



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

UNA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

FACA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Trabajo de Graduación

**Estudio preliminar de *Lactobacillus* sp, con potencial
probiótico a partir de sustrato fermentado de yuca
(*Manihot esculenta*), UNA 2017**

AUTORES

Br: Roger Antonio Urbina Orozco

Br: Kels Rahomi Guerrero Montenegro

ASESORES

Ing. Wendell Antonio Mejía Tinoco MSc.

Ing. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez MSc.

Ing. Jannin Ronaldo Hernández Blandón

Managua, Nicaragua

Marzo 2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL**

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la Decanatura en la facultad de Ciencia animal de la Universidad Nacional Agraria, como requisito parcial para optar el título profesional de:

INGENIERO EN ZOOTECNIA

Miembros del tribunal Examinador:

Ing. Nadir Reyes Sánchez PhD

Presidente

Ing. Rosa Argentina Rodríguez MSc

Secretaria

Lic. Rosario Rodríguez Pérez MSc

Vocal

Sustentantes:

Br. Kels Rahomi Guerrero Montenegro

Br. Roger Antonio Urbina Orozco

Managua, Nicaragua Marzo, 2018

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
III. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1. Ubicación del estudio.	3
3.2. Obtención de la muestra.	3
3.3. Aislamiento de las bacterias ácido lácticas.	3
3.4. Tinción Gram	3
3.5. Identificación de especies de <i>Lactobacillus</i>	4
3.6. Prueba de resistencia a diferentes tipos de pH	4
3.7. Capacidad antagonica de las cepas <i>Lactobacillus</i> sobre bacterias patógenas.	4
3.8. Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	5
IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN	6
4.1. Identificación de especies <i>Lactobacillus</i>	6
4.2. Prueba de tolerancia a pH.....	7
4.1. Capacidad antagonica de las cepas <i>Lactobacillus</i> sobre bacterias patógenas	8
4.1. Prueba de sensibilidad a antibiótico	9
V. CONCLUSIONES	12
VI. RECOMENDACIONES	13

VII. LITERATURA CITADA	14
VIII. ANEXOS	17

DEDICATORIA

A **Dios** por concederme sabiduría, por regalarme la fuerza necesaria en cada circunstancia y poder seguir adelante venciendo cada obstáculo que se presentase en mi vida diaria.

A mis padres: **Javier Antonio Urbina pavón y Mercedes Orozco Membreño** les dedico este trabajo como agradecimiento a todo su esfuerzo, dedicación, apoyo y confianza que me dieron para cumplir una meta más en esta vida.

A mi abuela: **María Elena Membreño Membreño y Ernesto José Orozco Robleto**, por los consejos que siempre me brindaron para poder seguir adelante y nunca rendirme.

A cada una de las personas que de alguna manera se involucraron en este sueño de ser una persona preparada, gracias a su apoyo y consejos brindados.

A mis tíos, primos, amigos, compañeros por su apoyo incondicional

Roger Antonio Urbina Orozco

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por proveerme la fuerza, la salud y los conocimientos para culminar este trabajo. Y a mis **padres** por estar siempre en cada etapa de mi vida.

A mis asesores: **Lic. Isaías Sánchez Gómez, Ing. Wendell Antonio Mejía Tinoco y al Ing. Jannin Ronaldo Hernández Blandón**, por compartir sus conocimientos por brindarme su apoyo, confianza y amistad en el transcurso de nuestro trabajo.

Al **Ing. Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez y Lic. Marisol Vanegas**, por brindarnos su apoyo y conocimiento.

A la **Universidad Nacional Agraria** como *alma mater* por brindarme la oportunidad de formarme como profesional

A todos mis amistades que siempre me apoyaron y estuvieron conmigo en el transcurso de mi carrera

Roger Antonio Urbina Orozco

DEDICATORIA

A Dios por concederme la vida primeramente, por regalarme la fuerza necesaria para enfrentar cada circunstancia y la sabiduría para seguir adelante venciendo cada obstáculo que se presentase en mi vida diaria.

A mis padres: Francisco Guerrero Vallecillo y Martha Adriana Montenegro, les dedico este trabajo como agradecimiento a todo su esfuerzo, dedicación, apoyo incondicional y la confianza que me dieron para cumplir una meta más en esta vida.

A mis hermanos: Walter Francisco Guerrero Montenegro y Edwin Ariel Guerrero Montenegro, por los consejos, motivación y el apoyo que siempre me brindaron para seguir adelante y nunca rendirme.

A cada una de las personas que de alguna manera fueron partícipes de este sueño de ser una persona preparada, gracias a su apoyo y consejos brindados.

Kels Rahomi Guerrero Montenegro

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por proveerme salud, fuerza y los conocimientos para culminar este trabajo. Y a mis **padres** por estar siempre en cada etapa de mi vida.

A mis asesores: **Lic. Isaías Sánchez Gómez, Ing. Wendell Antonio Mejía Tinoco, Ing. Jannin Ronaldo Hernández Blandón** por compartir sus conocimientos por brindarme su apoyo, confianza y amistad en el transcurso de nuestro trabajo.

Al **Ing. Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez** y **Lic. Marisol Vanegas** por brindarnos su apoyo y conocimiento.

A la **Universidad Nacional Agraria** como *alma mater* por brindarme la oportunidad de formarme como profesional

A todos mis amistades que siempre me apoyaron y estuvieron conmigo en el transcurso de mi carrera.

