

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Producción y evaluación de inóculos lácteos con bacterias ácido lácticas probióticas obtenidas del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) para alimentación porcina.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL

DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

Autora: Carmen Elizabeth Rojas Mogollón

TUMBES, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Producción y evaluación de inóculos lácteos con bacterias ácido lácticas probióticas obtenidas del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) para alimentación porcina.

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Mg. Yuri Iván Mendoza Garay

Mg. Dorian Yasser Aguirre Campos

Mg. Víctor Santos Guzmán Tripul

TUMBES, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Producción y evaluación de inóculos lácteos con bacterias ácido lácticas probióticas obtenidas del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) para alimentación porcina.

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma.

Br. Carmen Elizabeth Rojas Mogollón (Autor)

Dr. Ing. Héctor Sánchez Suárez (Asesor)

Mblgo. Rubén Alfaro Aguilera (Co-Asesor)

TUMBES, 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA



“AÑO DE LA UNIDAD, LA PAZ Y EL DESARROLLO”

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los diecisiete (17) días del mes de enero del dos mil veintitrés, siendo las Once (11)..... horas y Ocho (08)..... minutos, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, se reunieron el Jurado Calificador, ratificado por **Resolución N° 041-2017/UNTUMBES-FCA**, conformado por Mg. YURI IVAN MENDOZA GARAY (Presidente), Mg. DORIAN YASSER AGUIRRE CAMPOS (Secretario) y Mg. VICTOR SANTOS GUZMAN TRIPUL (Vocal), reconociendo en la misma resolución al Dr. HÉCTOR SANCHEZ SUAREZ como asesor y como co-asesor al Mblgo. RUBEN HERNÁN ALFARO AGUILERA, se procedió a evaluar, deliberar y calificar la sustentación de la tesis titulada: **“Producción y evaluación de inóculos lácteos con bacterias ácido lácticas probióticas obtenidas del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) para alimentación porcina”** para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por la **Br. ROJAS MOGOLLON CARMEN ELIZABETH**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas por parte de la sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara a la **Br. ROJAS MOGOLLON CARMEN ELIZABETH** con calificativo Aprobado - Muy Bueno.

Se hace conocer a la sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica.

En consecuencia, queda APTA para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Agroindustrial, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las doce (12)..... horas y diez (10)..... minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, en forma presencial, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 17 de enero del 2023

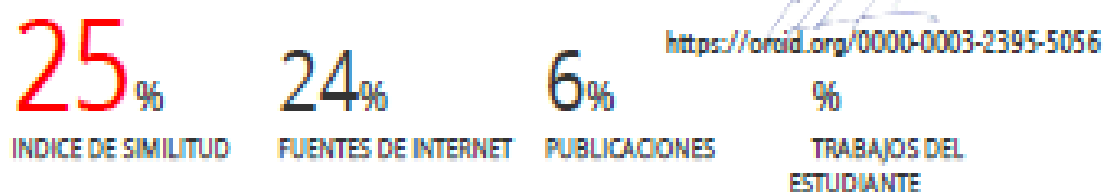
Mg. YURI IVAN MENDOZA GARAY
DNI N° 09330173
Presidente

Mg. DORIAN YASSER AGUIRRE CAMPOS
DNI N° 40442207
Secretario

Mg. VICTOR SANTOS GUZMAN TRIPUL
DNI N° 18090530
Vocal

Producción y evaluación de inóculos lácteos con bacterias ácido lácticas probióticas obtenidas del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) para alimentación porcina

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	cienciaspecuarias.inifap.gob.mx Fuente de Internet	6%
2	eciperu.net Fuente de Internet	3%
3	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	docplayer.es Fuente de Internet	2%
5	erp.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	2%
6	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
7	cybertesis.uach.cl Fuente de Internet	1%
8	repositorio.unicartagena.edu.co Fuente de Internet	1%

9	repositorio.unajma.edu.pe Fuente de Internet	1 %
10	1library.co Fuente de Internet	1 %
11	ri.uaq.mx Fuente de Internet	1 %
12	www.tandfonline.com Fuente de Internet	1 %
13	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
14	myslide.es Fuente de Internet	<1 %
15	downloads.hindawi.com Fuente de Internet	<1 %
16	revistacta.agrosavia.co Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.uaaan.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
18	santiagofiallosmedicina.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.upec.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
20	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %

21	edoc.pub Fuente de Internet	<1 %
22	www.archivos.ujat.mx Fuente de Internet	<1 %
23	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
24	www.sian.inia.gob.ve Fuente de Internet	<1 %
25	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
26	bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080 Fuente de Internet	<1 %
27	revistas.unicordoba.edu.co Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
30	digibug.ugr.es Fuente de Internet	<1 %
31	A. J. Rondón, L. M. Samaniego, R. Bocourt, S. Rodríguez, G. Milián, M. J. Ranilla, M. Laurencio, M. Pérez. " AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	<1 %

PARCIAL DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE *sp.* PROCEDENTES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS DE CEBA ISOLATION, IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC PROPERTIES OF *sp.* STRAINS OBTAINED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS ", Ciencia y Tecnología Alimentaria, 2008
Publicación

32	www.biblioteca.cij.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
33	nepis.epa.gov Fuente de Internet	<1 %
34	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
35	repo.sibdi.ucr.ac.cr:8080 Fuente de Internet	<1 %
36	vsip.info Fuente de Internet	<1 %
37	Wendy Elizabeth Castillo García, Héctor Alfredo Sánchez Suárez, Gloria María Ochoa Mogollón. "Evaluación del ensilado de residuos de pescado y de cabeza de langostino fermentado con <i>Lactobacillus fermentus</i> aislado de cerdo", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2020 Publicación	<1 %

38	repositorio.ute.edu.ec	<1 %
	Fuente de Internet	
39	www.arconic.com	<1 %
	Fuente de Internet	
40	aprenderly.com	<1 %
	Fuente de Internet	
41	documentop.com	<1 %
	Fuente de Internet	
42	repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx	<1 %
	Fuente de Internet	

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

A Dios por brindarme vida, salud y sabiduría. Por darme una hermosa familia, amigos y maestros que me han ayudado y dado buenos consejos para crecer profesionalmente.

