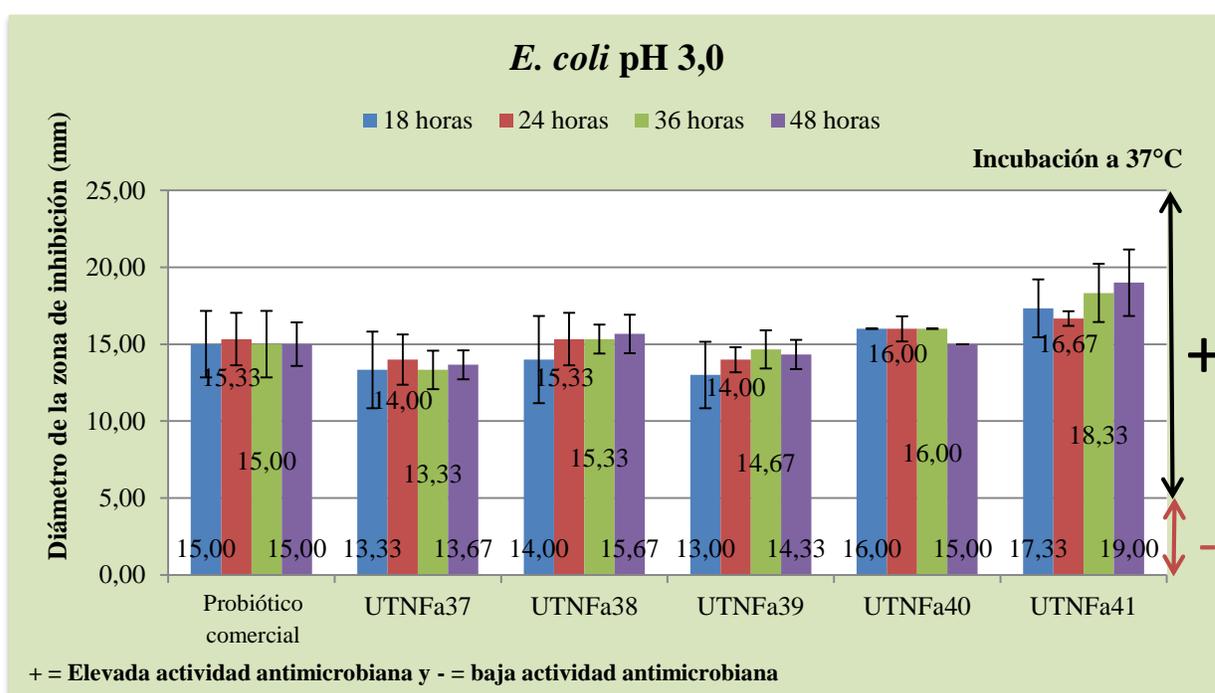


Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 4. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formadas por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *E. coli*, después de 48 h de incubación.

Una vez finalizado el periodo de incubación se puede apreciar que las zonas de inhibición en algunos casos suben o disminuyen en 1 mm, en los cuatros tiempos de incubación; sin afectar el resultado final ya que las cepas y el probiótico comercial mantienen su actividad antimicrobiana hasta finalizar la incubación.

De acuerdo con Vélez (2014), una de las características que poseen las bacterias probióticas es la competencia con bacterias patógenas, mediante la inhibición de su crecimiento y/o muerte por la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH ácido por debajo de 4,0 y según los resultados de esta investigación se llegó a comprobar que las cepas en interés cumplen con esta característica esencial que resaltan a las bacterias probióticas, se logró demostrar que cuando el sobrenadante de las cepas se encuentra a pH 3,0, los promedios de las zonas de inhibición son mayores que a pH 4,0.



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

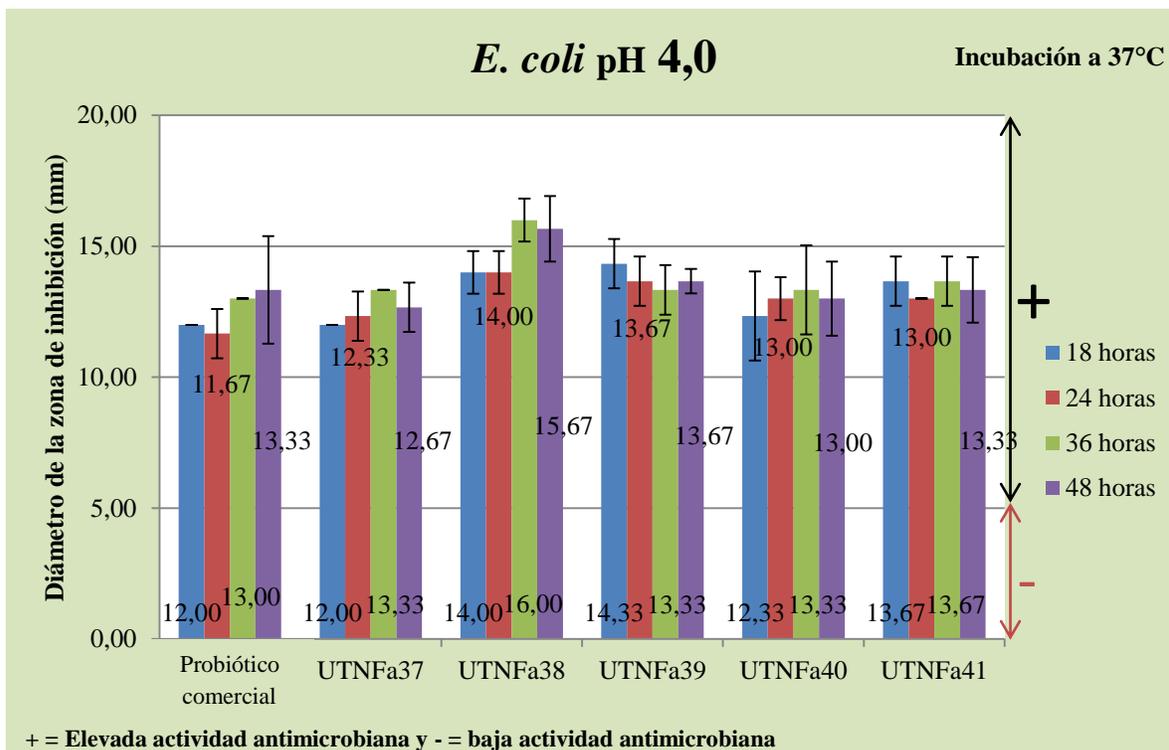
Figura 5. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 3,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *E. coli*

En la Figura 5, se presenta una comparación de todos promedios obtenidos después de cumplir los tiempos de incubación de las cepas de interés a un pH ácido de 3,0 frente al patógeno *E. coli*, el promedio total de las zonas de inhibición fue de 15,22 (\pm 1,37) mm en toda la medición.

Las zonas de inhibición fueron medidas a las 18, 24, 36 y 48 horas de incubación, utilizando el sobrenadante de las cepas probadas y del probiótico comercial; en la gráfica se puede observar que los valores de las zonas de inhibición se mantienen fluctuando entre (13,00 - 19,00) mm afirmando que tanto las cepas como el probiótico comercial poseen elevada actividad antimicrobiana frente a *E. coli*.

La cepa que alcanzó la mayor actividad antagonista fue BAL 5 (UTNFa 41) con 19 ($\pm 2,16$) mm de diámetro en la zona de inhibición, a las 48 horas de incubación, incluso esta cepa de interés generó un valor de inhibición más alto que el probiótico comercial (15,33 $\pm 1,70$ mm).

En la investigación de Vanegas *et al.* (2012), se evaluaron 49 cepas de *Lactobacillus sp.* aisladas de leche materna de las cuales 10 de ellas presentaron inhibición al patógeno *E. coli*, formando halos $\geq 0,5$ mm a las 48 horas de incubación, el autor mencionada que las cepas de *Lactobacillus sp.* estuvieron a pH ácidos, pero no señala ningún valor en especial. En el presente estudio, las cinco cepas seleccionadas presentan una actividad antimicrobiana elevada frente a *E. coli* a pH 3,0 (≥ 13 mm) y pH 4,0 (> 10 mm).



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

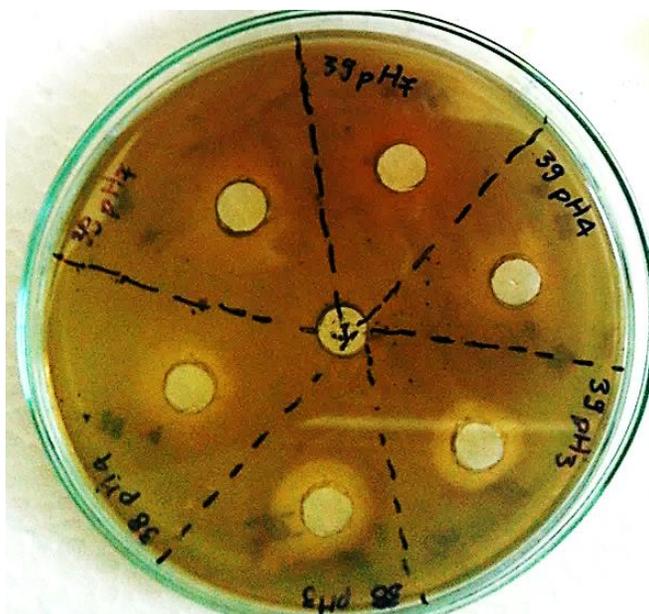
Figura 6. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 4,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *E. coli*

En la Figura 6, se observa que los valores de las zonas de inhibición son mayores a 10 mm, indicando que existió elevada actividad antimicrobiana de las cepas en estudio, frente al patógeno *E. coli*. El sobrenadante utilizado estuvo a un pH 4,0. En la figura 5 y 6 se observa que las cepas con posible potencial probiótico a pH 3,0 y pH 4,0 muestran elevada capacidad antagonista frente a este patógeno; en comparación a la Figura 5 los valores de las zonas de inhibición disminuyeron de 1 a 2 mm. A pH 3,0 los datos fueron mayores que a pH 4,0. Se obtuvo un promedio total de 13,35 ($\pm 0,92$) mm.

La bacteria ácido láctica con mayor zona de inhibición en este caso fue UTN Fa 38 con 16 ($\pm 1,41$) mm a un tiempo de incubación de 36 horas.

Según lo mencionado por (De Angelis y Gobbetti, 2011) citado en la investigación de Vélez (2014), donde describen que la actividad antimicrobiana de los probióticos frente a bacterias patógenas, se debe a la producción de ácidos orgánicos, la liberación de ácidos orgánicos se incrementan con el aumento de los probióticos y por la producción en algunos casos de bacteriocinas; que alteran la permeabilidad celular, el potencial de membrana así como el descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes, adicional a esto, el pH al descender inhibe eficazmente el crecimiento de los principales patógenos.

Rodríguez (2009), en su investigación experimental menciona que, entre los metabolitos o sustancias elaboradas por las BAL con capacidad antimicrobiana; se citan las siguientes: nicinas, bacteriocinas, acidofilinas, entre otras, demostrando la capacidad de determinadas cepas de *Lactobacillus* de inhibir el desarrollo de otros microorganismos, destacando su elevada actividad antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium sp.* y *Bifidobacterium sp.*



Fotografía 3. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTN Fa 38 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a *E. coli*.

En la Fotografía 3, se puede observar un ejemplo de los resultados obtenidos después de la incubación de la cepa de interés UTNFa 38 en la presencia del patógeno *E. coli*. Se han formado zonas transparentes que indican, que la cepa tiene actividad antimicrobiana en comparación con el control agua estéril en donde no se observa la formación del halo de inhibición.

4.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *Salmonella sp.*

Tabla 15. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 3,0

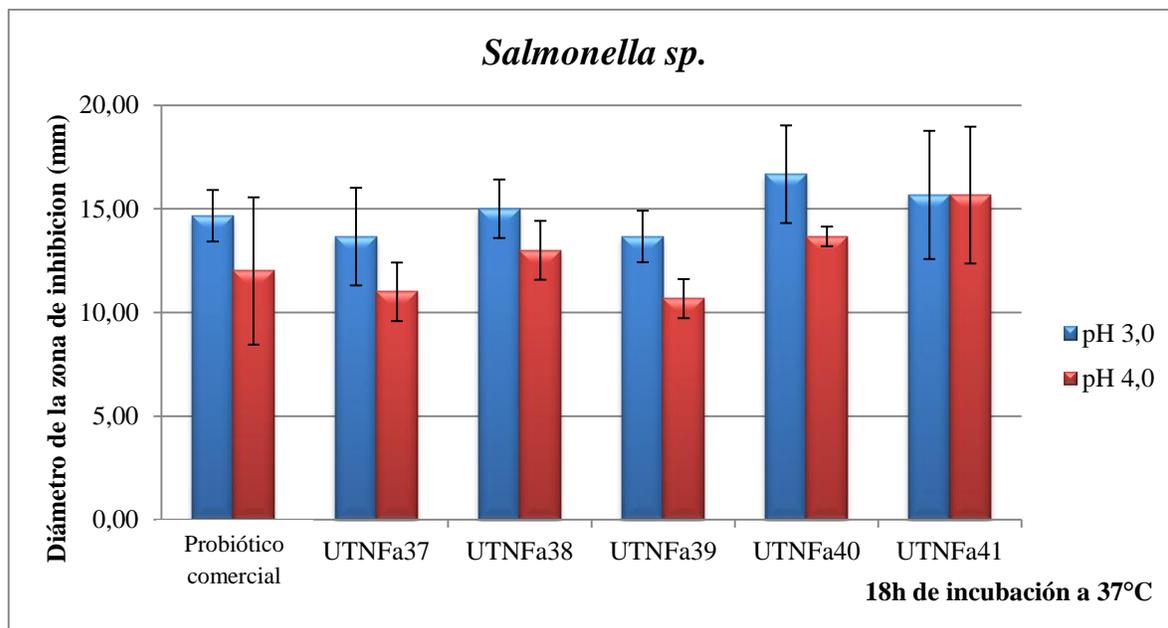
18 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	15	13	16	14,67	1,25
UTNFa37	12	12	17	13,67	2,36
UTNFa38	14	14	17	15,00	1,41
UTNFa39	12	14	15	13,67	1,25
UTNFa40	15	15	20	16,67	2,36
UTNFa41	13	14	20	15,67	3,09

En la tabla 15, se encuentra detallados los valores de las zonas de inhibición formadas por los sobrenadantes de las cepas de interés y del probiótico comercial a un pH 3,0; se realizó tres mediciones y se calculó el promedio con la desviación estándar en los distintos tiempos de incubación empezando a las 18 horas como se observa en la tabla, la cepa UTNFa 40 obtuvo la mayor zona de inhibición frente al patógeno *Salmonella sp.*, con promedio de 16,67 (\pm 2,36) mm, incluso el promedio de la actividad antimicrobiana fue mejor que la del control comercial 14,67 (\pm 1,25) mm.

Tabla 16. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 18 horas; pH: 4,0

18 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	15	7	14	12,00	3,56
UTNFa37	10	10	13	11,00	1,41
UTNFa38	12	12	15	13,00	1,41
UTNFa39	10	10	12	10,67	0,94
UTNFa40	14	13	14	13,67	0,47
UTNFa41	15	12	20	15,67	3,30

A las 18 horas de incubación se realizó el mismo proceso para probar la actividad antimicrobiana de las BAL en estudio frente a *Salmonella sp.*, pero esta vez se utilizó el sobrenadante a pH 4,0; los valores y promedios de los halos de inhibición se puede observar en la Tabla 16; la BAL UTNFa 41 con diámetro de 15,67 (\pm 3,30) mm obtuvo un promedio mayor de la zona de inhibición en comparación a demás cepas en estudio y al probiótico comercial.