Br: Kels Rahomi Guerrero Montenegro

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Género y especies de microorganismo identificados a partir de sustrato fermentado de yuca	15
2. Prueba de tolerancia de <i>Lactobacillus sp</i> a diferentes niveles de pH	16
3. Resultado de prueba de antagonismo de <i>L.casei</i> y <i>L.brevis</i> frente a las cepas bacterianas <i>E.coli</i> 25922 y <i>salmonella sp.</i>	17
4. Resultado de prueba de sensibilidad de <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>casei</i> a oxitetraciclina y Trimetropim Sulfametaxona	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Procedimiento para determinación de antagonismo de las especies de <i>Lactobacillus</i> a <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella</i> sp.	13
2. Procedimiento para determinación de susceptibilidad de las especies <i>Lactobacillus</i> a antibióticos Trimetropim sulfamexona y oxitetraciclina	14
3. Halos de inhibición observados en prueba de antagonismo microbiano de <i>L.casei</i> y <i>L.brevis</i> frente <i>E.coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella</i> sp	17
4. Prueba de sensibilidad de <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Lactobacillus casei</i> frente a los antibiótico Trimetropim Sulfametaxona y Oxitetraciclina	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Resultados del crecimiento de especies de <i>Lactobacillus</i> en diferentes medios de cultivos y temperatura.	25
2. Características de crecimientos de especies de <i>Lactobacillus</i> en diferentes medios de cultivo y temperatura.	26

RESUMEN

En Nicaragua los sistemas de producción pecuaria se ven afectados por la baja disponibilidad de alimento y agua en la época seca, ocasionando el aumento de enfermedades y desnutrición, afectando directamente los parámetros productivos y reproductivos del hato. De igual forma para contrarrestar este tipo de problemática entra el uso de antibióticos de uso profiláctico, terapéuticos y promotores de crecimientos capaces de eliminar patógenos y actuar de manera drástica sobre la flora microbiana necesaria para el funcionamiento del aparato digestivo además de influir en la acumulación de residuos en los productos finales de importancia para los consumidores. El género *Lactobacillus* representa un alto potencial biotecnológico, estas bacterias contribuyen al desarrollo de características organolépticas de los alimentos y generan un ambiente poco favorable para el desarrollo de microorganismos patógenos. El objetivo de este trabajo fue identificar mediante pruebas *in vitro* las especies de *Lactobacillus* con potencial probiótico procedentes de sustrato fermentado de yuca. Mediante las pruebas bioquímicas se identificaron dos *Lactobacillus sp*, *L. casei* y *L. brevis*. Las especies de *Lactobacillus* previamente identificadas fueron sometidas la prueba de resistencia a diferentes niveles de pH, mostrando resistencia a las condiciones acidas. La prueba de antagonismo microbiano frente *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp*, demostraron presencia de halos de inhibición, indicando acción antimicrobiana sobre el crecimiento de los patógenos. Las especies de *L. casei* y *L. brevis* fueron sensibles a los antibióticos Trimetroprim Sulfametaxona y Oxitetraciclina al realizar la prueba de sensibilidad. Estos resultados demuestran que las cepas identificadas pueden ser utilizadas como probiótico en la alimentación de los animales o como inoculante en el proceso de ensilaje.

Palabras claves: *Lactobacillus sp*, probiótico, antagonismo, tolerancia, especie, colonia.

ABSTRACT

In Nicaragua systems of production cattle they are affected by the low availability of food and water in dry season causing the increase of diseases and malnutrition, affecting directly the productive and reproductive herd parameter, Likewise counteract this types of situations comes the of antibiotics by prophylactic therapeutic use and growth promoters, able to eliminate pathogens and eliminate drastically on the microbial flora necessary for the functioning or the digestive system also to influencing the accumulation of waste in final products of importance to consumers, the genus lactobacillus represents a high biotechnological potential, this bacteria contribute to the increase organoleptic of food and generate an unfavorable environment for the growth of pathogens microorganisms. The objective of this work was identify with vitro test the species of lactobacillus with high probiotic through fermented substrate of yucca, through biochemical tests, lactobacillus sp, L.casei and L.brevis was identified, the lactobacillus species previously identified was in a resistance tests with different level of pH showing resistance to the acid conditions, the microbial antagonism test in front E.coli ATCC 25922 and salmonella sp demonstrate the presence of inhibition of halos, showing antimicrobial action over the pathogens growth the L.casei and L.brevis species was sensitive to Trimetoprim sulfametaxona and oxitetraciclina antibiotics, to realize the sensitive tests. These results demonstrate that the identified strains can be used as a probiotic in the feeding of the animals or as an inoculant in the silage process.

Keywords: *Lactobacillus sp*, probiotic, antagonism, tolerance, specie, colony.

I. INTRODUCCIÓN

En los sistemas ganaderos de América Central es común el uso de diferentes estrategias para la alimentación del ganado, entre las que se encuentran el pastoreo, el uso de ensilajes, henos y la suplementación con concentrados artesanales. En Nicaragua existe una época seca, durante las cuales la oferta de forrajes es deficiente, afectando negativamente los parámetros productivos y reproductivos de la ganadería. Los recursos utilizados en la época seca como alimento se caracterizan por presentar bajos valores nutritivos. (Fujisaka *et al.*, 2005)

En época seca la productividad del ganado se ve afectada por la escasez de alimento y agua, así mismo el aumento en los índices de enfermedades y desnutrición. Al llegar la época de lluvias, se asume el reto de recuperar las pérdidas ocasionadas por el manejo inadecuado de los animales y las condiciones ambientales de la época seca, para lograr obtener mejores ganancias y una productividad rentable en términos económicos (Vives, 2012).

En la producción animal se persigue siempre conseguir una buena situación sanitaria y de rendimiento en los parámetros productivos para obtener resultados económicos rentables manteniendo una relación directa entre el funcionamiento del tracto intestinal y la tasa de crecimiento, índice de conversión y diversas enfermedades a lo que conlleva someter a los animales a tratamientos de antibióticos o quimio-terapéuticos, capaces de eliminar tanto patógenos como también a la flora bacteriana necesaria para el funcionamiento del aparato digestivo (García, 2012).