A mi familia, en especial a mis padres y hermanas (os) por ser quienes me apoyaron en todo momento, por los consejos y el gran amor que me brindan en la vida, permitiéndome de esta manera seguir formándome como profesional. Mis éxitos siempre serán para ellos.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores Dr. Ing. Héctor Sánchez Suárez y Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera, maestros que se convirtieron en amigos, que compartieron sus enseñanzas y sabidurías, dándome la oportunidad de formar parte del proyecto que me permitió ejecutar esta investigación, motivándome así el amor a la ciencia y la investigación.

A mis queridos amigos Wendy, Gresia, Flor y Andy quienes incorporaron su granito de arena directa e indirectamente en la ejecución de esta tesis.

A mi Universidad Nacional de Tumbes por ser mi segundo hogar, gracias por todo lo realizado, vivido y logrado.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	3
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	5
2.1. EL CERDO.....	5
2.1.1. Características.....	5
2.1.2. Lechón.....	5
2.2. PROBIÓTICOS.....	6
2.2.1. Los probióticos en animales de abasto.....	7
2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	8
2.3.1. Clasificación de las BAL.....	8
2.3.2. Características fermentativas de BAL.....	9
2.4. TÉCNICAS Y MÉTODOS DE AISLAMIENTO.....	9
2.4.1. Medios de cultivos.....	10
a. Los medios líquidos.....	10
b. Los medios sólidos.....	10
2.4.2. Métodos de siembra.....	11
a. Siembra por agotamiento en placa de Petri.....	11
b. Siembra en tubos.....	11
2.4.3. Interpretación de los cultivos.....	12
2.5. OBSERVACIÓN Y TINCIÓN BACTERIANAS.....	13
2.5.1. Tinción Gram.....	13
2.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.....	14
2.6.1. Prueba de oxidasa.....	14
2.6.2. Prueba de catalasa.....	14
2.6.3. Producción de gas.....	14
2.6.4. Resistencia a pH bajos, sales biliares, Tolerancia a concentraciones altas de NaCl.....	15
2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL GEN 16S ARNr.....	15
2.7.1. Extracción de ADN.....	15
2.7.2. Amplificación por PCR.....	16
2.7.3. Electroforesis en gel agarosa.....	16
2.7.4. Secuenciación de ADN.....	17
2.8. INÓCULO LÁCTEO (YOGUR).....	17
2.8.1. Propiedades físico-químicas.....	17

2.9. ANTECEDENTES	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. TIPO DE ESTUDIO	21
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	21
3.3. MATERIALES, EQUIPOS, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	21
3.3.1. Materiales de laboratorio	21
3.3.2. Medios de cultivos y reactivos	22
3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
3.4.1. Método de investigación	23
3.4.2. Obtención de la muestra	24
3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	25
3.5.1. Recolección de muestras de bacterias BAL	25
3.5.2. Análisis bioquímicos	26
3.6. Actividad inhibitoria en microorganismos patógenos	28
3.6.1. Método directo o capa doble	28
3.6.2. Método de pocillo.....	28
3.7. ANÁLISIS MOLECULAR.....	29
3.7.1. Extracción de ADN.	29
3.7.2. PCR (Reacción en cadena polimerasa).	30
3.7.3. Electroforesis.	31
3.7.4. Secuenciación de los productos de la PCR.	31
3.8. ELABORACIÓN DEL INÓCULO LÁCTEO.	31
3.8.1. Recepción de leche fresca	32
3.8.2. Homogenización	32
3.8.3. Pasteurización.....	33
3.8.4. Enfriamiento de incubación	33
3.8.5. Preparación del inóculo lácteo	33
3.8.6. Análisis químicos del inóculo lácteo	34
3.8.7. Análisis microbiológico del inóculo lácteo	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	36
4.1.1. Evaluación de muestras patógenas en lechones	37
4.1.2. Interpretación de los cultivos bacterianos	38
4.1.3. Tinciones bacterianas	39

4.2. EVALUACIÓN DE LOS ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....	41
4.2.1. Prueba de oxidasa, peróxido de hidrógeno y generación de gas.....	41
4.2.2. Resistencia a pH bajo	43
4.2.3. Tolerancia a sales biliares.....	45
4.2.4. Tolerancias a altas concentraciones de NaCl	47
4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS.....	49
4.3.1. Método de capa doble: visualizar la inhibición.....	49
4.3.2. Método directo o por contacto.....	50
4.3.3. Método de pocillo.....	50
4.4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS MOLECULAR	52
4.4.1. Secuenciación de ADN.....	52
4.5. EVALUACIÓN DEL INÓCULO LÁCTEO	57
4.5.1. Evaluación físico-química (pH y acidez)	57
4.5.2. Evaluación físico-química (Sinéresis)	58
4.5.3. Evaluación microbiológica.....	59
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultados promedios en evaluación inicial de las muestras por diluciones de 10^{-1} al 10^{-5} para verificación y recuento de BAL.	34
Gráfico 2: El recuento inicial de cepas BAL en caldo MRS ajustados a diferentes concentraciones de pH.	41
Gráfico 3: El recuento final de cepas BAL en caldo MRS ajustados a diferentes concentraciones de pH.	42
Gráfico 4: El crecimiento de las cepas BAL en distintas concentraciones de Ox-Bile, se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) antes de la incubación por 12 horas.	43
Gráfico 5: Cepas BAL evaluadas y seleccionadas demostraron nuevamente sobrevivir a 1 y 5% de sales biliares.	44
Gráfico 6: Recuento inicial de cepas BAL en caldo MRS a diferentes concentraciones de NaCl.	45
Gráfico 7: Resistencia y viabilidad de cepas BAL incubadas a 37°C por 24 horas en caldo MRS en NaCl de 5, 9 y 13%.	46
Gráfico 8: La lectura del grado de antagonismo se realizó midiendo el diámetro de los halos en mm. La cepa 05 presentó mayor poder de inhibición frente a las cepas patógenas (A) y (B), seguido por la cepa 06, 07, 02 y 01.	48