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 7. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *Salmonella sp.*, después de 18 h de incubación.

Al concluir el primer período de incubación de las cepas de interés y el testigo comercial con sobrenadantes a pH 3,0 y pH 4,0 frente a *Salmonella sp.* se puede observar en la Figura 7 la comparación entre los promedios de las zonas de inhibición que fueron mayores a 10 mm, indicando con esto que, todas las BAL en estudio y el probiótico comercial presentan elevada actividad antimicrobiana. En esta evaluación también se utilizó el agua destilada estéril como control negativo, el mismo que no formó ninguna zona de inhibición. Las cepas con códigos UTN Fa 38, UTN Fa 40 y UTN Fa 41 presentaron promedios de las zonas de inhibición más altos que el probiótico comercial, es decir muestran mejor actividad antagonista frente a la *Salmonella sp.*

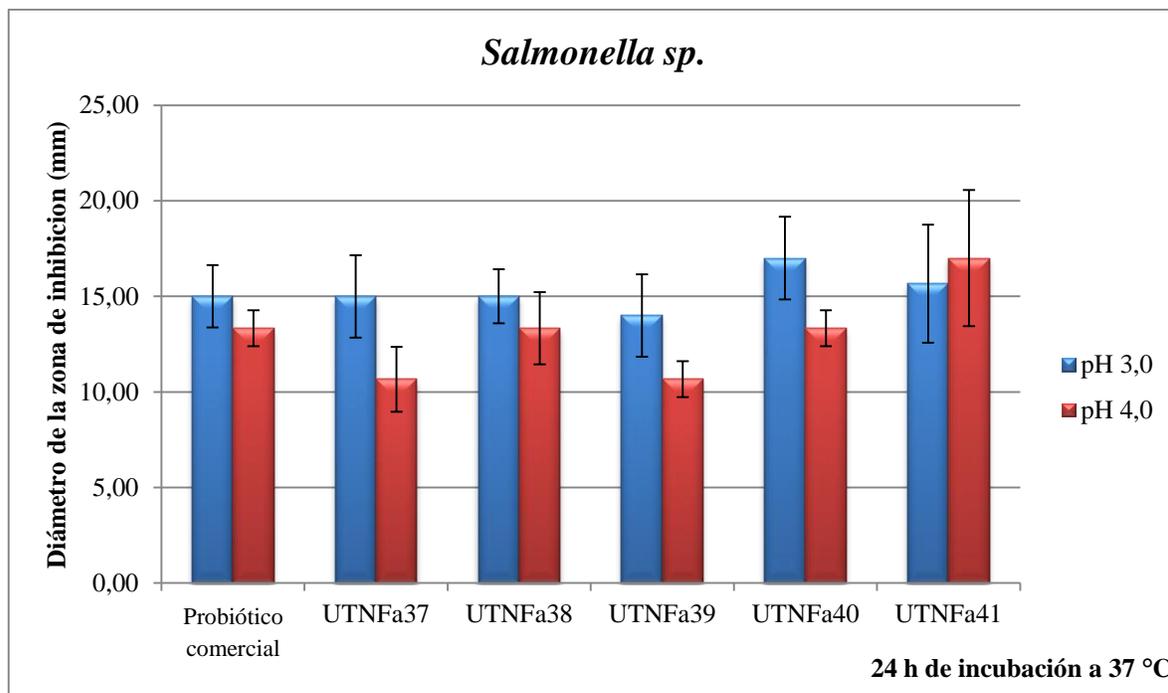
Tabla 17. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas;
pH: 3,0

24 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	15	13	17	15,00	1,63
UTNFa37	14	13	18	15,00	2,16
UTNFa38	14	14	17	15,00	1,41
UTNFa39	11	15	16	14,00	2,16
UTNFa40	16	15	20	17,00	2,16
UTNFa41	13	14	20	15,67	3,09

Tabla 18. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 24 horas;
pH: 4,0

24 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	14	12	14	13,33	0,94
UTNFa37	9	10	13	10,67	1,70
UTNFa38	12	12	16	13,33	1,89
UTNFa39	10	10	12	10,67	0,94
UTNFa40	14	12	14	13,33	0,94
UTNFa41	15	14	22	17,00	3,56

En las Tablas 17 y 18, se muestran las medidas de las zonas de inhibición de las cepas de interés incluido el probiótico comercial a las 24 horas de incubación, en comparación a las medias que se obtuvieron a las 18 horas de incubación, los promedios de los halos aumentaron 1 a 2 mm en la mayoría de cepas, mientras que otras disminuyeron en 1 mm, sin afectar al resultado final ya que siguen manteniendo la actividad antimicrobiana frente a *Salmonella sp.*



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 8. Promedio del diámetro de la zona de inhibición forma por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *Salmonella sp.*, después de 24 h de incubación.

En Figura 8, se representan los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición de las BAL en estudio y del probiótico comercial frente al patógeno *Salmonella sp.* Al finalizar el segundo tiempo de incubación a pH 3,0 la cepa UTNFa 40 se mantiene con el mayor promedio de diámetro de inhibición ($17,00 \pm 2,16$ mm) y con pH 4,0 la cepa UTNFa 41 continúa presentando el promedio de inhibición más alto, además aumentó alrededor de 2 mm en el promedio de su diámetro ($17,00 \pm 3,56$ mm) en este periodo de incubación.

Tabla 19. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas;
pH: 3,0

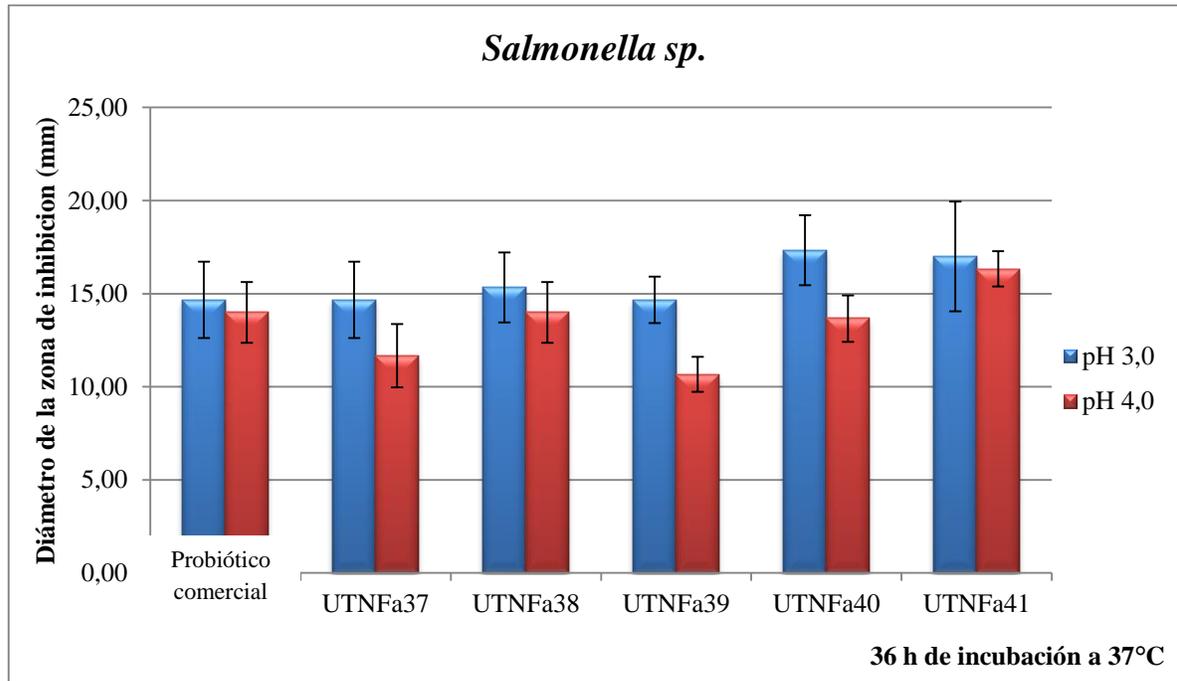
36 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	15	12	17	14,67	2,05
UTNFa37	15	12	17	14,67	2,05
UTNFa38	14	14	18	15,33	1,89
UTNFa39	13	15	16	14,67	1,25
UTNFa40	16	16	20	17,33	1,89
UTNFa41	14	16	21	17,00	2,94

Tabla 20. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 36 horas;
pH: 4,0

36 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial	14	12	16	14,00	1,63
UTNFa37	11	10	14	11,67	1,70
UTNFa38	14	12	16	14,00	1,63
UTNFa39	10	10	12	10,67	0,94
UTNFa40	15	12	14	13,67	1,25
UTNFa41	15	17	17	16,33	0,94

Todas las cepas de interés continúan presentando los promedios de inhibición mayores a 10 mm, mostrando elevada actividad antagónica frente a la bacteria *Salmonella sp.*, a las 36 horas de la incubación, cuando el sobrenadante fue de 4,0 (Tabla 20), la cepa con menor promedio de diámetro de inhibición fue la cepa UTNFa 39 (10,67 ± 0,94 mm); el probiótico comercial presentó mayor promedio de la zona de inhibición de 14,00 (± 1,63) mm; pero fue menor que

el promedio del diámetro de la zona de inhibición de la cepa UTNFa 41, que mantiene un valor superior.



Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 9. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formada por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *Salmonella sp.*, después de 36 h de incubación.

En la Figura 9, se puede observar las comparaciones entre los promedios de los diámetros de la zona de inhibición que formaron las bacterias de este estudio y el control comercial, después de las 36 horas de incubación, cuando el sobrenadante de las cepas en estudio estuvo a pH 3,0 los valores de las zonas de inhibición fueron más elevados que a pH 4,0.

Tabla 21. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas;
pH: 3,0

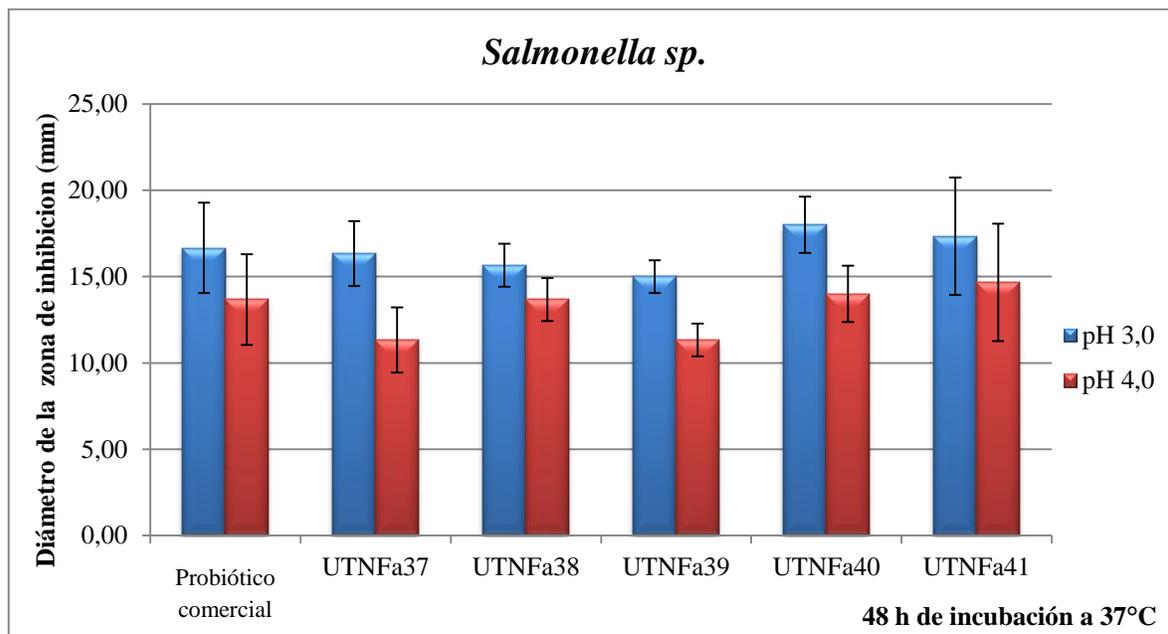
48 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 3,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	16	17	17	16,67	0,47
UTNFa37	15	16	18	16,33	1,25
UTNFa38	15	14	18	15,67	1,70
UTNFa39	13	15	17	15,00	1,63
UTNFa40	16	17	21	18,00	2,16
UTNFa41	15	16	21	17,33	2,62

Tabla 22. Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm) con tiempo de incubación: 48 horas;
pH: 4,0

48 horas	<i>Salmonella sp.</i>				
	pH 4,0				
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	15	10	16	13,67	2,62
UTNFa37	10	10	14	11,33	1,89
UTNFa38	14	12	15	13,67	1,25
UTNFa39	12	10	12	11,33	0,94
UTNFa40	16	12	14	14,00	1,63
UTNFa41	16	10	18	14,67	3,40

En la Tabla 21 y 22, se puede observar a este periodo de incubación (48 horas) los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición presentaron los valores más elevados, la cepa UTNFa 40 con sobrenadante a pH 3,0 presentó el mayor diámetro de la zona de inhibición que fue de 18,00 ($\pm 1,63$) mm y en el caso de la cepa con código UTNFa 41 con sobrenadante a pH 4,0 presentó un diámetro de 14,67 ($\pm 3,40$) mm, siendo el mayor valor promedio de los diámetros

de las zonas de inhibición a este pH; incluso estas cepas presentaron mayor actividad antagonista que el probiótico comercial.

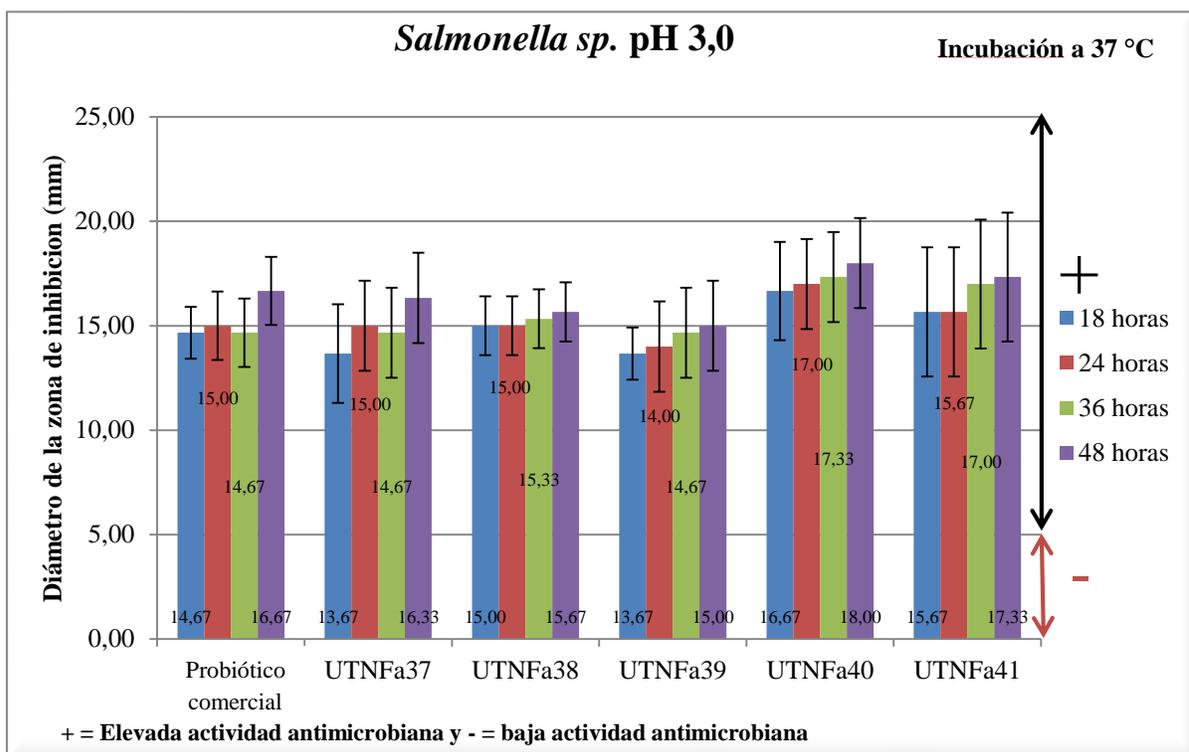


Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 10. Promedio del diámetro de la zona de inhibición formadas por los sobrenadantes (pH 3,0 y 4,0) de las cepas de interés y el control comercial frente a *Salmonella sp.*, después de 48 h de incubación.