El género *Lactobacillus* representan un potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estas bacterias contribuyen al desarrollo de las características organolépticas de los alimentos, además generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista (Rondón *et al.*, 2008).

La búsqueda de nuevas alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento se ha incrementado y actualmente se buscan compuestos que aumenten la inmunidad del huésped y no tengan efectos secundarios o residuales en los productos de origen animal los probióticos tienen un gran potencial por su efecto modulador de la microbiota del tracto gastrointestinal, que genera efectos positivos en el huésped (Giraldo *et al.*, 2015).

Las especies de *Lactobacillus* son una alternativa al uso del antibiótico con el fin de equilibrar la microbiota intestinal mejorando la asimilación de nutrientes y disminuyendo los residuos de fármacos en alimentos de origen animal considerándolo como un factor de riesgo en la salud pública (Lozano *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio fue identificar especies del género *Lactobacillus* con potencial probiótico en sustrato fermentado de yuca (*Manihot esculenta*), para suministrarse como una alternativa alimenticia de bajo costo en los sistemas de producción logrando potenciar y aumentar la capacidad digestiva de los animales en producción, al igual que mejorar la capacidad productiva y garantizar a la especie animal una óptima salud gastro-intestinal que pueda aminorar los costos de producción.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar un Estudio preliminar de *Lactobacillus* sp, con potencial probiótico a partir de sustrato fermentado de yuca (*Manihot esculenta*), UNA 2017.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1 Identificar las especies de *Lactobacillus* sp, presentes en el sustrato fermentado de yuca
- 2.2.2 Evaluar las especies de *Lactobacillus* identificadas con capacidad antagónica y probiótica frente a bacterias patógenas del tracto intestinal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 1/2 con coordenadas geográficas de 12° 08' 33" latitud norte, y 86° 10' 31" longitud oeste (INETER, 2010).

3.2. Obtención de la muestra.

Los aislamientos de las cepas se obtuvieron a partir de un sustrato de yuca fermentada que se elaboró de manera artesanal siguiendo una serie de pasos. Utilizando 300 gramos de yuca se procedió a retirar la cascará para luego cortarla en trozos pequeños y se trituró en un molino esterilizado para después esto ser licuada.

El sustrato obtenido se llevó al colador para luego este ser clasificado de manera que el sustrato que pasa es el que se utiliza y el material restante será desechado. Al sustrato a utilizar se le adicionó 6 gramos de melaza y 500 ml de agua destilada y se tapó herméticamente para fermentarlo por más de 36 horas.

3.3. Aislamiento de las bacterias ácido lácticas.

La muestra de sustrato fermentado de yuca fue obtenida siete días después de haber sido incubado. Posteriormente el sustrato fue trasladado al laboratorio para su análisis. El aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) se realizó por el método de dilución en serie, el cual consiste en homogenizar la muestra y de esta tomar 1 ml del sustrato para ser diluido de manera higiénica al diluyente (agua destilada) y ser homogenizada. Preparada la dilución madre (10^{-1}) se procedió a preparar diluciones decimales subsiguientes, para cada dilución se utilizaron tubos con 9 mL de agua destilada (se traspasó 1 mL) a la siguiente dilución (10^{-2}) se realizó el mismo procedimiento hasta formar la dilución (10^{-7}) (Gutiérrez, 2012).

Se inocularon en platos Petri con medio MRS previamente esterilizados alícuotas de 0,1 ml de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} esparcida con ayuda de un asa Drigalsky sobre la superficie del medio, se hizo de manera triplicada para ambas diluciones. Estas se incubaron en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C. Pasado el periodo de incubación las colonias bacterianas fueron nuevamente inoculadas en medios MRS utilizando un asa redonda realizando rayado estriado en tres direcciones, estas se incubaron nuevamente por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C con la finalidad de obtener colonias más puras.

3.4. Tinción Gram

Se utilizaron diez colonias puras para realizar la prueba de Tinción Gram (1884 Danes Hans Christian Gram) Esta tinción nos permite separar a la mayoría de las bacterias en dos grupos las Gram positivas que se tiñen de color violeta y las Gram negativas que se tiñen de color rosa. La morfología y coloración se observaron en un microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100X (Basualdo *et al.*, 2006, citado por García *et al.*, 2016).

3.5. Identificación de especies de *Lactobacillus*

Se seleccionaron las cepas de *Lactobacillus* según las características fenotípicas y morfología de las colonias. Las colonias puras se sometieron a prueba de fermentación de carbohidratos utilizando una base rica en nutrientes, cuyo indicador de pH es el púrpura de bromocresol para los diferentes carbohidratos al 1% (lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol y xilosa). Esta prueba sirve para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar los carbohidratos (azúcares) produciendo ácidos y gas visible.

3.6. Prueba de resistencia a diferentes tipos de pH

Se inoculo con un asa bacteriológica 3 ml de caldo MRS ajustado a pH 1.5 a 6.0 con intervalos de 0.5 con HCl 1N y se incubaron a 30°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. Mantilla *et al* (2012). Posteriormente se midió la turbidez del medio para demostrar la viabilidad de las colonias.

3.7. Capacidad antagonica de las cepas *Lactobacillus* sobre bacterias patógenas.

Se utilizaron colonias previamente identificadas de *Lactobacillus sp*, resistentes a diferentes grados de pH, posteriormente se sometieron a la prueba de antagonismo mediante el método de Kirby-Bauer (1966) el cual consiste en utilizar el medio solido Mueller Hilton inoculado con la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp.*, a una concentración 1×10^8 (0.5 grado de turbidez escala Mackfarland), posteriormente se impregnaron discos de papel filtro esterilizados de 0.5mm de diámetro con las bacterias ácido lácticas identificadas. (CNDR, 2004). Las placas se encubaron por un periodo de 24 a 48 horas a 30° C en condiciones de aerobiosis, se verifico la actividad antagonica por la formación de zonas transparentes alrededor de las colonias con un diámetro mayor a 1mm.