ÍNDICE DE DIAGRAMA

Diagrama 1: Obtención de bacterias ácido lácticas de la parte final del tracto digestivo de lechones.	20
Diagrama 2: Proceso de elaboración y evaluación del inóculo lácteo.	30

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1: Toma de muestras de la parte final del lechón	21
Figura 2: a) Muestras b) selección de cepas ácidos lácticas con agar MRS y azul de anilina c) aislamiento secuencial de las BAL para su purificación.	34
Figura 3: Identificación de colonias con coloración verdosa y brillo metálico del género <i>Escherichia</i> (A). Se aisló y conservó en tubos con agar inclinado.	35
Figura 4: Agar SS permitió el desarrollo de bacterias patógenas de colonias incoloras del género <i>Shigella</i> (B). Se aisló y conservó en tubos con agar inclinado.	35
Figura 5: Identificación del grupo de bacterias al cual pertenecen “Gram positivas”. Uno de los tipos de bacteria encontrados “bacilos”.	38
Figura 6: Observación a través del microscopio, equipo de gran importancia en la identificación de BAL.	38
Figura 7: Reacción negativa de la prueba oxidasa, al no cambiar el color de la masa bacteriana.	40
Figura 8: Reacción negativa en la mayoría de las cepas. A excepción de la cepa 03 que se detectó formación de gas.	40
Figura 9: Las cepas BAL no deben de producir CO ₂ .	40
Figura 10: Crecimiento y resistencia de BAL en caldo MRS con pH 4.5 después de las 12 horas de incubación a 37°C.	42

- Figura 11:** Concentración de BAL (DO₁) e inoculación a diferentes concentraciones de sales biliares. 43
- Figura 12:** Recuento de UFC de BAL en un medio de cultivo MRS con sales biliares después de las 12 horas de incubación a 37°C. 44
- Figura 13:** La cepa 02 no demostró resistencia al caldo MRS en altas concentraciones de NaCl al 9 y 13%. 46
- Figura 14:** Las cepas 02 y 05 mostraron visualmente tener mayor inhibición contra las patógenas de *Shigella flexneri* (B) y *Escherichia fergusonii* (A). Induciendo al inicio que las cepas patógenas conservadas podrían ser *Salmonella* y *E. coli*, por la observación de las colonias obtenidas al inicio de la investigación. 47
- Figura 15:** a) Efecto inhibitorio de los sobrenadantes acidificados por la producción de ácidos orgánicos. b) sobrenadantes neutralizados con HCL no forma ningún efecto inhibitorio contra los patógenos. 49
- Figura 16:** Preparación de materiales para pruebas bioquímicas a) pH bajos b) sales biliares c) cloruro de sodio d) caldo MRS esterilizados con diferentes insumos. 71
- Figura 17:** a y b) Concentración de cepas BAL cultivadas en caldo MRS c) medición del crecimiento de BAL por densidad óptica d) cepas viables capaces de resistir las barreras gastrointestinales. 71
- Figura 18:** Evaluación de la actividad inhibitoria a) método directo o capa doble b) evaluación del pH sin neutralizar y neutralizado c) centrifugación para obtener los sobrenadantes d) incorporación de sobrenadantes para el enfrentamiento con microorganismos patógenos. 72
- Figura 19:** Extracción de ADN a) reactivos empleados b) obtención de masa bacteriológica 25-30 mg c) adición de solución lisis DTAB d) incorporación de cloroformo HPLC. 72
- Figura 20:** e) adición de solución precipitante CTAB, para obtención del pellet ADN, solución disolvente NaCl y solución de lavado f) deshumedecer el pellet g) resuspensión con agua ultrapurificada h) ADN extraído y conservado a - 20 °C. 73
- Figura 21:** a) amplificación de ADN por termociclador b) migración de ADN en gel agarosa por electroforesis c) inmersión del gel en bromuro de etidio d) verificación del ADN bacteriano por transiluminador UV. 73
- Figura 22:** Elaboración de inóculo lácteo a) activación y concentración de cepas BAL b) inoculación de las BAL en leche pasteurizada c) incubación a 37°C de

solución madre d) inoculación e incubación de las soluciones madres en recipientes de 500 ml de leche. 74

Figura 23: Evaluaciones físico-químicas a) medición de pH b) medición de los grados de acidez c) centrifugación para evaluar el grado de sinéresis d) medición de la pérdida de retención de agua y sus componentes (sinéresis). 74

Figura 24: Evaluación microbiológica del inóculo lácteo, verificación y recuento de cepas BAL viables. 75

Figura 25: Producto terminado para la administración oral de inóculos lácteos con cepas probióticas BAL en lechones. 75