En el caso del patógeno *Salmonella sp.*, se observó que todas las cepas en estudio (pH 3,0 y 4,0) tuvieron actividad antimicrobiana, ya que después de 48 horas de incubación las BAL y el probiótico comercial formaron zonas de inhibición mayores a 10 mm. Al finalizar todos los periodos de incubación los promedios de los diámetros de inhibición no presentaron cambios significativos, en algunos casos aumentaron en 1 a 2 mm y en otros casos disminuyeron en la misma cantidad, al igual que en el análisis experimental con *E. coli*; sin embargo, se puede observar que cuando el sobrenadante de las cepas de interés y del control comercial estaba a pH

3,0 el tiempo actuó como factor favorable, ya que todos los promedios en cada periodo fueron aumentando.

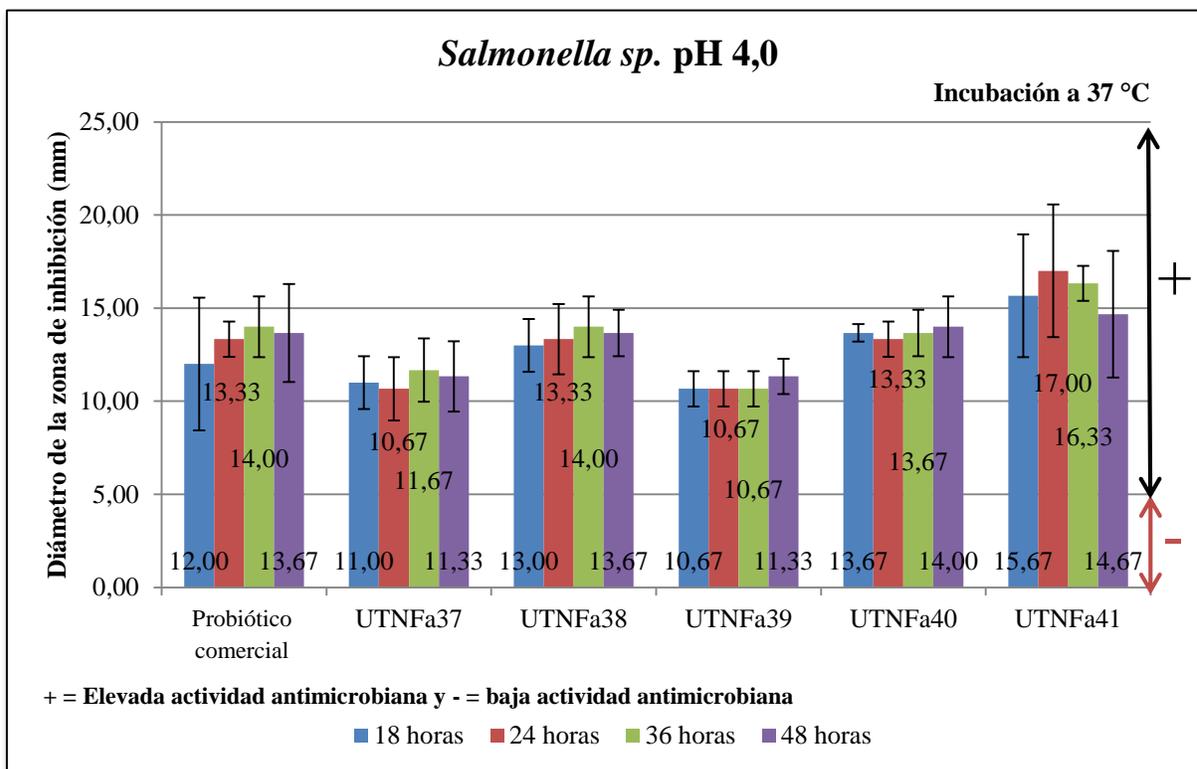


Probiótico comercial = *Lactobacillus LB**

Figura 11. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 3,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella sp.*

En la Figura 11, se puede observar que los sobrenadantes de las cepas UTN Fa 37 y UTN Fa 39 que se estuvieron a un pH ácido de 3,0 presentaron menores medidas en las zonas de inhibición. Las cepas mencionadas, a las 18 horas de incubación formaron una zona de inhibición de 13,67 ($\pm 2,36$) mm y 13,67 ($\pm 1,25$) mm respectivamente. La cepa con mayor actividad antagonista incluso superior al probiótico comercial fue UTN Fa 40 (BAL 4) el valor de la zona de inhibición que formó frente a la *Salmonella sp.* midió 18 ($\pm 2,16$) mm a las 48 horas de incubación. En la investigación de Vélez (2015), se menciona que cuatro bacterias ácido lácticas a pH 3,0 que

fueron aisladas de calostro de cerdas, al determinar la actividad bactericida contra *Salmonella* Tiphymurium sólo los extractos de dos de ellas formaron halos de inhibición entre 18 mm y 6 mm sobre este patógeno; mientras que en el presente estudio investigativo las cinco cepas de BAL presentan actividad antagonista frente a *Salmonella* sp. formando zonas de inhibición mayores a 10 mm. El promedio total de la medición fue de 15,57 (\pm 1,82) mm



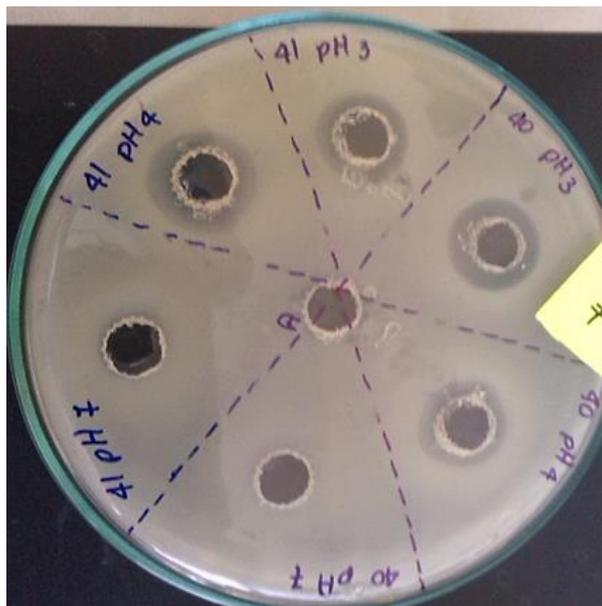
Probiótico comercial = *Lactobacillus* LB*

Figura 12. Actividad antimicrobiana de BAL a pH 4,0 y el probiótico comercial, a diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella* sp.

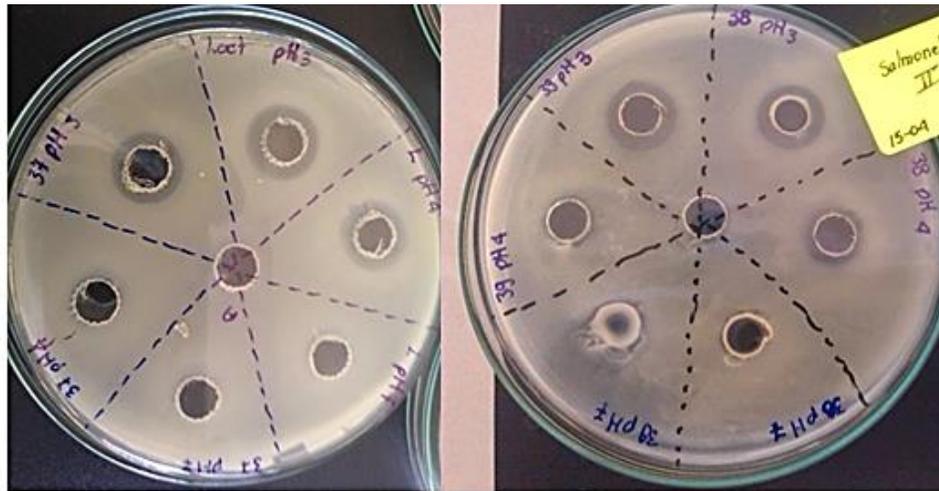
Como se puede observar, los promedios de las zonas de inhibición de la Figura 12 en comparación con la Figura 11 son menores, pero las cepas de interés presentan capacidad antimicrobiana; los sobrenadantes de las bacterias de interés y del probiótico comercial se fijaron a un pH 4,0. La bacteria ácido láctica 5 (UTNFa 41) mantuvo su promedio de la zona de

inhibición $17 (\pm 3,56)$ mm, el tiempo óptimo de incubación fue de 24 horas; a las 36 y 48 horas la zona de inhibición bajó a $16,33 (\pm 0,94)$ mm y $14,67 (\pm 0,94)$ mm respectivamente. Las cepas en estudio con menor valor de inhibición durante todo el experimento fueron BAL 1 (UTNFa 37) y BAL 3 (UTNFa 39). El promedio total de las medias de las zonas de inhibición en los cuatro tiempos fue de $13,08 (\pm 1,62)$ mm.

En el año 2012, Vanegas *et al.* describen que de 49 cepas de *Lactobacillus sp.* aisladas de leche materna, 5 de ellas presentaron inhibición a un periodo óptimo de 48 horas frente al patógeno *Salmonella Enteritides* formando halos de inhibición $\geq 0,5$ mm, el autor no menciona un valor de pH específico, pero señala que las cepas de *Lactobacillus sp.* estuvieron a pH ácidos. Mientras que en la presente investigación todas las cepas de BAL presentan actividad antimicrobiana frente a *Salmonella sp.* presentando zonas de inhibición mayores a 10 mm a pH 3,0 y pH 4,0.



Fotografía 4. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTNFa 41 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a *Salmonella sp.*



Fotografía 5. Vista de la zona de inhibición que formaron las cepas UTNFa 37 y UTNFa 39 frente a *Salmonella sp.*

Las Fotografías 4 y 5, se presenta un ejemplo de visualización fenotípica de la actividad antagonista, frente al patógeno *Salmonella sp.* con la formación del halo transparente de varias cepas de este estudio.

De acuerdo con la investigación de Amorocho (2011), indica que en su investigación 28 de las 131 BAL aisladas de leche de oveja Guirra inhiben alguna cepa de *Salmonella sp.* a las 24 horas de incubación, 12 de los 131 sobrenadantes de las BAL mostraron actividad antagonista frente a las cepas de *Salmonella sp.* a pH 4,5. Sin embargo, tal actividad desaparece cuando el pH de los sobrenadantes se ajustó a pH 7,0; comprobando lo dicho por el autor se puede observar que en las fotografías anteriormente presentadas los sobrenadantes de las cepas en estudio con pH 7,0 no forman zonas de inhibición.

La investigación de Olivares *et al.*, (2006) citada en Amorocho (2011); mostró que los sobrenadantes de varias cepas de *Lactobacillus* inhibieron a pH ácidos entre 3,86 y 4,4 y perdieron dicha capacidad a pH 7,0; al enfrentarse a *S. choleraesuis*, *E. coli*, *S. aureus*, entre

otros patógenos, coincidiendo con la presente investigación, que a pH 3,0 y pH 4,0 las cepas en estudio se han mantenido con capacidad antagónica frente a *E. coli* y *Salmonella sp.* durante los cuatro periodos de incubación (18 h, 24 h, 36 h y 48 h). Aunque en el presente estudio investigativo no se registraron valores de las zonas de inhibición a pH 7,0 en las Fotografía 4 y 5 se puede observar que a este pH las cepas en estudio no presentan formación de halos de inhibición, es decir perdieron la capacidad antimicrobiana frente a los dos patógenos anteriormente mencionados.

El hecho de que las cepas sean productoras de sustancias antimicrobianas determina un efecto positivo frente a enfermedades transmitidas por alimentos producidas por patógenos (*Salmonella Enterica* e intoxicaciones alimentarias bacterianas producidas por *E. coli*), que según lo establece el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2013), son las enfermedades más comunes en el Ecuador; estas cepas benéficas pueden directa o indirectamente contribuir a la reducción de dichas enfermedades de forma notable.

Tabla 23. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos *E. coli* y *Salmonella sp.* a las 18 horas de incubación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σt
	I	II	III	
T 1	10	16	14	40
T 2	12	12	17	41
T 3	12	12	12	36
T 4	10	10	13	33
T 5	10	16	16	42
T 6	14	14	17	45
T 7	14	13	15	42
T 8	12	12	15	39
T 9	10	14	15	39
T 10	12	14	15	41
T 11	15	15	13	43
T 12	10	10	12	32
T 13	16	16	16	48
T 14	15	15	20	50
T 15	10	13	14	37
T 16	14	13	14	41
T 17	20	16	16	52
T 18	13	14	20	47
T 19	15	13	13	41
T 20	15	12	20	47
T 21	12	17	16	45
T 22	15	13	16	44
T 23	12	12	12	36
T 24	15	7	14	36
Σr	313	319	365	997

Tabla 24. Análisis de Varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Total	71	463,32	6,53	0		
Tratamientos	23	202,65	8,81	NS	1,75	2,2
Factor A	5	78,9	15,78	*	2,41	3,43
Factor B	1	70,01	70,01	**	4,04	7,19
Factor C	1	0,35	0,35	NS	4,04	7,19
A x B	5	14,58	2,92	NS	2,41	3,43
A x C	5	9,9	1,98	NS	2,41	3,43
B x C	1	1,13	1,13	NS	4,04	7,19
A x B x C	5	27,68	5,54	NS	2,41	3,43
Error Experimental	48	260,67	5,43			

CV= 16,83%

** : Altamente significativo

* : Significativo

NS: No significativo

Realizado el análisis de varianza (Tabla 24), se detectó que no se presenta diferencia significativa para tratamientos, en cuanto para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial) existe significación; el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial) presenta alta significación. Y para las interacciones no existe significación. El valor del C.V. es de 16,83% valor aceptable para una investigación realizada en laboratorio.

Al no presentarse significación en los tratamientos, se puede señalar que todos se comportan de la misma manera; es decir las cinco BAL en estudio y del probiótico comercial, presentan actividad antimicrobiana frente a los patógenos *E. coli* y *Salmonella sp.* en rangos de medida parecidos.

Al existir diferencia significativa para los factores se procedió a realizar las pruebas de DMS.

Tabla 25. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial)

Factores A	Rangos
a5	a
a4	a
a2	a
a6	a
a3	a
a1	a

Como se puede observar en la Tabla 25, todos los niveles del factor A, se presentan dentro del rango “a”; es decir todos son esenciales para realizar la evaluación de la actividad antagonista.

Tabla 26. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)

Factor B	Rangos
b1	a
b2	a

Las pruebas de DMS para los niveles del factor B, se hallan dentro del rango “a”; lo que demuestra que los sobrenadantes de las cepas de interés y del probiótico comercial a pH ácidos 3,0 y 4,0 son adecuados para que las cepas en estudio presenten defensa frente a las bacterias patógenas (indicador).