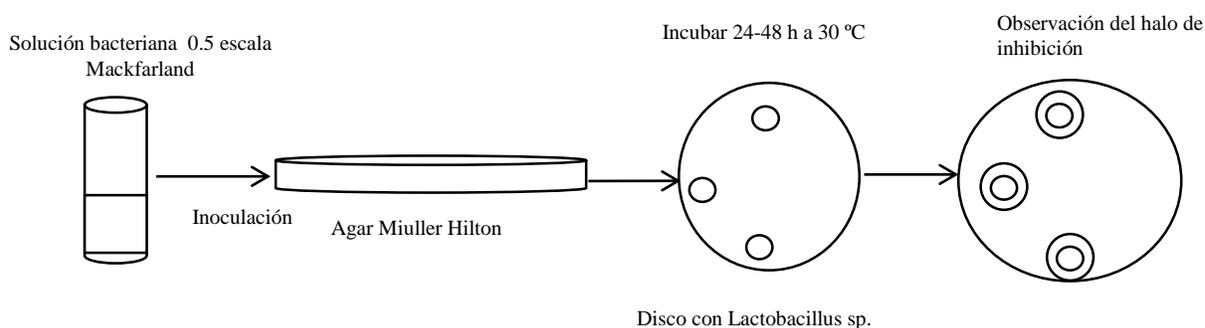


Figura 1: Procedimiento para determinación de antagonismo de las especies de *Lactobacillus sp* a *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp.*

3.8. Prueba de sensibilidad a antibióticos

Las colonias de bacterias previamente identificadas como *Lactobacillus*, y resistentes a diferentes grados de pH, fueron sometidas a pruebas de sensibilidad a antibióticos a través del método de Kirby-Bauer (1966) que consiste en colocar discos de papel impregnados de antibióticos en la superficie del medio previamente inoculado con una suspensión bacteriana 0,5 Mackfarland. Se produce la difusión de antibiótico y el crecimiento bacteriano en la superficie del medio. En el área donde la concentración de antibiótico es suficiente para evitar el crecimiento bacteriano se observa un halo de inhibición con borde definido claramente y con el disco ubicado en el centro del círculo (CNDR, 2004).

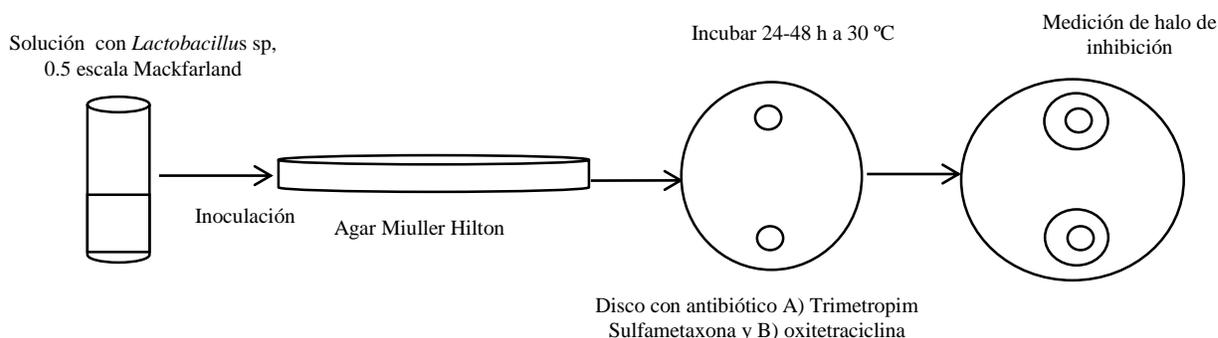


Figura 2. Procedimiento para determinación de susceptibilidad de las especies de *Lactobacillus* a antibióticos

Los inóculos de *Lactobacillus sp* identificadas se ajustaron a una turbidez 0.5 escala Mackfarland estas suspensiones fueron colocadas y esparcidas sobre la superficie de medio Müller Hilton y medio MRS (Man Rogosa Sharpe) con previa colocación de los discos con antibióticos según las normas de Thornsberry (1893) NCCLS (National Committed For Clinical Laboratory Standard) (Oxitetraciclina 30µg , Trimetoprim Sulfametaxona 25µg) las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas a 30° C, posterior al tiempo de incubación la lectura fue efectuada por la medición del diámetro de la zona (Halo) de inhibición.

IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de especies *Lactobacillus*

A partir de la muestra de sustrato de yuca fermentada, se aislaron diez colonias bacterianas y una colonia de levadura en platos Petri conteniendo agar MRS. Las observaciones microscópicas con tinción Gram mostraron morfología compatible con *Lactobacillus sp*, en siete aislados bacterianos, mientras que dos mostraron morfología para Bacillus Gram negativos y un único aislado con Bacillus Gram positivos. Mediante pruebas bioquímicas identificaron las especies de *Lactobacillus casei* y *brevis* (Anexo 1).

Cuadro 1. Géneros y especies de microorganismos identificados a partir de sustrato fermentado de yuca.