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

µL	:	microlitros
ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ARN _r	:	ácido ribonucleico ribosomal
BAL	:	bacterias ácido lácticas
CO ₂	:	dióxido de carbono
CTAB	:	cetiltrimetilamonio y bromuro
dNTP _s	:	desoxinucleótidos trifosfato
DTAB	:	dodeciltrimetilamonio y bromuro
EMB	:	eosina y azul de metileno
g	:	gramo
H ₂ O ₂	:	peróxido de hidrógeno
IDF	:	Federación Internacional de Lechería
M	:	molaridad
mg	:	miligramo
MgCl ₂	:	cloruro de magnesio
ml	:	mililitro
mM	:	milimolar
MRS	:	de Man, Rogosa y Sharpe
N	:	normalidad
nm	:	nanómetro
NTP	:	Norma Técnica Peruana

p/p	:	peso/peso
p/v	:	peso/volumen
pb	:	pares de base
PCR	:	reacción en cadena polimerasa
rpm	:	revoluciones por minuto
SS	:	Salmonella-Shigella
TAE	:	Tris-Ácido acético-EDTA
TSB	:	Caldo tripteína soya
UFC	:	unidades formadoras de colonia
UVA	:	radiación ultravioleta
V	:	voltios

RESUMEN

El uso de BAL son utilizadas por muchos años en la industria de alimentos, inhibe microorganismos patógenos y prevalecen en la flora intestinal. En la línea de producción cárnica son utilizados en los lechones con base a su alimentación para disminuir el uso de antibióticos, favoreciendo la salud del animal y reduciendo costos de producción, ofreciendo una mayor seguridad e inocuidad a los consumidores de esta carne y sus derivados. Es por ello que esta investigación tuvo por objetivo la preparación y evaluación del inóculo lácteo a partir de bacterias ácido lácticas extraídas de del tracto digestivo del lechón. Se aisló 10 bacterias de la parte final del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) que fueron evaluadas morfológicamente como BAL. Se evaluó su capacidad probióticas mediante pruebas en resistencia a pH bajos, sales biliares y tolerancia a NaCl. Además, en las pruebas de antagonismo solo 05 cepas bacterianas mostraron capacidad inhibitoria probada contra bacterias patógenas nativas extraídas del lechón (*Escherichia fergusonii* y *Shigella flexneri*). En la identificación molecular de bacterias, se encontró similitud genética para 01 *Lactobacillus reuteri* y 04 *Enterococcus faecium*, ambas relacionadas al beneficio de la industria agroalimentaria. En la elaboración del inóculo lácteo (yogur), se realizó la incorporación de las cepas probióticas combinadas en dos recipientes con 500 ml de leche de vaca y sin edulcorar. La evaluación del inóculo lácteo se realizó cada 05 días durante su almacenamiento en refrigeración por 15 días, se evaluó el pH, se evidenció un incremento sinéresis durante todo el almacenamiento de ambos recipientes debido a la pérdida de estabilidad y retención de agua como también por falta de sólidos solubles. La viabilidad de las BAL mantuvo un recuento adecuado al método ISO 7889:2003 (IDF 117:2003), pues contenían 10^7 UFC cultivables siendo capaces de mantener esa característica durante la vigencia del producto elaborado.

Palabras claves: lechones, BAL, probióticas, inóculo lácteo.

ABSTRACT

The use of BAL has been used for many years in the food industry, it inhibits pathogenic microorganisms and prevails in the intestinal flora. In the meat production line, they are used in piglets based on their diet to reduce the use of antibiotics, favoring the health of the animal and reducing production costs, offering greater safety and innocuousness to consumers of this meat and its derivatives. That is why this research aimed at the preparation and evaluation of dairy inocula from lactic acid bacteria extracted from the digestive tract of the piglet. 10 bacteria were isolated from the final part of the digestive tract of piglet (*Sus scrofa domestica*) that were morphologically evaluated as BALs. Its probiotic capacity was evaluated through tests on resistance to low pH, bile salts and tolerance to NaCl. In addition, in the antagonism tests, only 05 bacterial strains showed proven inhibitory capacity against native pathogenic bacteria extracted from the piglet (*Escherichia fergusonii* and *Shigella flexneri*). In the molecular identification of bacteria, genetic similarity was found for 01 *Lactobacillus reuteri* and 04 *Enterococcus faecium*, both related to the benefit of the agri-food industry. In the elaboration of the dairy inoculum (yogurt), the combined probiotic strains were incorporated in two containers with 500 ml of cow's milk and without sweetening. The evaluation of the dairy inoculum was performed every 05 days during its storage in refrigeration for 15 days, the parameters of acidity increased as the pH decreased while the second container the acidity increased slowly, an increase syneresis was observed during the storage of both containers due to loss of stability and water retention as well as lack of soluble solids. The viability of the BAL maintained an adequate count to the ISO 7889: 2003 method (IDF 117: 2003), since they contained 10⁷ cultivable CFU, being able to maintain that characteristic during the validity of the elaborated product.

Keywords: piglets, BAL, probiotics, dairy inoculum.

INTRODUCCIÓN

El lechón está expuesto a diferentes microorganismos productores de enfermedad presentes en la granja. La fuente para todas estas infecciones es de forma ocasional a partir de la madre, pero más frecuentemente lo son otros lechones enfermos o lechones un poco mayores que si bien están aparentemente sanos, se infectaron a medida que los anticuerpos maternos fueron desapareciendo. Además, se observan dificultades desde el punto de vista anatómico-fisiológico; es decir, los lechones al nacer presentan un sistema digestivo poco desarrollado. Así tenemos, que durante las primeras dos o tres semanas de vida, el patrón de producción de enzimas digestivas está adaptado para digerir exclusivamente la leche materna y este al ausentarse genera un desequilibrio microbiológico.

Los factores que rompen el equilibrio microbiológico en los lechones, favoreciendo la proliferación de enteropatógenos y la generación de síndrome diarreico, están relacionados con el destete, la baja inmunidad y la exposición a una gran cantidad de antígenos presentes en bacterias patógenas, el cambio de la alimentación láctea a la iniciación compleja de alimentos sólidos, el estrés y las inyecciones.