Tabla 27. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos *E. coli* y *Salmonella sp.* a las 24 horas de incubación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σt
	I	II	III	
T 1	12	16	14	42
T 2	14	13	18	45
T 3	11	13	13	37
T 4	9	9	13	31
T 5	13	16	17	46
T 6	14	14	17	45
T 7	13	14	15	42
T 8	12	12	16	40
T 9	13	14	15	42
T 10	11	15	16	42
T 11	13	15	13	41
T 12	10	10	12	32
T 13	16	15	17	48
T 14	16	15	20	51
T 15	12	14	13	39
T 16	14	12	14	40
T 17	16	17	17	50
T 18	13	14	20	47
T 19	13	13	13	39
T 20	15	14	22	51
T 21	13	17	16	46
T 22	15	13	17	45
T 23	11	11	13	35
T 24	14	12	14	40
Σr	313	328	375	1016

Tabla 28. Análisis de Varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Total	71	417,11	5,87	0		
Tratamientos	23	223,11	9,70	**	1,75	2,2
Factor A	5	77,24	15,45	**	2,41	3,43
Factor B	1	115,02	115,02	**	4,04	7,19
Factor C	1	0,68	0,68	NS	4,04	7,19
A x B	5	15,56	3,11	NS	2,41	3,43
A x C	5	21,57	4,31	NS	2,41	3,43
B x C	1	1,12	1,12	NS	4,04	7,19
A x B x C	5	38,46	7,69	NS	2,41	3,43
Error Experimental	48	194	4,04			

CV= 14,25%

** : Altamente significativo

NS: No significativo

Una vez realizado el ADEVA, se detectó diferencia altamente significativa para los tratamientos y para los factores A (cepas de bacterias ácido lácticas y probiótico comercial) y B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial). Las interacciones no presentan significación. El coeficiente de variación es de 14,25% encontrándose dentro del valor aceptable para análisis en el laboratorio.

Se efectuó las pruebas de significación, Tukey al 5% para tratamientos y DMS para el factor A y B.

Tabla 29. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zona de inhibición a las 24 horas

Tratamientos	Media	Rangos
T 14	17,00	a
T 20	17,00	a
T 17	16,67	a
T 13	16,00	a
T 18	15,67	a
T 5	15,33	a
T 21	15,33	a
T 2	15,00	a
T 6	15,00	a
T 22	15,00	a
T 1	14,00	a
T 7	14,00	a
T 9	14,00	a
T 10	14,00	a
T 11	13,67	a
T 8	13,33	a
T 16	13,33	a
T 15	13,33	a
T 19	13,00	a
T 3	13,00	a
T 23	12,33	a
T 24	11,67	a
T 4	10,67	b
T 12	10,67	b

Al analizar la Tabla 29, se establece que los tratamientos que se encuentra dentro del rango “a” tienen diámetros de la zonas de inhibición mayores a 11 mm, siendo la mayoría de cepas de interés conjuntamente con el probiótico comercial que presentan alta actividad antimicrobiana

frente a las bacterias indicadoras; mientras que el T4 (BAL 1: UTNFa 37 + pH 4.0 + *Salmonella sp.*) y T12 (BAL 3: UTNFa 39 + pH 4.0 + *Salmonella sp.*) formaron las zonas de inhibición más pequeñas de toda la medición a las 24 horas de incubación frente al patógeno *Salmonella sp.*, los diámetros disminuyen en 1 mm en comparación a los de las demás cepas, pero las BAL 1 y 2 presentan también actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *Salmonella sp.* Estos resultados se pueden distinguir en la Figura (13).

Tabla 30. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial)

Factor A	Media	Rangos
a5	15,58	a
a4	14,83	a
a2	14,42	a
a6	13,83	a
a3	13,08	a
a1	12,92	a

En la prueba de significación DMS se puede observar que todos los niveles del factor A, se presentan dentro del rango “a”; es decir las cinco cepas con posible potencial probiótico incluido el control probiótico actúan de manera competitiva frente a las dos bacterias patógenas de origen alimenticio.

Tabla 31. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)

Factor B	Media	Rangos
b1	15,25	a
b2	12,72	a

Al efectuar la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) para el factor B (diferentes pHs del sobrenadante) se observa que los niveles b1 y b2 se encuentran en el rango “a” indicando que el sobrenadante de las cepas de interés a pH ácidos (pH 3,0 y 4,0) permanecieron activos y presentaron capacidad antimicrobiana.

Tabla 32. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y de las cepas en estudio, frente a los patógenos *E. coli* y *Salmonella sp.* a las 36 horas de incubación.

SIMBOLOGÍA DE LOS TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ t
	I	II	III	
T 1	12	15	13	40
T 2	15	12	17	44
T 3	13	14	13	40
T 4	11	10	14	35
T 5	14	16	16	46
T 6	14	14	18	46
T 7	17	17	14	48
T 8	14	12	16	42
T 9	16	13	15	44
T 10	13	15	16	44
T 11	13	14	13	40
T 12	10	10	12	32
T 13	16	16	16	48
T 14	16	16	20	52
T 15	12	14	14	40
T 16	15	12	14	41
T 17	21	17	17	55
T 18	14	16	21	51
T 19	14	14	13	41
T 20	15	17	17	49
T 21	12	17	16	45
T 22	15	12	17	44
T 23	16	11	12	39
T 24	14	12	16	42
Σr	342	336	370	1048

Tabla 33. Análisis de Varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Total	71	385,78	8,75	0		
Tratamientos	23	212,44	9,24	**	1,75	2,2
Factor A	5	85,95	17,19	**	2,41	3,43
Factor B	1	68,06	68,06	**	4,04	7,19
Factor C	1	0,224	0,22	NS	4,04	7,19
A x B	5	17,10	3,42	NS	2,41	3,43
A x C	5	11,94	2,39	NS	2,41	3,43
B x C	1	1,36	1,36	NS	4,04	7,19
A x B x C	5	27,81	5,56	NS	2,41	3,43
Error Experimental	48	173,33	3,61			

CV= 13,06%

** : Altamente significativo

NS: No significativo

El análisis de varianza indica que a las 36 horas de incubación existe alta significación estadística, tanto para tratamientos como para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial) y factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial); mientras que en las interacciones no existe significación.

El valor de C.V es de 13,06% indicando que es una precisión aceptable para una investigación realizada en el laboratorio.

Al existir diferencia significativa se procedió a realizar Tukey para tratamientos y DMS para factores.

Tabla 34. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zonas de inhibición a las 36 horas

Tratamientos	Media	Rangos
T 17	18,33	a
T 14	17,33	a
T 18	17,00	a
T 20	16,33	a
T 7	16,00	a
T 13	16,00	a
T 5	15,33	a
T6	15,33	a
T 21	15,00	a
T 9	14,67	a
T 10	14,67	a
T 2	14,67	a
T 22	14,67	a
T 8	14,00	a
T 24	14,00	a
T 16	13,67	a
T 19	13,67	a
T 1	13,33	a
T 3	13,33	a
T 11	13,33	a
T 15	13,33	a
T 23	13,00	a
T 4	11,67	b
T 12	10,67	c

De acuerdo a Tukey al 5% para tratamientos, se observa que existen tres rangos, en donde se considera que los tratamientos que se encuentran dentro del rango “a” tiene los más altos promedios; es decir todas las cepas de este estudio presentan una alta capacidad antimicrobiana

frente a las bacterias indicadoras y con menores valores en las zonas de inhibición los tratamientos T4 y T12 siendo:

- T4; BAL 1, sobrenadante a pH 4.0 frente a *Salmonella sp.*
- T12; BAL 3, sobrenadante a pH 4.0 frente a *Salmonella sp.*

Se debe aclarar que estos dos tratamientos al presentar una medida menor en las zonas de inhibición en comparación a los demás tratamientos, no dejan de poseer capacidad antimicrobiana frente a las dos bacterias patógenas.

Con la finalidad de visualizar de una mejor manera el comportamiento de las cepas de interés observar la Figura 11.

Tabla 35. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial)

Factor A	Media	Rangos
a5	16,33	a
a2	15,17	a
a4	15,08	a
a6	13,33	a
a1	13,33	a
a3	13,25	a

Al efectuar la prueba (DMS) a las 36 horas del experimento, para el factor A (cepas BAL y probiótico comercial), se observa que todos los niveles se encuentran dentro del rango “a”, al igual que en las anteriores Tablas (25 y 30); las bacterias ácido lácticas y el probiótico comercial se han mantenido con capacidad antagonista durante todo el experimento.

Estando la presente investigación cumpliendo con lo que menciona Andrade (2013), “para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir con una serie de requisitos

entre ellos la competición con microorganismos patógenos y actividad bactericida ante los mismo”.

Tabla 36. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)

Factor B	Media	Rangos
b1	15,53	a
b2	13,86	a

Al realizar la prueba de DMS, para el factor B (pH de los sobrenadantes), se identificó que al igual que en las anteriores pruebas DMS para este factor, tanto con pH 3,0 y 4,0 las cepas de interés presentan un comportamiento similar, es decir a los dos pH inhiben a los microorganismos patógenos.

Tabla 37. Valores de la zona de inhibición en milímetros del probiótico comercial y las cepas en estudio, frente a los patógenos *E. coli* y *Salmonella sp.* a las 48 horas de incubación

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σt
	I	II	III	
T 1	13	15	13	41
T 2	15	16	18	49
T 3	12	14	12	38
T 4	10	10	14	34
T 5	14	17	16	47
T 6	15	14	18	47
T 7	16	17	14	47
T 8	14	12	15	41
T 9	15	13	15	43
T 10	13	15	17	45
T 11	14	14	13	41
T 12	12	10	12	34
T 13	15	15	15	45
T 14	16	17	21	54
T 15	11	14	14	39
T 16	16	12	14	42
T 17	22	17	18	57
T 18	15	16	21	52
T 19	12	15	13	40
T 20	16	10	18	44
T 21	13	16	16	45
T 22	16	17	17	50
T 23	16	11	13	40
T 24	15	10	16	41
Σr	346	337	373	1056

Después de las 48 horas de incubación se puede observar que existió mínima variación en los valores de las zonas de inhibición en los cuatro tiempos de incubación (18, 24, 36 y 48 horas).

Tabla 38. Análisis de Varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Total	71	452,00	6,37	0		
Tratamientos	23	252,67	10,99	**	1,75	2,2
Factor A	5	58,83	11,77	*	2,41	3,43
Factor B	1	122,72	122,72	**	4,04	7,19
Factor C	1	16,78	16,78	NS	4,04	7,19
A x B	5	1,39	0,28	NS	2,41	3,43
A x C	5	20,11	4,02	NS	2,41	3,43
B x C	1	10,89	10,89	NS	4,04	7,19
A x B x C	5	21,95	4,39	NS	2,41	3,43
Error Experimental	48	199,33	4,15			

CV= 13,89%

** : Altamente significativo

* : Significativo

NS: No significativo

El análisis de varianza indica alta significación estadística para tratamientos y para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas de interés y del probiótico comercial), mientras que el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial) presenta significación, el factor C (*E. coli*, *Salmonella sp.*) y las interacciones respectivas tanto en el actual análisis de varianza como en los anteriores no presentan significación.

Al existir diferencia significativa se procedió a realizar Tukey para tratamientos y DMS para factores.

Tabla 39. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos. Zona de inhibición a las 48 horas de incubación

Tratamientos	Media	Rangos
T17	19,00	a
T14	18,00	a
T18	17,33	a
T22	16,67	a
T2	16,33	a
T5	15,67	a
T6	15,67	a
T7	15,67	a
T 21	15,00	a
T10	15,00	a
T13	15,00	a
T20	14,67	a
T9	14,33	a
T16	14,00	a
T8	13,67	a
T11	13,67	a
T1	13,67	a
T24	13,67	a
T23	13,33	a
T19	13,33	a
T15	13,00	a
T3	12,67	a
T4	11,33	b
T 12	11,33	b

En la Tabla 39, los tratamientos se encuentran dentro de los rangos “a” y “b”. Al igual que en las anteriores pruebas de Tukey la mayoría de bacterias ácido lácticas en estudio incluyendo el control probiótico con sobrenadantes a pH 3,0 y 4,0 frente a *E. coli* y *Salmonella sp.*, se encuentran dentro del rango “a”; siendo considerados como los mejores tratamientos por presentar medias altas y el T4 (BAL 1 + pH 4.0 + *Salmonella sp.*) y T12 (BAL 3 + pH 4.0 + *Salmonella sp.*) con promedios de 11,33 mm, mostrando ser los resultados con menores zonas de inhibición a largo del experimento.

Tabla 40. Pruebas de significación DMS para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial)

Factor A	Media	Rangos
a5	16,08	a
a2	15,17	a
a4	15,00	a
a6	14,67	a
a3	13,58	a
a1	13,50	a

Al efectuar la prueba DMS, al final del experimento para el factor A (cepas de bacterias ácido lácticas y un probiótico comercial), todos los niveles se encuentran dentro del rango “a” siendo a5 (BAL 5) la que tiene mayor media; desde el inicio del experimento los niveles del factor A se han mantenido en este rango indicando con ello que las cepas de interés y el probiótico comercial son aceptables para este estudio.

Tabla 41. Pruebas de significación DMS para el factor B (diferentes pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial)

Factor B	Media	Rangos
b1	15,97	a
b2	13,36	a

Al igual que al iniciar el experimento de DMS, el factor B (pH del sobrenadante de las cepas en estudio y del probiótico comercial) se han mantenido en el rango “a”; indicando que a estos pHs tanto las cepas de interés como el probiótico comercial han presentado defensas frente a los dos patógenos de origen alimenticio.

4.2. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO A DOS ANTIBIÓTICOS: AMPICILINA Y GENTAMICINA.

La evaluación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de BAL con posible potencial probiótico, se realizó para las cinco cepas de interés seleccionadas, en comparación con el probiótico comercial, a distintas concentraciones del inóculo (10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml) y dos antibióticos: ampicilina (10 μ g) y gentamicina (10 μ g), en cuatro tiempos distintos de incubación (12, 24, 36 y 48 horas). Los resultados de los promedios de los halos de inhibición para cada cepa de interés, fueron comparados con los valores que rigen las Normas EFSA (European Food Safety Authority), *in vitro*.

Las cepas en estudio fueron asignadas:

BAL 1: UTNFa 37

BAL 2: UTNFa 38

BAL 3: UTNFa 39

BAL 4: UTNFa 40

BAL 5: UTNFa 41

Probiótico comercial: *Lactobacillus LB** = *Lac 1*

Antibióticos: Ampicilina 10 μ g y Gentamicina 10 μ g

4.2.1. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA A LA AMPICILLINA Y GENTAMICINA PARA EL INÓCULO DE CADA CEPA DE 10⁶ UFC/ML

Inóculo de la cepa: 10⁶ Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro de solución.

Diámetro del disco de antibiótico: 6 milímetros

Medida del halo de inhibición: en milímetros

Tabla 42. Método de difusión del disco, Normas EFSA para los antibióticos ampicilina y gentamicina

Antimicrobiano	Resistente Halo (mm)	Sensibilidad media Halo (mm)	Sensible Halo (mm)
Ampicilina	≤ 12	13-15	≥ 16
Gentamicina	≤ 12	12 < ϕ < 13	≥ 13

Fuente: EFSA, 2012

En la Tabla 42, se observa los valores estándar para ampicilina y gentamicina. Los resultados fueron asignados de la siguiente manera: R= Resistente, SM= Sensibilidad media y S= Sensible por las Normas EFSA mediante una estandarización y evaluación de antibióticos frente a bacterias del género *Lactobacillus*.