N° de aislado	Géneros identificados	Especies identificadas	Otros microorganismo
1	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>L. casei</i>	
3	<i>Lactobacillus sp</i>	NI	
4	-----	NI	Bacilos Gram negativo
6	-----	---	Levadura
7	<i>Lactobacillus sp</i>	NI	-----
9	-----	NI	Bacilos Gram negativo
10	<i>Bacillus sp</i>	-----	
1B	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>L. casei</i>	
2B	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>L. brevis</i>	
3B	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>L. casei</i>	
4B	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>L. casei</i>	

(NI): No identificado

Las especies de *L. casei* y *L. brevis* se encuentran en diferentes hábitats tales como productos lácteos, ensilaje, tractos intestinales humanos, bocas y aguas residuales Collins *et al.* (1989), *L. casei* es una bacteria homofermentativa productora de ácido láctico predominantemente de la forma isomérica L (+), y *L. brevis* es heterofermentativa a estas bacterias se les considera generalmente como seguras (GRAS) y tiene un amplio número de aplicaciones en la industria alimentaria. vijayakumar *et al.* (2008)

Velásquez *et al.* (2015) describe a *Lactobacillus casei* como una bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica. *Lactobacillus brevis* es tolerante a los jugos gastro intestinales, tiene la capacidad de mejorar la salud intestinal se ha utilizado en terapias de intestino irritable.

Lactobacillus brevis son tradicionalmente utilizados en productos fermentados esta cepa actualmente es una de la más utilizadas como probiótico. Ronka *et al.* (2003).

Según los resultados de un estudio realizado por Waki *et al.* (2014) pueden ser utilizados para mejorar la especificidad y selectividad de microorganismos probiótico a partir de la incorporación de bacterias ácido lácticas a sustratos fermentados de yuca u otro tipo de sustrato de origen vegetal y animal.

4.2. Prueba de tolerancia a pH

Los siete aislados de *Lactobacillus* fueron sometidos a la prueba de tolerancia a pH, observándose crecimiento bacteriano únicamente en las especies identificadas como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus casei*. Para los géneros de *Lactobacillus sp*, las condiciones de pH no fueron favorables para su crecimiento

Cuadro 2. Prueba tolerancia de *Lactobacillus sp* a diferente niveles de pH.

Especies identificadas	Concentración									
	pH 1.5	pH 2	pH 2.5	pH 3	pH 3.5	pH 4	pH 4.5	pH 5	pH 5.5	pH 6
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Positivo (+). Crecimiento de las cepas; Negativo (-). Ningún crecimiento

Rodríguez *et al.* (2008) afirman que el comportamiento de los cultivos del genero *Lactobacillus* frente a niveles de pH bajos son capaces de sobrevivir en condiciones de acidez similares a las existentes en el estómago de animales y seres humanos. Mandingan *et al.* (2004) menciona que el género *Lactobacillus* es más resistentes a condiciones acidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer aun cuando el pH haya caído tanto, permitiéndole crecer durante la fermentaciones lácticas naturales.

Carr *et al.* (2002) indican que las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer en pH tan bajos como 3.2 otras a valores tan altos como 9.6 y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5 permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no tolerarían el pH ácido

León (2012) hace referencia a la resistencia de los *Lactobacillus* a niveles de pH ácido, por presencia de una gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático los microorganismos GRAM positivo utilizan un mecanismo conocido como F1-F0ATPasa.

4.1. Capacidad antagonica de las cepas *Lactobacillus* sobre bacterias patógenas

Las especies *Lactobacillus casei* y *brevis* exhibieron actividad antagonica contra el patógeno *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp*, se observaron halos de inhibición con diámetro mayor o igual a 1mm, lo cual indica que los aislados identificados tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno.

L. casei y *L. brevis* sometidos a la actividad antimicrobiana contra *E. coli* 25922 y *Salmonella sp* como cepas indicadoras mostrando *L. casei* reflejo actividad a través de la exhibición de zonas máximas de inhibición hacia los Gram negativos *E coli* (10 mm), *Salmonella sp* (10mm) de igual manera para *L. brevis* respectivamente.

Cuadro 3: Resultados de prueba de antagonismos de *L. casei* y *L. brevis* frente a las cepas bacterianas *E. coli* 25922 y *Salmonella sp*.

Cepa	<i>E. coli</i> 25922		<i>Salmonella sp</i>	
	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación
<i>L. casei</i>	10	Positivo	10	Positivo
<i>L. brevis</i>	10	Positivo	10	Positivo
<i>L. casei</i>	10	Positivo	10	Positivo
<i>L. casei</i>	10	Positivo	10	Positivo
<i>L. casei</i>	10	Positivo	10	Positivo