Para tal caso el uso de probióticos en la nutrición del cerdo, es un aditivo natural que la biotecnología ha puesto al alcance del porcicultor. Para que una bacteria probiótica sea efectiva, es necesario que esta sea un habitante normal del intestino, que tenga periodo corto de regeneración, que produzca sustancias antimicrobianas y resistencia a duros manejos de manufacturación de los alimentos balanceados; con el fin de mejorar el equilibrio de la población microbiana existente en el tracto digestivo.

Para el sector de cárnicos, en industrias agroalimentarias, se tuvo como objetivo elaborar y producir un inóculo lácteo con microorganismos nativos BAL de la parte final del tracto digestivo del lechón utilizándolo al beneficio de un buen

rendimiento de producción cárnica y sus derivados; comenzado a marcar tendencias sobre el consumo de alimentos saludables.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. EL CERDO

El cerdo (*Sus scrofa domesticus*), “es una especie animal cuyas propiedades han sido consideradas por el hombre desde tiempos inmemorables. Se cree que es una de las especies con mayor potencial carnívoros, siendo la más consumida en el mundo. Llegó a América proveniente de España en el segundo viaje de Cristóbal Colón, especialmente en la conquista y se afirma que la raza de dichos animales era en la denominada raza Ibérica” (Padilla, 2006).

2.1.1. Características

El animal adulto tiene un cuerpo pesado, redondeado; hocico largo, flexible; patas cortas con pezuñas y una cola corta. La piel del cerdo es gruesa pero sensible, está cubierta en parte de ásperas cerdas, exhibe una amplia variedad de colores y dibujos (Quemac, 2014).

“Los cerdos están adaptados y desarrollados para la producción de carne, dado que crecen y maduran con rapidez, tienen un periodo de gestación corto de unos 114 días, pueden tener camadas muy numerosas. Son omnívoros y consumen una gran variedad de alimentos. Como fuente de alimento los cereales, como el maíz, el sorgo y las leguminosas, como la carne de soya” (Quemac, 2014).

2.1.2. Lechón

Los lechones en el momento del nacimiento presentan un intervalo de neutralidad térmica muy estrecho, con una temperatura crítica inferior muy alta, de aproximadamente 32-35°C (Quiles, 2004). “Cuando el lechón nace en un ambiente

cuya temperatura está por debajo de dicho rango, tendrá que utilizar energía adicional para mantenerse caliente, de manera que en el mejor de los casos dejará de crecer y en el peor, consumirá rápidamente sus reservas energéticas, lo que pondrá en peligro su vida” (Quiles, 2004; Uribe, 1998).

Los lechones “al nacer quedan expuestos a los microorganismos del ambiente que les rodea y además entran en contacto con las heces maternas que contienen bacterias que colonizan su tracto digestivo. Estas bacterias buscan un nicho adecuado, donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa la microflora intestinal normal del lechón. No obstante, esta estabilidad puede ser alterada por cambios dietéticos o ambientales importantes” (Radecki et al., 1991; Conway, 1994; Jensen, 1998).

2.2. PROBIÓTICOS.

Son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino (Fuller, 1989).

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. “Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Penna, 1998). “Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino” (Pardio et al., 1994). Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino.

El efecto protector de estos microorganismos “se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la

producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmunomodulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos” (Penna, 1998).

2.2.1. Los probióticos en animales de abasto

En la producción animal, la importancia de los probióticos en cuanto a su uso en la alimentación de los animales de granja se basa en las propiedades que se les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento, (Dilworth y Day, 1978; Miles et al., 1981; Mordenti, 1986). “El resultado del estrés que el animal sufre a temprana edad en los sistemas de crianza es debido a la contaminación ambiental de bacterias patógenas y no patógenas que colonizan el intestino. De esta forma se crea una exclusión competitiva que determina el establecimiento de microorganismos y estos, una vez instalados, generan mediante la producción de metabolitos, un ambiente que resulta tóxicos para el microorganismo competente” (Fox, 1988; Miles, 1993).

La composición y el metabolismo de la microbiota intestinal afectan el desarrollo de los animales de granja de diferentes formas, en especial a los animales jóvenes que están sometidos al estrés ambiental (Kurzak et al., 1998). “Este efecto es producido mediante tres mecanismos: la competencia por nichos específicos en la mucosa intestinal, los nutrientes y la producción de compuestos bactericidas o bacteriostáticos” (Fuller, 1989; Blum et al., 1999).

Para obtener una exclusión de patógenos es importante diferenciar los microorganismos que se adaptan mejor a cada segmento intestinal (Miles, 1993). “En el caso particular de exclusión de *Salmonella*, microorganismo que causa serios problemas y pérdidas a los productores, se ha relacionado con competencia por los sitios de adhesión a la pared intestinal, mecanismo que tiene especial importancia en la patogenicidad debido a que la adhesión es el primer paso en el proceso de infección” (Lloyd et al., 1977).

Por otra parte, el suministro de nutrientes seleccionados llamados genéricamente prebióticos, puede ayudar al establecimiento de la microbiota benéfica debido a que son utilizados por los microorganismos y no por el hospedero (Millerman et al., 1980).

2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) “son un nuevo grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos y producen ácido láctico como el único principal producto de la fermentación de carbohidratos” (Carr et al., 2002; Vázquez et al., 2009).

Además, las BAL “son ácidos tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de 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 aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos” (Carr et al., 2002).

Para su multiplicación “requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es un medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne” (Vázquez et al., 2009).