12 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	AM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	28	28	21	25,67	3,30	S
UTNFa 37	21	28	22	23,67	3,09	S

UTNFa 38	16	24	22	20,67	3,40	S
UTNFa 39	36	34	33	34,33	1,25	S
UTNFa 40	26	20	19	21,67	3,09	S
UTNFa 41	20	26	24	23,33	2,49	S

Tabla 43. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina

S: Sensible

A las 12 horas de incubación se realizó tres repeticiones de las medidas de los halos de inhibición formados por la AM 10, frente a las BAL en estudio y al control probiótico a una concentración de 10^6 UFC/ml, se calcularon los promedios y la desviación estándar respectiva, para la interpretación de resultados se comparó los promedios con las normas EFSA; en la Tabla 43, se puede observar que las cepas en estudio y el probiótico comercial presentan sensibilidad a este antibiótico.

Tabla 44. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina

24 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	AM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación Estándar	Resultados
Probiótico comercial (Lactobacillus LB*)	28	28	22	26,00	2,83	S
UTNFa 37	21	21	25	22,33	1,89	S
UTNFa 38	16	26	22	21,33	4,11	S
UTNFa 39	36	33	34	34,33	1,25	S
UTNFa 40	28	28	20	25,33	3,77	S
UTNFa 41	20	20	26	22,00	2,83	S

S: Sensible

Según la lectura de resultados de la Tabla 44, a las 24 horas de incubación las cepas de interés y el probiótico comercial con concentración 10^6 UFC/ml continúan presentando sensibilidad a la ampicilina, ya que los promedios de los halos de inhibición son mayores a 16 mm.

Tabla 45. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina

36 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	AM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	29	29	21	26,33	3,77	S
UTNFa 37	22	22	24	22,67	0,94	S
UTNFa 38	16	26	22	21,33	4,11	S
UTNFa 39	37	32	39	36,00	2,94	S
UTNFa 40	28	28	20	25,33	3,77	S
UTNFa 41	20	20	26	22,00	2,83	S

S: Sensible

Los promedios de los halos de inhibición se encuentran dentro del intervalo de 22 mm a 36 mm, presentándose las BAL y el testigo comercial, sensibles a la ampicilina a las 36 horas de incubación.

Tabla 46. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico ampicilina

48 horas	(10 ⁶ UFC/ml)
----------	--------------------------

Cepa	AM 10					
	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	29	29	22	26,67	3,30	S
UTNFa37	22	22	24	22,67	0,94	S
UTNFa38	16	26	23	21,67	4,19	S
UTNFa39	34	34	36	34,67	0,94	S
UTNFa40	28	28	22	26,00	2,83	S
UTNFa41	22	22	26	23,33	1,89	S

S: Sensible

Al finalizar todos los periodos de incubación, se puede observar que las cinco cepas de interés y el probiótico comercial presentaron sensibilidad a ampicilina. Con menor promedio del halo de inhibición de 20,67 (\pm 4,11) mm frente a la cepa asignada UTNFa 38 a las 12 horas de incubación y mayor promedio del halo de inhibición de 36,00 (\pm 2,94) mm frente a la BAL UTNFa 39, a las 36 horas.

Los datos en esta investigación, concuerdan con la evaluación realizada por Cueto, Acuña y Valenzuela (2010), donde 26 cepas de BAL (entre ellas *Lactobacillus fermentum*) fueron analizados en términos de susceptibilidad a 14 antibióticos (uno de ellos, ampicilina) de importancia epidemiológica, los resultados mostraron que todas las cepas presentaron sensibilidad a la ampicilina.

Lo que describen Vanegas *et al.*, (2012), es que el tema de resistencia a antibióticos es muy controvertido, ya que lo ideal es que las bacterias utilizadas como probióticos; no deberían ser resistentes a antibióticos para que no se conviertan en un vehículo de transferencia de genes de resistencia, sin embargo, este tema no ha sido suficientemente definido con relación a los requisitos mínimos que debe tener un probiótico según la OMS.

En la investigación de Amorocho (2011), menciona que algunas cepas del género *Lactobacillus* entre ellas el *Lactobacillus delbrueckii* que fueron aisladas de leche de oveja Guirra presentaron sensibilidad a algunos antibióticos como a la ampicilina 10 μ g, de 39 cepas estudiadas todas fueron sensibles a dicho antibiótico con halos de inhibición entre 17 y 38.5 mm. El autor

menciona también que cada cepa expresa características propias y se confirma que no se pueden generalizar las propiedades probióticas a un género o especie. La información obtenida, es útil en el momento que se deseen emplear estas cepas en alimentos probióticos porque permiten monitorizar determinadas bacterias.

Tabla 47. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina

12 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	6	6	9	7,00	1,41	R
UTNFa 37	17	17	17	17	0	S
UTNFa 38	8	8	9	8,33	0,47	R
UTNFa 39	12	11	11	11,33	0,47	R
UTNFa 40	7	7	8	7,33	0,47	R
UTNFa 41	7	7	11	8,33	1,89	R

R: Resistente S: Sensible

En la Tabla 47, se puede observar que los promedios de los halos de inhibición formados por el antibiótico GM 10, frente al probiótico comercial y a las cepas con códigos: UTNFa 38, UTNFa 39, UTNFa 40 y UTNFa 41 son menores de 12 mm, mostrándose las BAL anteriormente mencionadas y el control comercial resistentes a dicho antibiótico, a excepción de la BAL UTNFa 37 donde el promedio del halo de inhibición fue mayor a 13 mm, presentado sensibilidad, las cepas de interés y el probiótico comercial estuvieron a una concentración de 10^6 UFC/ml.

Tabla 48. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina

24 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	6	6	11	7,67	2,36	R
UTNFa 37	17	17	16	16,67	0,47	S
UTNFa 38	10	8	10	9,33	0,94	R
UTNFa 39	12	11	12	11,67	0,47	R
UTNFa 40	8	8	10	8,67	0,94	R
UTNFa 41	7	7	11	8,33	1,89	R

R: Resistente, S: Sensible

A las 24 horas de incubación, los resultados se mantienen iguales que a las 12 horas, cuatro cepas de interés (UTNFa 38, UTNFa 39, UTNFa 40 y UTNFa 41) y el probiótico comercial presentan resistencia a la GM 10, la cepa UTNFa 38 continúa siendo sensible a este antibiótico. De acuerdo a la investigación de Amorocho (2011), de 39 cepas del género de *Lactobacillus*, sólo 4 de ellas presentaron sensibilidad a GM 10, una de cepas fue el *Lactobacillus delbrueckii* y el *Lactobacillus acidophilus* presentó resistencia a dicho antibiótico, en comparación con la presente investigación una de las cinco cepas evaluadas fue sensible.

Tabla 49. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10⁶ UFC/ml y antibiótico gentamicina

36 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	6	6	11	7,67	2,36	R
UTNFa 37	17	17	17	17	0	S
UTNFa 38	10	8	10	9,33	0,94	R
UTNFa 39	13	11	13	12,33	0,94	SM
UTNFa 40	9	9	9	9	0	R
UTNFa 41	8	8	12	9,33	1,89	R

R: Resistente, S: Sensible, SM: Sensibilidad Media

En la Tabla 49, se detallan los valores y los promedios de los halos de inhibición, este ensayo se realizó por triplicado, los resultados señalan que el probiótico comercial y las BAL: UTNFa 38, UTNFa 40 y UTNFa 41 se han mantenido resistentes a la gentamicina desde el inicio del experimento, el halo de inhibición formado en presencia de la cepa UTNFa 39 aumentó el diámetro de 11,67 (\pm 0,47) mm a 12,33 (\pm 0,94) mm, pasando de ser resistente a presentar sensibilidad media a la gentamicina, mientras que la cepa UTNFa 37 continúa presentando sensibilidad a dicho antibiótico.

Tabla 50. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^6 UFC/ml y antibiótico gentamicina.

48 horas	(10 ⁶ UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	6	6	11	7,67	2,36	R
UTNFa 37	17	17	17	17	0	S
UTNFa 38	10	8	10	9,33	0,94	R
UTNFa 39	13	11	12	12,00	0,82	R
UTNFa 40	9	9	9	9	0	R
UTNFa 41	8	8	13	9,67	2,36	R

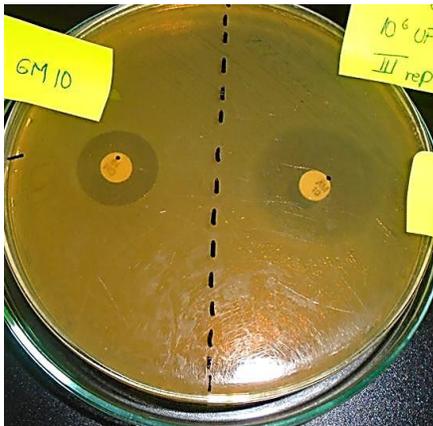
R: Resistente, S: Sensible

En la Tabla 50, se puede observar que en el caso de tolerancia a gentamicina, cuatro cepas de interés y el probiótico comercial presentaron resistencia a dicho antibiótico. Las cepas en estudio: BAL 2 (UTNFa 38), BAL 3 (UTNFa 39), BAL 4 (UTNFa 40), BAL 5 (UTNFa 41) y el probiótico comercial con concentración de 10^6 UFC/ml, presentan resistencia frente al antimicrobiano gentamicina; a excepción de la bacteria ácido láctica 1 (UTNFa 37) mostrando sensibilidad, en donde el antibiótico formó un halo de 17 mm, en el caso de UTNFa 39 que a

las 36 horas de incubación presentó sensibilidad media a la gentamicina, a las 48 horas de incubación volvió a ser resistente a este antibiótico.

De acuerdo con FAO/OMS (2001), como en el caso de cualquier bacteria, entre algunas bacterias del ácido láctico, incluidos los microorganismos probióticos, existe una resistencia intrínseca a los antibióticos.

Mediante el experimento de Cueto *et al.*, (2010), en la resistencia de bacterias probióticas a antibióticos, describe que, de las 26 cepas ácido lácticas probióticas 14 de ellas presentaron sensibilidad ante la gentamicina, 5 tuvieron sensibilidad media y 7 fueron resistentes.



Fotografía 6. Vista de los halos de inhibición formados por ampicilina y gentamicina en presencia del inóculo de la cepa UTNFa 37 (10^6 UFC/ml)



Fotografía 7. Vista de los halos de inhibición formados por ampicilina y gentamicina en presencia del inóculo de la cepa UTNFa 40 y del probiótico comercial (10^6 UFC/ml)

En las Fotografías 6 y 7, se presenta la vista fenotípica del halo transparente, que indican que la cepa UTNFa 37 es sensible a los dos antibióticos (Fotografía 6) y en la Fotografía 7 se puede observar que las cepas presentan sensibilidad a ampicilina y resistencia a gentamicina.

4.2.2. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE TOLERANCIA A LA AMPICILINA Y GENTAMICINA PARA EL INÓCULO DE CADA CEPA DE 10^8 UFC/ML

Inóculo de la cepa: 10^8 UFC/ml

Diámetro del disco de antibiótico: 6 milímetros

Medida del halo de inhibición: en milímetros

Tabla 51. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina

12 horas	(10^8 UFC/ml)
----------	------------------

Cepa	AM 10					
	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	22	24	22	22,67	0,94	S
UTNFa 37	23	21	22	22,00	0,82	S
UTNFa 38	22	22	21	21,67	0,47	S
UTNFa 39	24	25	26	25,00	0,82	S
UTNFa 40	20	23	20	21,00	1,41	S
UTNFa 41	24	23	24	23,67	0,47	S

S: Sensible

La evaluación de la susceptibilidad al antibiótico ampicilina de las cepas en estudio se volvió a repetir, pero el inóculo de cada cepa de interés y del probiótico comercial se aumentó a 10^8 UFC/ml; los valores de los diámetros fueron expresados en mm y se midieron con una regla; calculándose el valor promedio de los tres ensayos realizados, así como la desviación estándar promedio. Los promedios fueron comparados con las Normas EFSA, para la interpretación de resultados. Después de 12 horas de incubación a una temperatura de 37°C , tanto el control comercial y las BAL en estudio fueron sensibles a la ampicilina $10\ \mu\text{g}$, ya que los promedios de los halos fueron mayores que 16 mm.

Tabla 52. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina

24 horas	(10 ⁸ UFC/ml)					
	AM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	23	23	24	23,33	0,47	S
UTNFa 37	24	22	23	23,00	0,82	S
UTNFa 38	22	22	22	22,00	0,00	S
UTNFa 39	25	26	25	25,33	0,47	S
UTNFa 40	23	23	21	22,33	0,94	S
UTNFa 41	24	25	24	24,33	0,47	S

S: Sensible

En el segundo periodo de incubación (24 horas) se observa la presencia de los halos de inhibición de la ampicilina sobre las BAL en estudio y el testigo comercial con inóculo de 10^8 UFC/ml permanecen sensibles a dicho antibiótico.

Tabla 53. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina

36 horas	(10 ⁸ UFC/ml)					
	AM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	24	23	24	23,67	0,41	S
UTNFa 37	20	23	21	21,33	1,08	S
UTNFa 38	22	24	21	22,33	1,08	S
UTNFa 39	26	24	25	25,00	0,71	S
UTNFa 40	24	23	22	23,00	0,71	S
UTNFa 41	24	24	23	23,67	0,41	S

S: Sensible

En la Tabla 53, se puede observar que las cepas en estudio continúan presentando sensibilidad a AM (10 µg), incluso el probiótico comercial constituido de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* y *L. fermentum* fue sensible a la ampicilina al formarse halos mayores de 16 mm sobre él, el promedio de los diámetros de los halos de inhibición estableció frente al control comercial fue de 23,67 (± 0,41) mm.

Tabla 54. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico ampicilina

48 horas	(10 ⁸ UFC/ml)					
	AM 10					

Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (Lactobacillus LB*)	15	15	15	15,00	0	SM
UTNFa 37	22	24	22	22,67	0,82	S
UTNFa 38	25	25	25	25,00	0	S
UTNFa 39	30	30	30	30,00	0	S
UTNFa 40	21	21	21	21,00	0	S
UTNFa 41	25	25	25	25,00	0	S

SM: Sensibilidad media, S: Sensible

Se detectó que al aumentar de 10^6 a 10^8 UFC/ml la concentración de los inóculos de las cepas de interés y del probiótico comercial, no influyen en la tolerancia a ampicilina; se puede considerar que las bacterias ácido lácticas en estudio continúan siendo sensibles a la ampicilina 10 µg, desde las 12 horas hasta las 36 horas de incubación; en el último período de incubación que corresponde a las 48 horas, el probiótico comercial se muestra medianamente sensible, al presentar el antimicrobiano el promedio del halo con menor diámetro (15 mm) en comparación a los anteriores tiempos. El incremento de horas de incubación actuó como factor favorable para que el probiótico comercial presente una sensibilidad intermedia a la ampicilina.

Las 22 BAL estudiadas por Mejía *et al.*, (2007) citado en Amorocho (2011), fueron sensibles a 0.5 µg de ampicilina con halos de inhibición entre 14 y 30 mm. En este estudio, las cinco bacterias de interés fueron sensibles a 10 µg de ampicilina, con halos de inhibición 22,67 a 30 mm.

Las BAL estudiadas fueron sensibles a ampicilina. Estos resultados coinciden con las recomendaciones de la EFSA donde describen que las bacterias que presentan características probióticas no deben poseer resistencia a antibióticos, aunque este tema no ha sido totalmente definido.