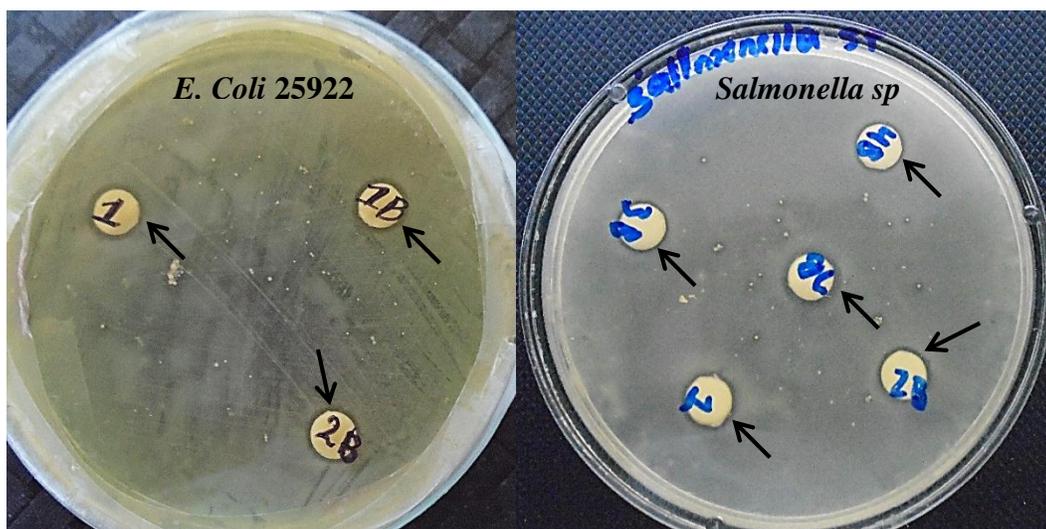


Figura 3. Halos de inhibición (Flechas) observados en prueba de antagonismo microbiano de *L. casei* y *L. brevis* frente a *E. coli* ATCC 25922 (Izquierda) y *Salmonella sp* (Derecha). 2B: cepa de *Lactobacillus brevis*, 1, 4B, 3B Y 1B: cepa de *Lactobacillus Casei*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se asemejan con los de Benítez (2015) en donde se evaluó la capacidad antagónica de cuatro aislamientos de *Lactobacillus sp.* Frente a las bacterias patógenas *E. coli* y *Salmonella sp* en el cual los aislados presentan una gran actividad antimicrobiana. De igual manera, Amorocho (2011) indico que la actividad inhibitoria frente a *Salmonella* de las especies *Lactobacillus* podría deberse a los componentes celulares, exclusión competitiva por nutrientes, a la presencia de ácido láctico y otras sustancias activas a pH bajo.

En un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2011) se obtuvieron resultados similares a los del presente, en donde se evaluaron los aislados de *Lactobacillus sp* frente a *E. coli* 25922 y se determinó la producción de ácidos orgánicos que inhibieron el crecimiento de *E. coli*.

En este estudio no se evaluó la naturaleza de los procesos de producción de sustancia antagónica de las cepas previamente identificadas *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus casei* pero en un estudio realizado por Ferreira *et al.* (2011) describe que en esta actividad pueden estar presentes ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, di acetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas. Gaitán (2013) menciona que las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibióticos que son producidas de forma natural por especies del genero *Lactobacillus* estas bacteriocinas inhiben el crecimiento a diferentes especies patógenas.

Benítez (2015) nos indica que la capacidad que poseen los *Lactobacillus sp.* Para inhibir el crecimiento de microorganismo patógeno permite evidenciar su contribución al efecto barrera debido a la segregación de compuesto antimicrobiano que juega un rol significativo en la habilidad de los probiótico para competir con los microorganismos residentes a lo largo del tracto intestinal y modificarlo beneficiosamente.

Servin (2003) aduce que las bacterias *Lactobacillus* además de producir sustancias antagónicas pueden llegar a prevenir o tratar diversas enfermedades gastrointestinales compitiendo por sitios específicos contra las bacterias patógenas. Gaitán (2013) menciona que se puede dar también una actividad antimicrobiana por la competencia de nutrientes que se encuentren en el intestino.

4.1.Prueba de sensibilidad a antibiótico

Los aislados de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* fueron sensibles a Trimetropim Sulfametaxona, debido a que se observaron halos de inhibición mayores a 19mm, también fueron sensibles a Oxitetraciclina con halos de inhibición mayores a 15mm. Según los criterios de la NCCLS un microorganismo es sensible a Trimetropim Sulfametaxona si el halo de inhibición es mayor o igual 19 mm y son resistentes si el halo es menor o igual a 10mm, con relación a Oxitetraciclina, los microorganismos son sensibles si los halos son mayor o igual a 15 mm y son resistentes si presentan halos menor o igual a 11 mm.

Cuadro 4. Resultados de Prueba de sensibilidad de *Lactobacillus brevis* y *casei* a Oxitetraciclina y Trimetoprim Sulfametaxona.

Cepa	Oxitetraciclina		Trimetoprim Sulfametaxona	
	Diamétero (mm)	Interpretación	Diamétero (mm)	Interpretación
<i>L. casei</i>	40 mm	Sensible	25 mm	Sensible
<i>L. brevis</i>	45 mm	Sensible	25 mm	Sensible
<i>L. casei</i>	40 mm	sensibles	25 mm	Sensible
<i>L. casei</i>	40 mm	Sensibles	25 mm	Sensible
<i>L. casei</i>	40 mm	Sensibles	25 mm	Sensible

Sensibilidad (S): No hay crecimiento alrededor del disco comercial, Resistencia (R): Hay crecimiento alrededor del disco comercial, no hay presencia de halo de inhibición

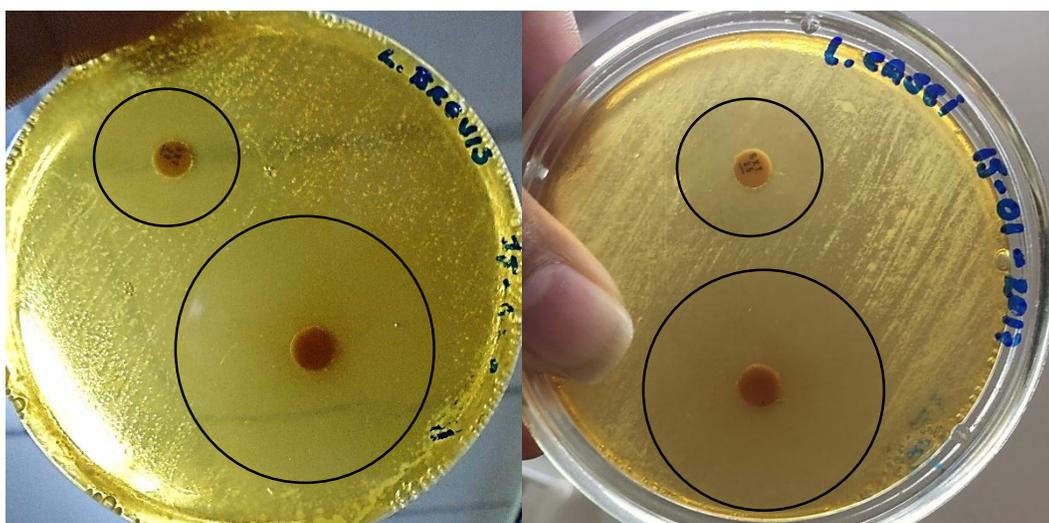


Figura 4. Prueba de sensibilidad de *Lactobacillus brevis* (Izquierda) y *Lactobacillus casei* (derecha) frente a los antibióticos Trimetoprim Sulfametaxona y Oxitetraciclina.