2.3.1. Clasificación de las BAL

En géneros diferentes está basada en principio en la morfología, “modo de fermentación en la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el

crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*” (Axelsson, 1998; Carr et al., 2002). Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

2.3.2. Características fermentativas de BAL

Existen diversos géneros de BAL; sin embargo, “estas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Axelsson, 1998). Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía, 6-fosfogluconato-fosfocetosa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ “(Carr et al., 2002).

2.4. TÉCNICAS Y MÉTODOS DE AISLAMIENTO

Para efectuar el estudio de los microorganismos, se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones artificiales, en los que es posible cultivarlos bajo condiciones experimentales y manejar un solo tipo de microorganismo (Aguilar, 2012).

Cultivar un microorganismo significa “promover intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas. La población

de microorganismos desarrollada en un medio se denomina cultivo. Cuando éste contiene una sola especie de microorganismo, se denomina cultivo puro o axénico, cuando contiene más de una especie de microorganismos se denomina cultivo mixto” (Aguilar, 2012).

Los materiales utilizados para la transferencia de muestras microbianas son los siguientes: “Hisopo, pipeta (para uso microbiológico son terminales y la parte superior o boquilla debe estar protegida con filtro de algodón). En la transferencia de microorganismos se emplean agujas, asas de inoculación, hisopos, pipetas o pipetas Pasteur que deberán esterilizarse previamente. La utilización de estos dispositivos, así como de los diferentes medios de cultivo tiene aplicaciones específicas” (Aguilar, 2012).

2.4.1. Medios de cultivos

a. Los medios líquidos: “Un cultivo líquido puede ser transferido mediante un asa microbiológica, un hisopo, pipeta o pipeta Pasteur; el inóculo se deposita dentro del caldo o medio líquido. En este tipo de cultivos los microorganismos presentan un desarrollo particular que se manifiesta en la superficie o a través de todo el líquido. Una de las ventajas que presenta este tipo de cultivo se refiere a la posibilidad de agitarlos acelerando la velocidad de crecimiento de los microorganismos anaerobios, por otra parte, en este tipo de cultivos, las poblaciones se encuentran suspendidas y de fácil homogenización, lo que permite estandarizar la concentración del inóculo. La desventaja que presentan, es la dificultad para detectar contaminación a simple vista” (Aguilar, 2012).

b. Los medios sólidos: “Se preparan en tubos o matraces dependiendo de la cantidad o de las necesidades, después de esterilizarlos, estos se inclinan o vierten en cajas de Petri. La siembra se realiza con el asa, inoculando la superficie del agar con mucha suavidad; en estos medios, los microorganismos al multiplicarse forman agregados que se hacen visibles a simple vista; a estos agregados se les denominan colonias, las que presentan características que varían con el tipo de microorganismo cultivado y el medio de cultivo empleado. El crecimiento óptimo de los microorganismos se presenta a temperaturas que

la mayoría de las veces están relacionadas con la de su hábitat natural” (Aguilar, 2012).

En el estudio de cultivos bacterianos algunos de los criterios que se emplean para caracterizarlas incluyen: “tamaño, morfología celular, forma de agrupación, reacción a la tinción de Gram, formación de esporas, movilidad, presencia de inclusiones de reserva y características culturales en medios líquidos y sólidos en los que presentan patrones de desarrollo en cuanto a la forma, tamaño, elevación y color de las colonias” (Aguilar, 2012).

2.4.2. Métodos de siembra

a. Siembra por agotamiento en placa de Petri: “A partir del inóculo primario con un asa, se disemina el material en los cuatro cuadrantes de la placa, de esta forma se disemina sucesivamente el inóculo en estrías con un movimiento de arriba hacia abajo en cada cuadrante, dando vuelta la placa en ángulos de 90°C, además, el asa de debe esterilizar entre las sucesivas estrías. El propósito de esta técnica es diluir suficientemente el inóculo sobre la superficie del agar, con el fin de tener colonias bacterianas bien aisladas” (Botero et al., 2011).

b. Siembra en tubos: “Los medios se pueden distribuir en tubos, ya sea como en caldo en forma de agar. El agar puede ser semisólido, a fin de utilizarlo para las pruebas de movilidad, o sólidos que generalmente forman un plano inclinado. Los tubos con caldo se pueden inocular inclinando el tubo en un ángulo de aproximadamente 30° y se acerca el asa con el material a la superficie interior del tubo, cuando el tubo de cultivo se vuelve a la posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie” (Botero et al., 2011). Los tubos con agar en “pico de flauta” se inoculan primero atravesando el agar en profundidad y se continúa sembrando por estrías la parte inclinada desde abajo hacia arriba, con un movimiento en “S” (Botero et al., 2011).

2.4.3. Interpretación de los cultivos

Según (Botero et al., 2011), los cultivos primarios luego de 24 a 72 horas de incubación, requiere una considerable destreza. Partiendo de las observaciones iniciales. Esta evaluación se efectúa de la siguiente forma:

- Observando las características y cantidad relativa de cada tipo de colonia aislada en el agar.
- Determinando la pureza de las colonias, reacción de Gram y morfología de las bacterias de cada tipo de colonia.
- Observando los cambios en el medio que rodea a las colonias, que reflejan la actividad metabólica específica de las bacterias recuperadas.
- Características macroscópicas de las colonias: Esta se lleva a cabo usualmente mediante el examen visual del desarrollo en la superficie de las placas de agar.

Características de las colonias usadas en la identificación de las bacterias. Se incluye una serie de términos utilizados para describir las características macroscópicas de las colonias

- **Tamaño:** diámetro en mm.
- **Forma:** circular, regular, irregular, filamentosos
- **Elevación:** plana, elevada, convexa, monticular.
- **Margen (borde de la colonia):** entero, ondulación, lobulado, aserrado, filamentosos.
- **Color:** blanco, amarillo, negro, anaranjado, entre otros.
- **Densidad:** opaca, translúcida, transparente, entre otras.
- **Consistencia:** butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza” (Botero et al. 2011).