12 horas	(10^8 UFC/ml)
----------	------------------

Cepa	GM 10					Resultados
	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	8	8	8	8,00	0	R
UTNFa 37	7	7	7	7,00	0	R
UTNFa 38	8	8	7	7,67	0,47	R
UTNFa 39	8	8	8	8,00	0	R
UTNFa 40	8	8	8	8,00	0	R
UTNFa 41	11	11	7	9,67	1,89	R

Tabla 55. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 12 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina

R: Resistente

Continuando con la evaluación de la susceptibilidad a la gentamicina de las BAL de interés, se realizó el mismo proceso pero los inóculos de las cepas de interés y del probiótico comercial se aumentaron a 10^8 UFC/ml, el ensayo se realizó por triplicado; se registraron los valores de los diámetros de los halos de inhibición y se calcularon los promedios con la desviación estándar respectiva, a las 12 horas de incubación a una temperatura de 37°C , las cepas y el probiótico comercial fueron resistentes a la GM 10. Los promedios de los halos de inhibición fueron menores a 12 mm.

Tabla 56. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 24 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina

Cepa	(10^8 UFC/ml)					Resultados
	GM 10					
	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus</i> LB*)	8	8	8	8,00	0	R
UTNFa 37	7	7	7	7,00	0	R
UTNFa 38	8	8	7	7,67	0,41	R
UTNFa 39	8	8	8	8,00	0	R
UTNFa 40	8	8	8	8,00	0	R

UTNFa 41	11	11	7	9,67	1,63	R
-----------------	----	----	---	------	------	----------

R: Resistente

A las 24 horas de incubación las BAL estudiadas y el testigo probiótico con inóculos de 10^8 UFC/ml continúan presentando resistencia a la GM 10, cuando el inóculo fue de 10^6 UFC/ml, la cepa UTNFa 37 fue sensible al antibiótico mencionado (ver Tabla 48), esto indica que el aumento de inóculo influye en la actividad para esta BAL.

Tabla 57. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 36 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina

36 horas	(10 ⁸ UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	8	9	9	8,67	0,41	R
UTNFa 37	7	7	7	7,00	0,00	R
UTNFa 38	8	8	7	7,67	0,41	R
UTNFa 39	8	7	7	7,33	0,41	R
UTNFa 40	8	8	8	8,00	0,00	R
UTNFa 41	11	11	7	9,67	1,63	R

R: Resistente

Se puede observar que en el tercer periodo de incubación (36 horas) las cepas en estudio y el probiótico comercial con inóculo 10^8 UFC/ml mantiene los mismos resultados como en el primer y segundo tiempo de incubación, las cepas de interés y el probiótico comercial fueron resistentes a la gentamicina (10 µg). Para la interpretación de resultados se comparó con las Normas EFSA (ver Tabla 42).

Tabla 58. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10^8 UFC/ml y antibiótico gentamicina

48 horas	(10^8 UFC/ml)					
	GM 10					
Cepa	I Repetición	II Repetición	III Repetición	X media	Desviación estándar	Resultados
Probiótico comercial (<i>Lactobacillus LB*</i>)	10	10	10	10	0	R
UTNFa 37	7	14	14	11,67	2,86	R
UTNFa 38	10	10	7	9	1,22	R
UTNFa 39	12	12	12	12	0	R
UTNFa 40	10	10	10	10	0	R
UTNFa 41	11	11	10	10,67	0,41	R

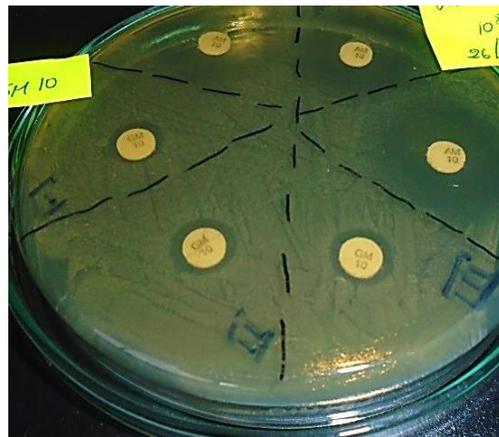
R: Resistente

En esta evaluación el probiótico comercial actuó de igual manera que las cepas de interés ya que al finalizar la evaluación de la susceptibilidad a gentamicina de las BAL en estudio, se pudo observar que al aumentar la concentración del inóculo de cada cepa de interés incluyendo el probiótico comercial a 10^8 UFC/ml, mantienen resistencia al antimicrobiano GM 10 y la bacteria ácido láctica 1 (UTNFa 37) que al iniciar el experimento con una concentración de 10^6 UFC/ml presentó sensibilidad a dicho antibiótico; ahora con una mayor concentración del inóculo la cepa se muestra resistente, en los diferentes tiempos de incubación (12, 24, 36, 48 horas); formándose un halo sobre la cepa menciona de 7 mm hasta las 36 horas de incubación y a las 48 horas el halo fue de 11,67 (\pm 2,86) mm.

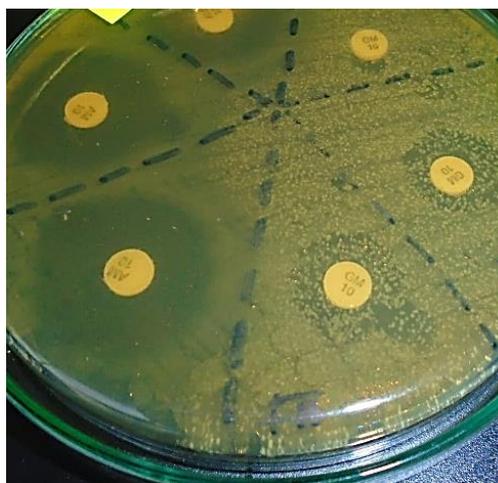
De acuerdo con López, Teves & Torres (2006), “la concentración del inóculo bacteriano debe ser de aproximadamente 10^8 microorganismos por mililitro”, comprobándose lo que ha dicho el autor, ya que el aumento del inóculo es un factor importante en el caso de consumir un probiótico

En comparación con el trabajo de investigación de Cano (2014), donde se evaluó la tolerancia a gentamicina (10 μ g) de 10 bacterias del género *Lactobacillus* con inóculos de 5×10^5 UFC/ml, 9 de ellas presentaron sensibilidad a dicho antibiótico, los diámetros de los halos de inhibición fueron de 14 a 30 mm, únicamente el *Lactobacillus salivarius* fue resistente, ya que el antibiótico formó un halo de 9 mm; en la presente investigación sucedió lo contrario las cinco cepas en estudio presentaron resistencia a este antimicrobiano.

Se menciona que los *Lactobacillus* tienen resistencia a aminoglucósidos; debido a la impermeabilidad de la membrana (P. Rodríguez *et al.*, 2009 citado en Amorocho, 2011). Por otro lado, las ideas de Mannua *et al.*, (2003) publicadas en Amorocho (2011); considera que las BAL pueden tener una resistencia sinérgica entre los agentes de la pared celular y los aminoglucósidos.



Fotografía 8. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia del probiótico comercial (10^8 UFC/ml)



Fotografía 9. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia de la cepa UTNFa 37 (10^8 UFC/ml)

En las Fotografías 8 y 9, se presenta la vista fenotípica con la formación del halo transparente que indican que la cepa es sensible al antibiótico ampicilina y resistente a la gentamicina al formar un halo menor.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- ◆ El perfil antimicrobiano de bacterias ácido lácticas aisladas de nichos ecológicos de la selva nativa del Ecuador ha demostrado que cinco cepas de interés han presentado elevada actividad antimicrobiana frente a dos patógenos de origen alimenticio.
- ◆ Las cepas de interés poseen capacidad antimicrobiana lo que confirma la hipótesis establecida.
- ◆ El ensayo de pruebas de difusión en el agar mostró que, el sobrenadante libre de células a pH 3,0 y pH 4,0 de las cinco cepas de interés (UTNFa 37, UTNFa 38, UTNFa 39, UTNFa 40 y UTNFa 41), presentaron elevada actividad antimicrobiana frente a los dos patógenos indicadores.
- ◆ Entre las cepas en estudio, el sobrenadante libre de células de la cepa UTNFa 41 a pH 3,0 presentó la mayor actividad antagonista frente al patógeno *E. coli* (zona de inhibición de 19 mm) mientras que a pH 4,0, el sobrenadante de la cepa UTNFa 38 ha presentado la mayor actividad antimicrobiana (zona de inhibición de 16 mm).
- ◆ Frente a *Salmonella sp.* se evidencia que el sobrenadante libre de células a pH 3,0 de la cepa UTNFa 40 ha mostrado elevada actividad antimicrobiana (diámetro de la zona de

inhibición de 18 mm), mientras que al pH 4,0 el sobrenadante de la cepa UTNFa 41 (diámetro de la zona de inhibición de 17 mm) mostró una actividad antagonista elevada durante los cuatro tiempos de incubación.

- ◆ Los análisis estadísticos de varianza con los valores de desviación estándar se comprueban con el resultado obtenido, ya que las cinco cepas en estudio presentaron actividad antagonista elevada frente a los dos patógenos indicadores.

- ◆ Según las comparaciones realizadas con la tabla de valores de las Normas EFSA, en el perfil de susceptibilidad a ampicilina (10 µg) de las cepas en estudio, se concluye que las diferentes concentraciones de inóculos (10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml) no influyeron en el resultado final, ya que las cinco BAL de interés presentaron sensibilidad a dicho antibiótico en los cuatro periodos de incubación.

- ◆ El antibiograma de las cinco cepas de interés a gentamicina (10 µg), ha demostrado que la cepa UTNFa 37 fue resistente a un inóculo bacteriano de 10^8 UFC/ml y a 10^6 UFC/ml presentó sensibilidad.

5.2 RECOMENDACIONES

- ◆ Realizar una investigación más detallada, en la que se evalué los análisis con otras bacterias patógenas y diferentes antibióticos.

- ◆ Se recomienda utilizar una cepa pura de *Lactobacillus* u otra cepa conocida, para ser utilizada en la preparación de probióticos como un control testigo, en todos los experimentos.

- ◆ Se debe utilizar diferentes concentraciones de antibióticos, para conocer exactamente la concentración mínima y máxima de tolerancia.

- ◆ Mantener la inocuidad durante toda la práctica; para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados en las placas de estudio.

- ◆ En la parte experimental de la capacidad antimicrobiana, al utilizar los sobrenadantes de las cepas de interés, se recomienda realizar una incubación de 18 horas o más; ya que esto permite que el sobrenadante sea absorbido por el medio de cultivo y con ello evitar que se disperse al realizar las mediciones.

- ◆ Al realizar el control de medida de las zonas y halos de inhibición, se debe medir cuidadosamente por la parte posterior de la placa, en un cuarto con claridad y luz brillante; o bien a contraluz y utilizando un fondo oscuro adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

- Acumedia Neogen Corporation. (06 de Noviembre de 2010). *Tryptic Soy Broth (7164)*. Obtenido de http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7164_PI.pdf
- Adelantado, C., Arosemena, L., Calvo, M., Manteca, L., Ordoñez, G., Ponsa, F., . . . Zekaria, D. (s.f.). *La Salmonella de Actualidad desde Siempre*. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=Uor_5EEchoIC&pg=PP18&dq=La+salmonella&hl=es&sa=X&ei=QtJXVLyxHejZsATF54GwAw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=La%20salmonella&f=false
- Ajila, N., & Arce, O. (2013). *Diseño de la Línea de Producción de un Postre de Yogurt Descremado*. Obtenido de https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25149/1/Tesis_de_Grado_Nathaly_Ajila_Olinda_Arce.doc
- Amorocho, C. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13830/tesisUPV3685.pdf?sequence=6>
- Andrade, M. J. (2013). *Evaluación de la viabilidad del uso de Lactobacillus LA-5 en la elaboración de helados*. Obtenido de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3266/1/10040.pdf>
- Barboza, J., Vásquez, H., & Salcedo, R. (2009). *Probióticos y Conservadores Naturales en los Alimentos*. México: D-Universidad de Guanajuato <http://site.ebrary.com/lib/utnortesp/docDetail.action?docID=10286585&p00=probioticos>.
- Cano, C. (agosto de 2014). *Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and Prebiotic Utilization* . Obtenido de <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1046&context=foodscidiss>
- Cañedo, C. A. (13 de Febrero de 2011). *Los probióticos en las infecciones*. Obtenido de <http://www.guia-abe.es/anexos-los-probioticos-en-las-infecciones>
- Cardozo, C., & Ríos, C. (3 de Agosto de 2015). *Producción de ácido láctico por fermentación de repollo morado*. Obtenido de <http://documents.mx/documents/produccion-de-acido-lactico-por-fermentacion-de-repollo-morado.html>

- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. (Mayo de 2012). *Gentamicina*. Obtenido de <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Gentamicina.pdf>
- Cueto, M., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). *Evaluación In vitro del Potencial Probiótico de Bacterias Ácido Lácticas aisladas de Suero Costeño*. Obtenido de Scientia Agropecuaria: <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2010v32n93art1.pdf>
- Delgado, M. (Abril de 2012). *Identificación de bacterias más frecuentes causantes de ivu en mujeres de edad fértil que acuden a los laboratorios de servicios de salud de la UNL. período octubre 2011- abril 2012*. Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/6569/1/Delgado%20Calva%20Marlon%20Junior.pdf>
- Difco. (2013). <http://www.maplica.com/Manual%20Difco%20A-C.pdf>.
- Elika. (28 de febrero de 2013). *Escherichia coli*. Obtenido de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf
- European Food Safety Authority. (2012). *Guidance on the assessment of bacterial*. Obtenido de Characterization of Commercial Probiotics:Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and: <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1046&context=foodscidiss>
- European Food Safety Authority. (2012). *Guidance on the assessment of bacterial*. Obtenido de Characterization of Commercial Probiotics:Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=>
- FAO. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo en la salud pública*. Obtenido de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468soo.pdf>
- FAO. (2011). *Preventing E. coli in Food*. Obtenido de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf
- FAO. (s.f.). *Fermented Fruits and Vegetables. A Global Perspective*. Obtenido de Bacterial Fermentations.
- FAO/OMS. (1-4 de Octubre de 2001). *Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los*

Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Obtenido de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

Fulladosa, E., & Guàrdia, M. (2013). *Estrategias Innovadoras para Desarrollar Alimentos Más Saludables*. Barcelona: blueBOARD.

Gamazo, C., Sánchez, S., & Camacho, A. I. (2013). *Microbiología Basada en la Experimentación*. Barcelona: Elsevier España, S.L.

García, C., García, Y., & López, Y. (2010). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Xubana de Ciencia Agrícola* 39(2):129-113,2005.