Los resultados obtenidos en el estudio son similares a los encontrados por Lara *et al.* (2009) quienes refieren que las cepas de *Lactobacillus* especies son susceptibles a oxitetraciclina debido a que no se observa crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico, Moreno (2012) evaluó la susceptibilidad de las cepas aisladas de *Lactobacillus sp* frente al antibiótico Trimetoprim Sulfametaxona, obteniendo como resultado las cepas fueron sensibles a este antibiótico.

De igual manera Jurado *et al.* (2009) evaluaron cepas de *Lactobacillus sp.* ante oxitetraciclina las cepas se observaron sensibles, la sensibilidad de las cepas podría depender de la resistencia a ciertas concentraciones de antibióticos, debido a la presencia de algunos plásmidos, o a propiedades particulares de la pared y membrana de estos microorganismos haciéndolos impermeables a antibióticos.

Los resultados también coinciden con los de Rodríguez (2009) Apoyados por la definición del genero *Lactobacillus* en el Bergey Manual of Systematic

Bacteriology en el que destaca que las cepas *Lactobacillus* son sensibles a la mayoría de los antibióticos de elección en terapias humanas y veterinarias.

Según Alvarado *et al.*, (2007) la capacidad de *Lactobacillus* de resistir a algunos antibióticos dependen mucho de cada cepa y la concentración de antibiótico utilizada. La resistencia está relacionada con la presencia de algunos plásmidos en estos microorganismos, aunque también hay evidencia que esa resistencia pueden deberse a propiedades particulares de la pared y membrana de esos microorganismos que los hacen impermeables a los antibióticos La adquisición de estos plásmidos depende de la presión selectiva a la que hayan sido sometidas las bacterias debido a la presencia de los antibióticos en su hábitat.

V. CONCLUSIONES

Se identificaron especies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* por medio de pruebas de fermentación de carbohidratos.

Las cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* presentaron resistencias a niveles bajos de pH y mostraron antagonismo al enfrentarlas a las cepa bacteriana *E. coli* ATTC 25922 y *Salmonella sp.*, mostrando halos de inhibición que son indicadores de acción antimicrobiana sobre el crecimiento de los patógenos.

Las especies aisladas de *L. casei* y *L. brevis* reflejaron sensibilidad a los antibiótico Trimetropin-sulfametazona y Oxitetraciclina.

VI. RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos en el laboratorio sobre el efecto probiótico que poseen las especies *Lactobacillus* identificadas se sugiere realizar estudios in vivo, para evaluar la microbiota intestinal y digestibilidad del alimento por parte del animal.

Debido al efecto antagónico que tienen las especies *Lactobacillus* sobre *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp* se sugiere aplicar las especies *Lactobacillus* en terapias anti -diarreicas en conjunto con antibióticos como Trimetropim Sulfametaxona.

VII. LITERATURA CITADA

- Alvarado Rivas, C; Chacón Rueda, Z; Otoniel Rojas, J; Guerrero Cárdenas, B; López Corcuera, G. (2007). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas de un Queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su Uso Como Cultivo Iniciador. *Revista Científica*. (17) (3) 301-308.
- Amorocho Cruz, C. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra. (Tesis Doctoral) Valencia, España. Universidad politécnica de valencia. NI 253.
- Arellano Arriaga, A. (2013). Evaluación del proceso y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Querétaro. Querétaro, México. NI 109
- Bazán, J; Vargas, C. (2017). Aislamiento de Lactobacillus nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. *Ciencia & desarrollo*. (11) (1) 61-66.
- Benítez López, C. (2015). Efecto in vitro del sobrenadante del cultivo de lactobacillus sp aislados de leche materna, sobre el crecimiento de staphylococcus aureus, escherichia coli y salmonella sp. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. NI 56
- Carr, F; Don, C; Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. (28) (4) 281-370.
- Centró Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR). (2004) *Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica*. (pp.273-297). Managua, Nicaragua.
- Charteris, P; Kelly, M; Morelli, L; Collins, K. 1998. Development and application of an in vitromethodology to determine the transit toleran-ce of potencially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* (84) (1) 759-768.
- Collins, M; Phillips, B; Zandoni, P. (1989). Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei sp. nov., subsp. paracasei and subsp. tolerans, and Lactobacillus rhamnosus sp. nov., comb. Nov. *International journal of systematic bacteriology*.(39) (2) 105-108.
- Ferreira Barbosa, F; Jardim de Lima Barbosa, L; Silva Bambirra, L; Figueira Aburjaile, F. (2011). Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, (11) (1), 1-10.
- Fujisaka, F; Holmann, M; Peters, A; Schmidt, D; White, C; Burgos, J; Ordoñez, M; Mena, M; Posas, H; Cruz, C; Hincapié, B. (2005). Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua.