2.5. OBSERVACIÓN Y TINCIÓN BACTERIANAS

Debido al tamaño tan pequeño de la mayoría de los microorganismos se requiere de un microscopio óptimo. La observación de frotis teñidos es más recomendable, el cual se prepara haciendo una extensión de los microorganismos sobre una superficie transparente, en la cual se fijan y tiñen los microorganismos (Botero et al., 2011).

2.5.1. Tinción Gram

Desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. “La técnica sirve para diferenciar dos grandes grupos de bacterias. Gram positivas que se tiñen de azul o morado y Gram negativas que se tiñen de color rosado” (Botero et al., 2011).

“La tinción de Gram requiere de cuatro colorantes:

- Primer colorante: colorante básico que, en contacto con las células cargadas negativamente, reaccionan con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
- Solución mordiente: Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células: los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases.
- Agente decolorante: es un disolvente orgánico que se utiliza como lavado para eliminar colorante no fijado.
- Colorante de contraste: Colorante básico de distinto color y el más usado es la safranina. Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul o morado por el cristal violeta y no perderán esta coloración. Las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta y se teñirán de rosa debido a la safranina”.

2.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Para poder caracterizar bioquímicamente a las BAL que conforman un cultivo iniciador, “se cuenta con métodos de identificación basados inicialmente en sus características morfológicas tanto microscópicas como macroscópicas o coloniales, que se realizan a partir de aislamientos recomendados.

2.6.1. Prueba de oxidasa

Se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción de oxidasa se debe a un sistema de citocromo C-oxidasa que activa la oxidación reduciendo por el oxígeno molecular (MacFaddin et al., 2003). Se utilizan colorantes cromógenos que actúan como aceptadores artificiales de electrones que sustituyen de cierta manera al oxígeno usado por la bacteria. El reactivo basado en una disolución acuosa de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%, es el más común y recibe el nombre de reactivo de Kovac's.

2.6.2. Prueba de catalasa

Es una enzima que poseen la mayoría de bacterias aerobias. Descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva (MacFaddin et al., 2003).

2.6.3. Producción de gas

Las BAL no deben alterar las propiedades organolépticas, ni generar gases por parte de la cepa probiótica.

2.6.4. Resistencia a pH bajos, sales biliares, Tolerancia a concentraciones altas de NaCl

De acuerdo a (Tuomola et al., 2001), los resultados de estas pruebas pueden predecir la capacidad de las cepas para sobrevivir en condiciones de cultivo drásticos. Sin embargo, la demostración *in vivo* de la supervivencia a través del estómago humano o animal es más difícil de lograr. De ahí que, el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección de cepas que posean la capacidad de sobrevivir y adherirse a la mucosa intestinal.”

2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL GEN 16S ARNr

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos que se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer, 2004).

2.7.1. Extracción de ADN

Consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y “se basa en las características físico-químicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Timina y Citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal” (Alejos et al., 2004).

2.7.2. Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) “es un método in vitro de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN” (Mullis, 1990; Templeton, 1992).

“La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde” (Baumforth et al., 1999).

2.7.3. Electroforesis en gel agarosa

Es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (García, 2000).

“Se utiliza comúnmente para identificar y analizar las proteínas, ARN y ADN en muestras biológicas. El principio físico-químico se basa en la migración de

diferentes biomoléculas a través de un soporte o matriz de agarosa que se somete a un campo eléctrico. Como el ADN posee carga eléctrica negativa, se mueven hacia el ánodo. La separación de las biomoléculas depende de su tamaño (peso relativo); a mayor volumen, menor movilidad electroforética como de la concentración de la matriz” (Flores et al., 2009).

2.7.4. Secuenciación de ADN

El análisis más detallado de la estructura del ADN consiste en averiguar la secuencia de nucleótidos. Se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, sin embargo, actualmente los métodos más utilizados son el de secuenciación automática y el método enzimático de terminación de cadena de Sanger (Universidad Complutense de Madrid, 2016).

2.8. INÓCULO LÁCTEO (YOGUR)

Para la elaboración del yogur se requiere leche y fermentos lácticos, siendo importante que la leche cumpla el requisito de estar en óptimas condiciones sanitarias, lo que se logra al ser sometida a proceso de pasteurización, además no debe poseer antibióticos, para que pueda ocurrir la fermentación láctica de manera adecuada, y obtener un producto alimenticio con características fisicoquímicas y microbiológicas aceptables (Ruíz y Ramírez, 2009).

Es el derivado lácteo de mayor consumo y mejor conocido, su proceso de fabricación tiene como objetivo principal provocar el descenso del pH de la leche hasta alcanzar las condiciones favorables para la coagulación (Pauletti et al., 2004).

2.8.1. Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas “están basadas en las propiedades de la leche y los sucesivos cambios que ocurren durante la fermentación láctica.

a. pH: Es una medida de la acidez o alcalinidad de una sustancia (es la medida de las concentraciones de iones de hidrógeno presentes). El pH del yogur es una de las principales por tener un comportamiento debido a que en su elaboración se busca disminuir el pH de la leche (6.5 – 6.7) y llegar al pH de 4.3 – 4.6 del yogur lo cual contribuye al olor y sabor característico” (Illescas, 2001).

b. Acidez: “La acidez de un yogur debe oscilar entre 0.8 – 1.8 % de ácido láctico. El aumento de la acidez del yogur por la producción de ácido láctico ocasiona la coagulación de la caseína, además afecta la textura y el sabor en el producto (Fennema, 2000). El porcentaje de ácido láctico adecuado es extremadamente importante para obtener un yogur de alta calidad con sabor propio, cuerpo y textura propia, esto es para que el producto tenga el mínimo porcentaje de sinéresis durante el almacenamiento”. (Ankenman y Morr, 1996).

c. Sinéresis: Es la expulsión de suero desprendido durante el almacenamiento (Rojas et al., 2007). “La capacidad de retención de agua del yogur expresada como sinéresis, fue determinada aplicando la técnica de Kessler 1998, con este procedimiento el suero es separado y pesado, la sinéresis se expresa en porcentaje” (Reyes y Vélez, 2015).