Gobierno descentralizado del cantón Ibarra. 2016. Extraído el 18 de diciembre del 2014 desde <http://www.ibarra.gob.ec>

Ñíguez, A., & Castillo, A. (Junio de 2011). *Obtención del ácido láctico a partir del almidón de papa (Solanum Tuberosum L), como materia prima para la fabricación de material descartable biodegradable*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1514/12/UPS-CT002110.pdf>

Jurado, H., Aguirre, D., & Ramírez, C. (29 de Agosto de 2010). *Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como la alternativa al uso de antibióticos*. Obtenido de <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-142/v14n2a8.pdf>

Kechagia, M., Dimitrios, B., Stavroula, K., Dimitra, D., Konstantina, G., Nikoletta, S., & Maria, F. E. (2013). *Hindawi Publishing Corporation*. Retrieved from Health Benefits of Probiotics: A Review: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/481651/>

Kioskea.net. (Junio de 2014). *salud.kioskea.net*. Obtenido de <http://salud.ccm.net/faq/8871-bacteria-patogena-definicion>

Laboratorios Britania S.A. (Febrero de 2010). *M.R.S Agar*. Obtenido de http://www.britanialab.com/productos/404_hoja_tecnica_es.pdf

Lacy, A. (Febrero de 2013). *Probiotics, Healthy Eating Tip of the Month*. Obtenido de <https://www.med.umich.edu/pfans/docs/tip-2013/probiotics-0213.pdf>

Lancasco. (2012). *Lactéol fort*. Obtenido de http://www.lancasco.com/wsite/index.php?option=com_virtuemart&view=productdetails&virtuemart_product_id=73&virtuemart_category_id=10&Itemid=194&lang=es

- Larco, A. (Noviembre de 2012). *Estudia de Factibilidad para la Creación de una Microempresa de Producción y Comercialización de Vino de Frutas Silvestres en la Ciudad de Ibarra, Provincia de Imbabura*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1350/1/02%20ICA%20396TESIS.pdf>
- Lema, C. (s.f.). *Plantas y frutos silvestres*. Obtenido de [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/5A3DEEFBE2840FFE05257BE40081E114/\\$FILE/plantas-y-frutos-silvestres-comestibles.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/5A3DEEFBE2840FFE05257BE40081E114/$FILE/plantas-y-frutos-silvestres-comestibles.pdf)
- López Teves, L., & Torres, C. (2006). *Determinación de la actividad antimicrobiana*. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp8.pdf>
- Lozoya, J. (16 de julio de 2013). *Para qué sirve antibiótico: infección, definición, dosis, efectos*. Obtenido de http://suite101.net/article/medicamentos-antibioticos-e-infecciones-bacterianas-a32623#.Vy_e5nry2pV
- Maldonado, F., & Prieto, J. (2008). *Midiendo la Infección: Análisis de Secuencias*. Madrid: Díaz de Santos, S.A.
- Man, J. D., Rogosa, M., & Sharpe, E. (1960). *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol.
- Mantilla, J., Pulido, M., & Jaime, J. (24 de mayo de 2010). *PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE Salmonella GRUPO D (MÓVILES E INMÓVILES)*. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/article/view/18252/19836>
- MedlinePlus. (20 de mayo de 2015). *Antibióticos*. Obtenido de <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/antibiotics.html>
- Merck. (2002). http://www.amco-instruments.com/index_files/pdf/chromocult-coliform.pdf.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2013). https://public.tableau.com/profile/javier.gaona#!/vizhome/MORBILIDAD_RDACAA_2013_0/Presentacin.
- Olvera, M., Serrano, C., & Quirasco, M. (2015). *Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas*. Obtenido de http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2015_1/acidolacticas.pdf
- Pakistan, J. (2007). *Comparison of Different Methods for Detection of Lactobacillus ssp.*

- Portal de Salud de la Comunidad Médica. (Martes de Noviembre de 2014). *Vida Saludable. Seguridad Alimentaria*. Obtenido de http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142700759787&language=es&pagename=PortalSalud%2FPPage%2FP TSA_pintarContenidoFinal&vest=1156329829973
- Pumarola, A. (1987). *Microbiología y Parasitología Médica*. Barcelona: Masson S.A.
- Ramírez, C., Ulloa P, Velásquez, Y., Ulloa A, & Arce, F. (Junio de 2011). *Bacterias Lácticas: Importancia en los alimetos y sus efectos en la salud*. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Rodríguez, J. G. (s.f.). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Obtenido de http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/bibliografia/sensibilidad.pdf
- Rodriguez, J. S., Jiménez, S. S., Navarro, R. M., & Villarejo, M. J. (2011). *Patógenos Emergentes en la Línea de Sacrificio de Porcino*. Madrid: Díaz de Santos.
- Rodriguez, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmumoduladora*. Obtenido de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf;jsessionid=503143B8E6934D26EEE77E9440207D52.tdx1?sequence=1>
- Tapias, G. Q. (s.f.). *Primer Curso Nacional Sobre Manejo de Proyectos de Desarrollo de Rural Regional*. Obtenido de *Algunas Operaciones en Plantas de Carnes*: <http://books.google.com.ec/books?id=tWQt4ngVGmUC&pg=RA1-PA51&dq=La+fermentaci%C3%B3n+%C3%A1cido+l%C3%A1ctica&hl=es&sa=X&ei=eixrVJvIM8yhgwSbz4PADA&ved=0CCsQ6AEwAg#v=onepage&q=La%20fermentaci%C3%B3n%20%C3%A1cido%20%C3%A1ctica&f=false>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). *Métodos de Estudio de la Sensibilidad Antibiótica*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Vademecum. (1 de enero de 2015). *Ampicilina Dicloxacilina*. Obtenido de <http://www.vademecum.es/principios-activos-ampicilina+%2B+dicloxacilina-j01ca51+p3>
- Vanegas, M., Gonzáles, L., Arévalo, S., & Villanueva, C. (31 de Agosto de 2012). *Evaluación del potencial probiótico de cepas Lactobacillus colombianas aisladas de leche materna*. Recuperado el 31 de Agosto de 2010, de *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=EVALUACI%C3%93N+DEL+POTEN>

CIAL+PROBIOTICO+DE+CEPAS+LACTOBACILLUS+COLOMBIANAS+AISLADAS+DE+LECHE+MATERNA.&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUK Ewi_m4H7ybvJAhVETSYKHd_RAFQQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Falimentos hoy.acta

Vélez, J. (2014). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/45835/1/32255433.2014.pdf>

Vélez, J. (2014). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granja del Aburrá sur*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/45835/1/32255433.2014.pdf>

Vinderola, G., Benetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. (1 de Mayo de 2011). *Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy Products*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153040/>

ANEXOS

ANEXO A

Método de difusión del disco - Normas EFSA

Antibiotic susceptibility profiles of strains by the disk diffusion method using susceptibility y criteria established by Charteris *et al.*(53)

Table 3.4 Antibiotic susceptibility profiles of strains by the disk diffusion method using susceptibility criteria established by Charteris *et al.*(53)

Antibiotic	Bacteria	Inhibition diameter (mm, average \pm standard deviation)	Classification
Ampicillin Resistant \leq 12 mm Moderate 13-15 mm Susceptible \geq 16 mm	<i>Lb. acidophilus</i>	38 \pm 0.2	Susceptible
	<i>Lb. brevis</i>	29 \pm 1.4	Susceptible
	<i>Lb. casei</i>	36 \pm 1.3	Susceptible
	<i>Lb. delbrueckii</i>	38 \pm 1.2	Susceptible
	<i>Lb. plantarum</i>	45 \pm 0.7	Susceptible
	<i>Lb. rhamnosus</i>	38 \pm 0.6	Susceptible
	<i>Lb. salivarius</i>	32 \pm 0.7	Susceptible
	<i>Bb. longum</i>	39 \pm 0.4	Susceptible
	<i>L. lactis</i>	34 \pm 2.4	Susceptible
	<i>B. coagulans</i>	n.r. ¹	n.r.
Chloramphenicol Resistant \leq 13 mm Moderate 14-17 mm Susceptible \geq 18 mm	<i>Lb. acidophilus</i>	36 \pm 0.0	Susceptible
	<i>Lb. brevis</i>	35 \pm 1.8	Susceptible
	<i>Lb. casei</i>	33 \pm 0.7	Susceptible
	<i>Lb. delbrueckii</i>	36 \pm 1.3	Susceptible
	<i>Lb. plantarum</i>	29 \pm 0.5	Susceptible
	<i>Lb. rhamnosus</i>	31 \pm 4.0	Susceptible
	<i>Lb. salivarius</i>	31 \pm 0.2	Susceptible
	<i>Bb. longum</i>	25 \pm 0.4	Susceptible
	<i>L. lactis</i>	30 \pm 0.4	Susceptible
	<i>B. coagulans</i>	39 \pm 4.1	Susceptible
Clindamycin Resistant \leq 8 mm Moderate 9-11 mm Susceptible \geq 12 mm	<i>Lb. acidophilus</i>	18 \pm 7.0	Susceptible
	<i>Lb. brevis</i>	15 \pm 1.5	Susceptible
	<i>Lb. casei</i>	14 \pm 0.8	Susceptible
	<i>Lb. delbrueckii</i>	39 \pm 2.0	Susceptible
	<i>Lb. plantarum</i>	12 \pm 2.4	Susceptible
	<i>Lb. rhamnosus</i>	20 \pm 0.0	Susceptible
	<i>Lb. salivarius</i>	26 \pm 3.6	Susceptible
	<i>Bb. longum</i>	14 \pm 2.1	Susceptible
	<i>L. lactis</i>	22 \pm 15.1	Susceptible
	<i>B. coagulans</i>	43 \pm 3.5	Susceptible

¹ n.r. not required by EFSA

Table 3.4. Antibiotic susceptibility profiles of strains by the disk diffusion method using susceptibility criteria established by Charteris *et al.* (53) (continued).

Antibiotic	Bacteria	Inhibition diameter (mm)	Classification	
Erythromycin	<i>Lb. acidophilus</i>	40 ± 1.2	Susceptible	
	<i>Lb. brevis</i>	35 ± 1.3	Susceptible	
	Resistant ≤ 13 mm	<i>Lb. casei</i>	40 ± 0.4	Susceptible
	Moderate 14-17 mm	<i>Lb. delbrueckii</i>	39 ± 1.7	Susceptible
	Susceptible ≥ 18 mm	<i>Lb. plantarum</i>	29 ± 1.2	Susceptible
		<i>Lb. rhammosus</i>	40 ± 0.2	Susceptible
		<i>Lb. salivarius</i>	30 ± 0.2	Susceptible
		<i>Bb. longum</i>	39 ± 0.0	Susceptible
		<i>L. lactis</i>	32 ± 1.1	Susceptible
		<i>B. coagulans</i>	44 ± 4.1	Susceptible
Gentamycin	<i>Lb. acidophilus</i>	14 ± 0.3	Susceptible	
	<i>Lb. brevis</i>	16 ± 0.0	Susceptible	
	Resistant ≤ 12 mm	<i>Lb. casei</i>	15 ± 0.7	Susceptible
	Moderate - mm	<i>Lb. delbrueckii</i>	19 ± 1.4	Susceptible
	Susceptible ≥ 13 mm	<i>Lb. plantarum</i>	16 ± 0.6	Susceptible
		<i>Lb. rhammosus</i>	16 ± 0.9	Susceptible
		<i>Lb. salivarius</i>	9 ± 0.6	Resistant
		<i>Bb. longum</i>	16 ± 0.1	Susceptible
		<i>L. lactis</i>	20 ± 0.3	Susceptible
		<i>B. coagulans</i>	31 ± 0.0	Susceptible
Kanamycin	<i>Lb. acidophilus</i>	7 ± 0.0	Resistant	
	<i>Lb. brevis</i>	7 ± 0.0	Resistant	
	Resistant ≤ 13 mm	<i>Lb. casei</i>	7 ± 0.0	Resistant
	Moderate 14-17 mm	<i>Lb. delbrueckii</i>	22 ± 0.7	Susceptible
	Susceptible ≥ 18 mm	<i>Lb. plantarum</i>	7 ± 0.0	Resistant
		<i>Lb. rhammosus</i>	10 ± 0.6	Resistant
		<i>Lb. salivarius</i>	7 ± 0.0	Resistant
		<i>Bb. longum</i>	n.r. ¹	n.r.
		<i>L. lactis</i>	7 ± 0.0	Resistant
		<i>B. coagulans</i>	30 ± 0.4	Susceptible

¹ n.r. not required by EFSA

Fuente: European Food Safety Authority, 2012 citado en Cano, 2014

ANEXO B

Reference Guide: McFARLAND STANDARD PREPARATION

McFARLAND STANDARD PREPARATION

McFARLAND STANDARD PREPARATION				
0,5	10,0	0,1	150	-
1	9,9	0,1	300	3,0
2	9,8	0,2	600	7,0
3	9,7	0,3	900	10,0
4	9,6	0,4	1200	12,0
5	9,5	0,5	1500	15,0
6	9,4	0,6	1800	-
7	9,3	0,7	2100	20,0
8	9,2	0,8	2400	-
9	9,1	0,9	2700	-
10	9,0	1,0	3000	30,0

1. Prepare the tubes by mixing 1% sulfuric acid with 1% barium chloride according to the table.
2. Make sure the tubes are uniform in size and made of chemically resistant glass.
3. Plug the tubes with rubber stoppers and carefully seal with paraffin. Store the tubes upright.
4. To estimate bacterial cell density, compare the bacterial suspension with the standards.
5. The above set is used to determine bacterial density in saline suspension. To estimate bacterial density in broth, make the set by dissolving the sulfuric acid and barium chloride in sterile broth.

REFERENCE IN: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis Ed. A.C. Sonnenwirth and L. Jarett. C.V. Mosby Company. 1980 p. 1363

ANEXO C

Glosario

Difco™Agar Nutriente: Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a requerimientos nutritivos. Su uso está descrito en muchos procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria (Laboratorios Britania S.A., 2010).

Difco™Bacto Agar: Es un agente de solidificación en el que las materias extrañas, porciones pigmentadas y las sales se han reducido a un mínimo. Bacto® Agar se utiliza en la preparación de medios de cultivo microbiológicos (Difco, 2013).

Merck KGa A Chromocult Coliformen Agar: Merck ha desarrollado una nueva combinación de dos sustratos cromogénicos que permiten la simultánea detección de coliformes totales y *E. coli*.

Evaluación:

E. Coli: azul oscuro a colonias de color violeta (Salmon-GAL y Reacción X-glucurónido).

Coliformes totales: salmón a colonias de color rojo (reacción Salmon-GAL)(Merck, 2002).

Difco™LB Broth, Miller (Luria Bertani): Base para el mantenimiento y propagación de *Escherichia coli* en procedimientos de microbiología molecular (Difco, 2013).

Difco™MRS Agar: El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (Man y otros, 1960), y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas (Laboratorios Britania S.A., 2010).

Scharlau^{Microbiology} Salmonella Shigella Agar (SS Agar): Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella sp.* y de algunas especies de *Shigella sp.* a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia. Es un medio de cultivo selectivo y diferencial.

Evaluación fenotípica:

Salmonella typhimurium ATCC 14028: transparentes, centro negro.

Shigella flexneri y *Shigella sonnei*: incoloras (Laboratorios Britania S.A., 2010).

ANEXO D

Abreviaturas

AM 10: Ampicilina 10 μg

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

DO: Densidad Óptica

EFSA: European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

GM 10: Gentamicina 10 μg

h: horas

LB*: *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii*

mg: miligramo

ml: mililitro

mm: milímetro

NaCl: Ácido Clorhídrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

μg : microgramos

μl : microlitros

%: porcentaje

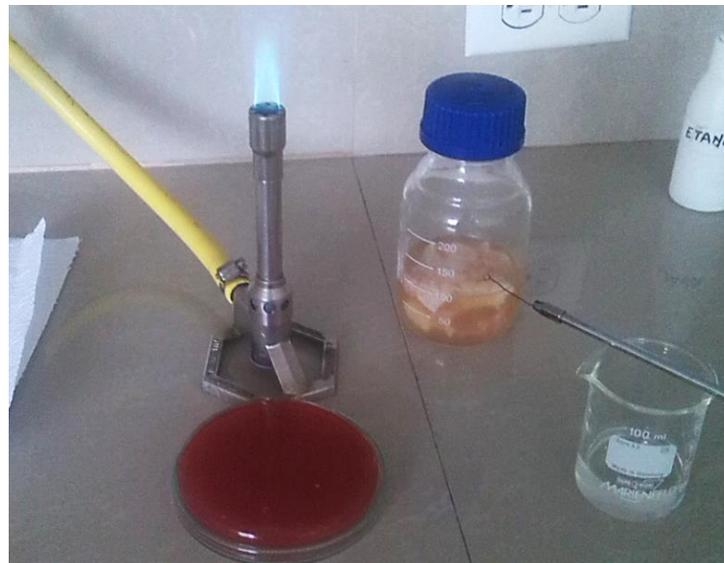
ANEXO E

EXPERIMENTO I

Descripción de la evaluación de la actividad antagonista frente a los patógenos de origen alimentario, *E. coli* y *Salmonella sp.*, de las bacterias con posible potencial probiótico.