- Gaitan Vaca, D. (2013). Aislamiento y evaluación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- García Franco, A. (2016). Aislamiento, caracterización y determinación del potencial probiótico de bacterias lácticas de pollos. (Tesis de pregrado). Universidad nacional del centro de buenos aires. Buenos aires, Argentina.
- García, M; López, Y; Carcasses, A. (2012) Empleo de probióticos en los animales.
- Giraldo Carmona, J; Narváez Solarte, W; Díaz López, E. (2015). Probiotico en cerdos: resultados contradictorios. *Revista Biosalud*. (14) (1) 81-90.
- Gutiérrez Y. 2012. Universidad nacional agraria MODULO PRACTICO: Técnicas de laboratorio. Managua. Nicaragua. 1° Edición, 2012. 61p.
- INETER. (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales). 2010. Estación Meteorológica del Aeropuerto Internacional Augusto Cesar Sandino, Managua, NI.
- Jurado, H; Aguirre, D; Ramírez, C. (2009). Caracterización de bacterias probiótica aisladas del intestino grueso de cerdos Como alternativa al uso de antibióticos. *Rev.MVZ Córdoba*. (14) (2) 1723-1735.
- Lara Villoslada, F; Saleta, S; Días Roperero, M; Rodriguez, J; Xaus, J; Olivares, M. (2009). Safety Assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Dairy Research*. (76)(1) 216-221.
- León Reissig, M. (2012). Evaluación in vitro de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Nativas con Potencial Probiotico. (Tesis de pregrado). Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay.
- Lozano, M; arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista colombiana de ciencias pecuaria*. (21) (1) 121-135.
- Madigan, M; Maetinko, J; Parker, j. (2004). Biología de los Microorganismos.
- Mantilla, C; Burgos, A. (2012). Potencial probiotico de cepas nativas para uso como aditivos En la alimentación avícola. *Revista colombiana biotecnológica*. (14)(1) 31-40.
- Moreno Galarza, L. (2012). Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. (Tesis de Magister en Ciencias-Microbiología). Bogotá, Colombia. Universidad nacional de Colombia. NI 93.
- Rodriguez González, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del genero *Lactobacillus* con capacidad probiotica e inmunomodadora. (Tesis Doctoral). Barcelona, España. Universidad autónoma de Barcelona. NI 199.

- Rodríguez, O; Perea, J; Martín, Y; Fernández, M; Padrón, I; Núñez de Villavicencio, M. (2008). Evaluación in vitro de resistencia de bacterias lácticas a la barrera gástrica y biliar de cerditos y a enterobacterias patógenas. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* (15) (3) 277-271.
- Rondón, A.; Samaniego, M.; Bocourt, R.; Rodríguez, S.; Milián, G.; Ranilla, M.; Laurencio, M.; Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de lactobacillus sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Somenta*. (6)(1) 56-63.
- Ronka, E; Malinen, E; Saarela, M; Rinta-koski, M; Aarnikunnas, J; Palva, A. (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*. (83) (1) 63–74.
- Sánchez, L; Vichi, J; Llanes, M; Castro, E; Soler, D; Espinosa, I; Kociubinski, G; Ferreira, C. (2011). Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. Como candidato a probióticas. *Revista de Salud Animal*, (33) (3), 154-160.
- Servin, A; Coconnier, M. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. (17) (5) 741–754.
- Thornsberry, C. (1983). NCCLS Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests. *Laboratory medicine*. (14) (9). 549-553.
- Velásquez Téllez, J; Giraldo Giraldo, G; Padilla Sanabria, L; Giraldo Castaño, Y. (2015). Crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 en suero clarificado. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. (13) (1) 19-27.
- Vijayakumar, J; Aravindan, R; Viruthagiri, T. (2007). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. (22) (2) 245–264.
- Vives Noguera, R. (2012). Suplementación estratégica y mejoramiento de la alimentación en época de verano. (Tesis de pregrado). Antioquia, Colombia. Corporación Universitaria la Sallista. NI 102
- Waki, N; Matsumoto, M; Fukui, y; Suganuma, H. (2014). Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among schoolchildren: an open-label pilot study. *Letters in Applied Microbiology*. (59)(1) 565-571.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Resultados del crecimiento de especies de en diferentes medios de cultivo y temperatura

Aislado	GRAM	Crecimiento			Acido			Nacl	Genero	Especies
		45°	Lac	Sac	Man	Sorb	Xil			
1	Gram +	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i>
3	Gram +	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>	NI
4	Gram -	-	-	+	+	+	+	-	-----	-----
7	Gram +	-	-	+	-	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>	NI
9	Gram -	-	+	+	+	+	+	+	-----	-----
10	Bacillus	-	-	-	+	-	+	-	<i>Bacillus</i>	
1B	Gram +	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i>
2B	Gram +	-	+	+	+	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.brevis</i>
3B	Gram +	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i>
4B	Gram +	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.casei</i>

NI: No Identificado, (Lac): lactosa, (Sac):sacarosa, (Man):manitol, (Sorb):sorbitol, (Xil):xilosa.

Anexo 2. Características de crecimiento de especies de *Lactobacillus* en diferentes medios de cultivos

Especies	Crecimiento a 45° C	Acido de					Crecimiento en caldo 4% Nacl
		lactosa	sacarosa	manitol	sorbitol	xilosa	
<i>L.acidophilus</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>L.bulgaricus</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>L.casei</i>	V	+/-	+/-	+	+	-	+
<i>L.plantarum</i>	V	+	+	+	-		+
<i>L.delbruckii</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>L.leichmanii</i>	+	+/-	+	+	-	-	-
<i>L.brevis</i>	-	+/-	+	+/-	-	+	+
<i>L. fermenti</i>	+	+	+/-	-	-	+/-	-

(+): Si hay crecimiento bacteriano, (-): No hay crecimiento bacteriano, (V): El crecimiento bacteriano es variable
fuente: Bazán 2008