Aislamiento de cepas de BAL de frutos silvestres de la Estación La Favorita - Ecuador



Obtención de dos bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* de queso y piel de pollo respectivamente

Fase de resiembra de cepas



Preparación de medios de cultivo



Resiembra de las BAL en estudio



Resiembra de bacterias patógenas



Cepa con código UTN Fa 37



Cepas con códigos: UTN Fa 38 y UTN Fa 39



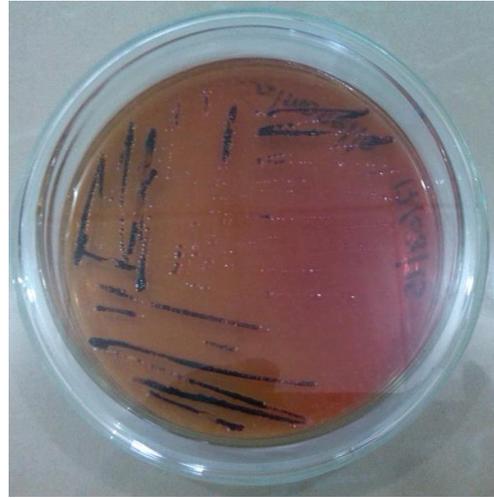
Cepas con códigos: UTN Fa 40 y UTN Fa 41



Probiótico comercial (*Lactobacillus LB**)



Escherichia coli



Salmonella sp.



Incubación a 37°C durante 24 h

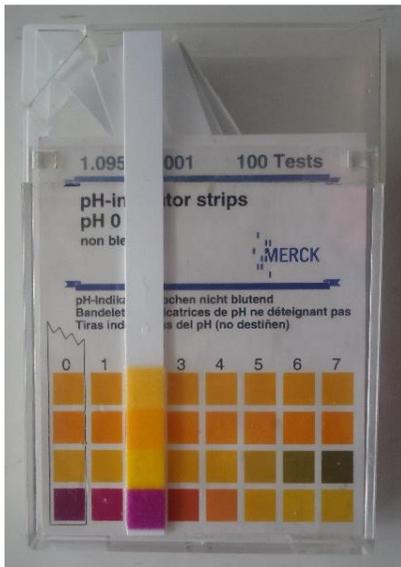
Fase de la determinación antimicrobiana



Repartición de medios en cajas Petri



Centrifugación



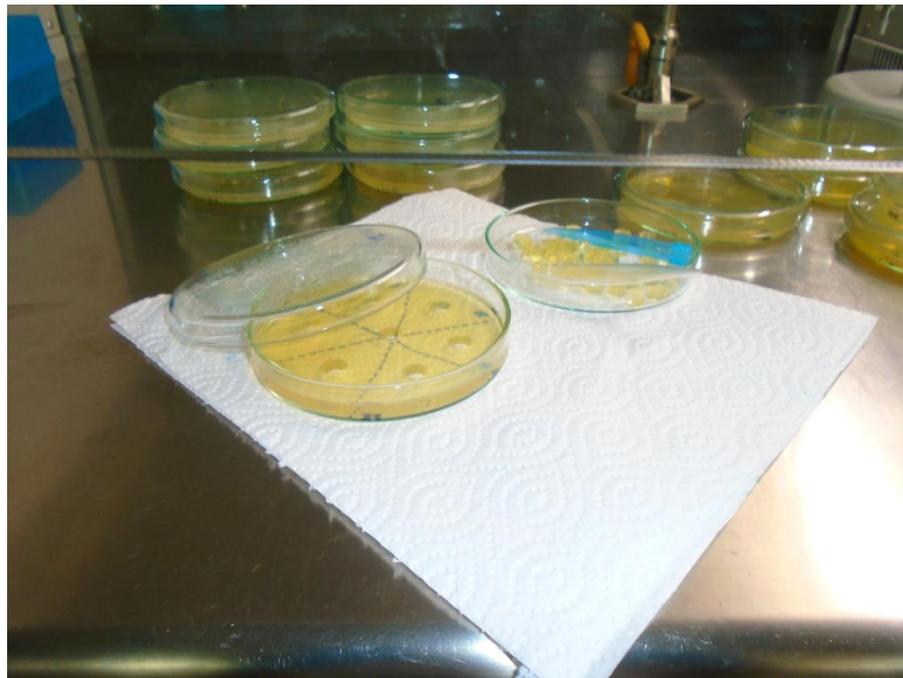
Ajuste del pH



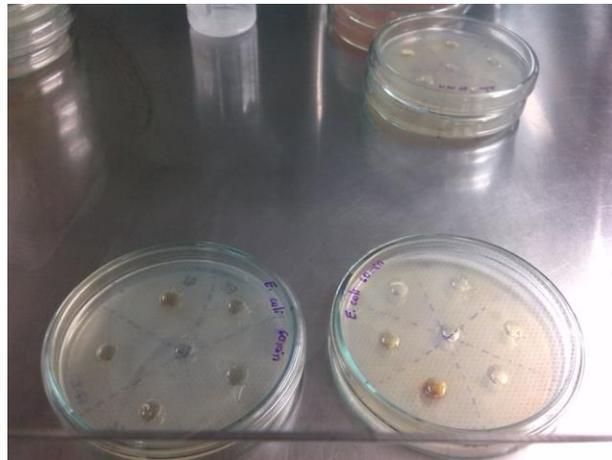
Primera siembra



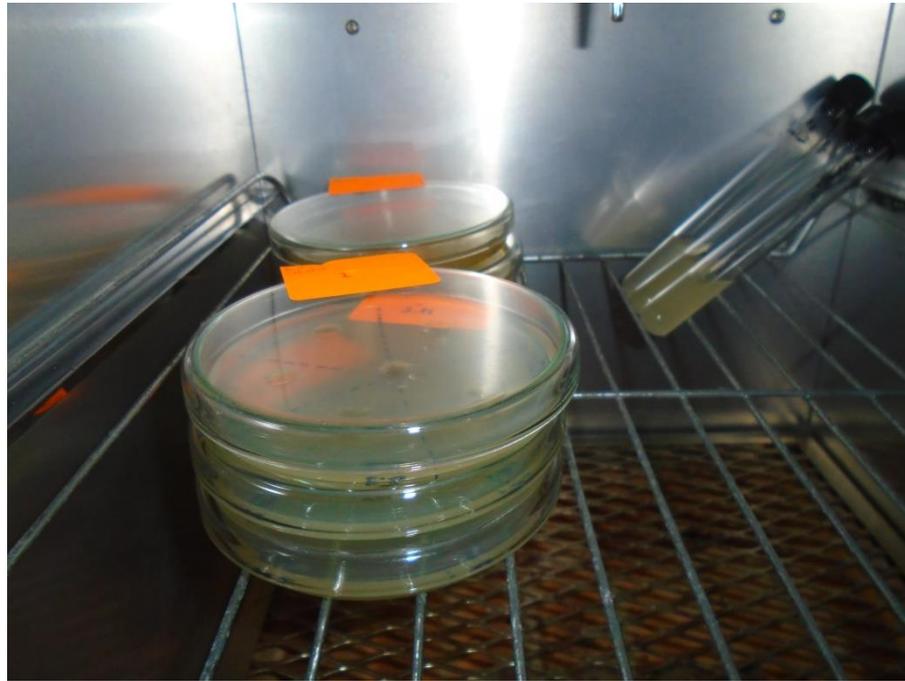
Primera Incubación a 37°C



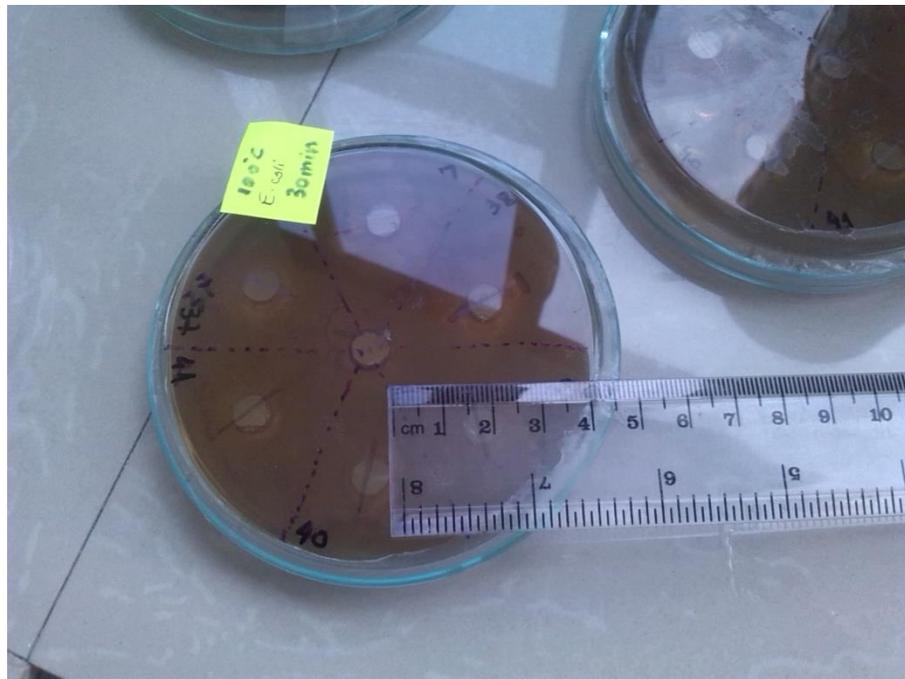
Perforación de medios de cultivo



Segunda siembra



Segunda incubación a 37°C



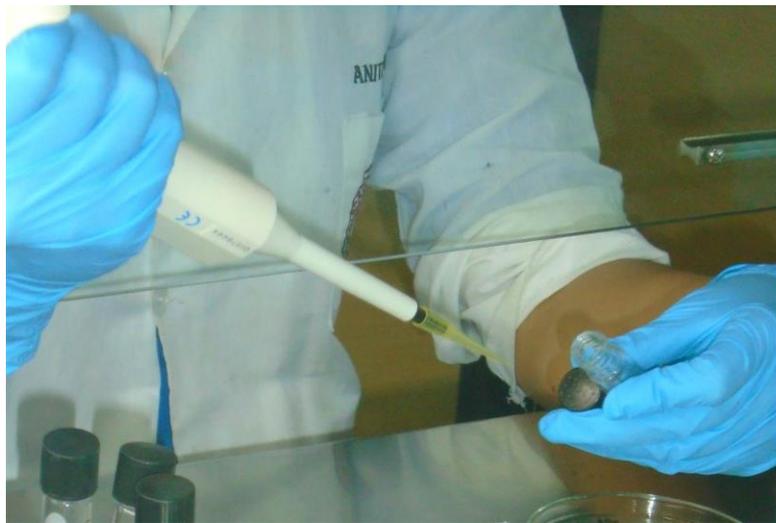
Interpretación de resultados

ANEXO F

EXPERIMENTO II

Proceso de la evaluación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas en estudio

Fase de preparación del cultivo de cepas de BAL en estudio



Resiembra de cepas



Primera Incubación a 37°C de 3 a 4 horas



Medida de la densidad óptica

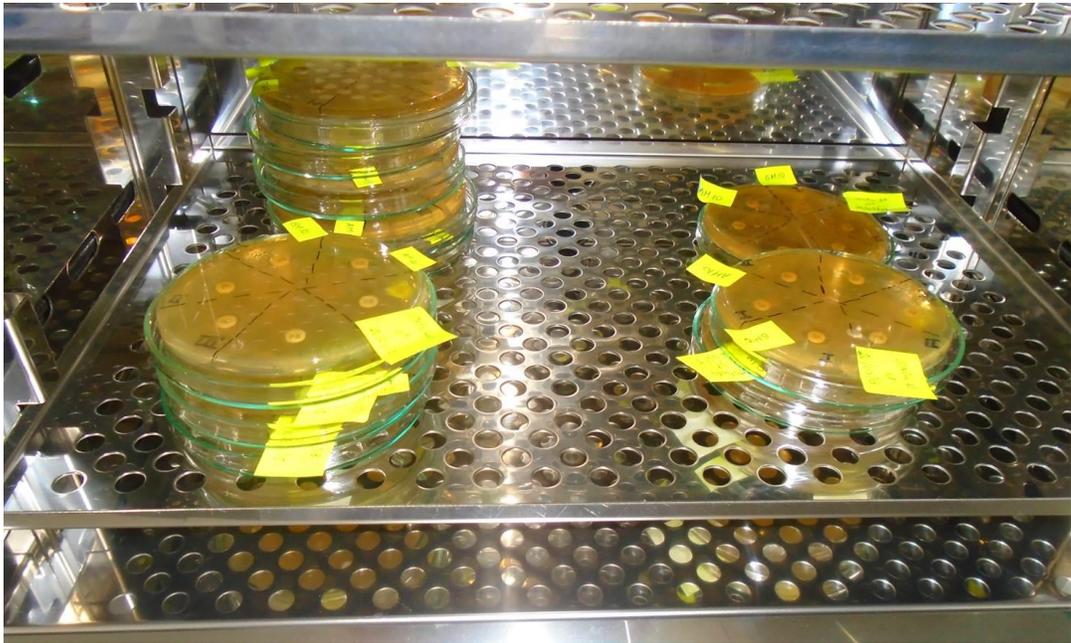


Cálculo de UFC/ml

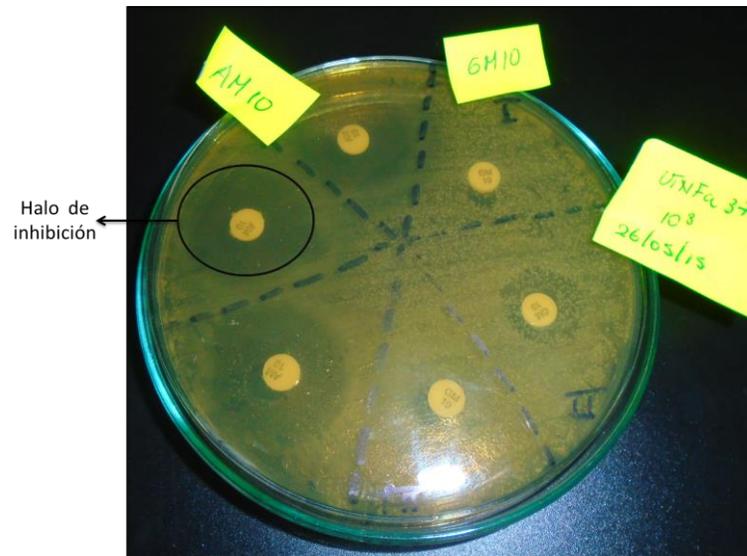
Fase del proceso de evaluación de la tolerancia a antibióticos



Siembra de cepas y colocación de discos de antibióticos



Segunda incubación a 37°C a diferentes intervalos de tiempo



Interpretación de resultados