2.9. ANTECEDENTES

(Jurado et al., 2009). “Estudiaron la caracterización de BAL probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos adultos como posible alternativa al uso de antibióticos. La caracterización de los parámetros bioquímicos de las BAL contemplo la evaluación del pH del fermento. Se utilizaron pruebas para la identificación de las BAL que se complementaron con la actividad de catalasa negativa, producción de gas negativa y viabilidad a diferentes concentraciones de sales biliares. Las pruebas microbiológicas evidenciaron que las BAL seleccionadas inhibieron principalmente los enteropatógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*. Los *Lactobacillus plantarum* reunieron las características para el uso potencial como probióticos. Se

recomienda la elaboración de inóculos para aplicación en raciones alimenticias de lechones destetos”.

Así mismo, (Quemac, 2014) evaluó el “efecto de tres dosis de probióticos (*Rhodopseudomonas spp*, *Lactobacillus spp*, *Saccharomyces spp*) en la alimentación para el engorde de cerdos. Los datos obtenidos del incremento de peso diario para los cerdos de T3 fue muy superior al del testigo, a diferencia del T1 y T2 con promedios parecidos en ambos; concluyendo que al incorporar la dosis de probióticos en la alimentación para los cerdos aumenta la productividad”.

Por otro lado, (Vélez et al., 2015b), investigaron las “capacidades probióticas de algunas BAL aisladas de 1 ml leche calostro de veinte cerdas. Se identificó morfológicamente para determinar la capacidad probiótica en las siguientes pruebas: tolerancia a pH 3, crecimiento en bilis de buey 0,3% p/v, actividad antimicrobiana frente a *Salmonella tiphymurium* y su identificación molecular se realizó por el método análisis del gen16S Ribosomal. Solo dos mostraron tener capacidad probiótica al crecer y resistir a un pH ácido de 3,0 y 0,3% p/v de bilis de buey, catalasa negativa, que inhibieron el crecimiento de *Salmonella tiphymurium* con halos mayores a 11 mm”.

Los investigadores (Schneider et al., 2004), identificaron “BAL aisladas a partir de la saliva y de diferentes partes de la mucosa gastrointestinal de terneros lactantes recién nacidos. *Lactobacillus casei*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, realizada por medio de técnicas morfológicas y bioquímicas. Así como el estudio de su identificación genética mediante el RAPD y 16S ARNr, han demostrado una evidencia para diferencias a nivel de género y especie su posible actividad probiótica aprovechando su efecto probiótico cuando son administrados al hospedador”.

Estudios realizados por (Hattingh y Viljoen, 2001) describen que, durante la fermentación del yogur, el contenido de ácido láctico incrementa mientras que el pH disminuye. La sobre acidificación o post-acidificación se debe al crecimiento incontrolable de *L. bulgaricus* que disminuye el pH drásticamente después de la

fermentación y durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración, afectando así la viabilidad de las bacterias probióticas.

(Rojas et al., 2007). “Evaluó el efecto de diferentes proporciones de yogur con leche de cabra (c) y leche de vaca (v). (0%c/100%v, 30%c/70%v, 50%c/50%v, 70%c/30%v y 100%c/0%v), sobre el pH y la sinéresis de un yogur batido de fresa, durante los días 01, 07, 14 y 21 de almacenamiento en refrigeración a 4-5°C. El comportamiento del pH resultó el mismo para todas proporciones constatando que disminuyó durante el almacenamiento. La sinéresis para todas las muestras descendió con el tiempo. La muestra de mayor sinéresis durante todo el periodo fue la de 100% leche de vaca, mientras la de menor fue la de 100% cabra. Para la sinéresis se encontró una interacción entre el día de almacenamiento y el tipo de leche, concluyéndose que la sinéresis disminuyó con el tiempo y con el mayor contenido de leche de vaca”.

(Molina, 2009). Realizó “comparaciones de tres estabilizantes comerciales utilizados en la elaboración de yogur de leche descremada de vaca durante cuatro semanas. Los estabilizantes estuvieron compuestos por T1 (gelatina, pectina, carragenina, polifosfatos de sodio y monoestearato de glicerilo), T2 (almidón modificado, gelatina kosher, pectina y sulfato de calcio) T3 (gelatina, pectina, carragenina, formula estandarizada con dextrosa). Las pérdidas de líquido (sinéresis) durante las semanas de estudio fueron muy bajas de 0.12 en los T2 y T3, sin embargo; el T1 fue el que obtuvo cero pérdidas, estos resultados son considerados adecuados para la elaboración de un yogur”.

(Reyes y Vélez, 2015). Estudió y analizó las propiedades fisicoquímicas de un yogur asentado enriquecido con microcápsulas ácidos grasos poli-insaturados omega-3 y almacenado durante 03 semanas de refrigeración, fueron analizados semanalmente. La sinéresis disminuyó en los yogures enriquecidos con la presencia de microcápsulas que favorece la retención de agua, la acidez esta inversamente al pH, aumentando durante el almacenamiento desde 0.52 a 0.69 g/l para los yogures con 5.4% de microcápsulas. El yogur favorece su funcionalidad y ciertas características fisicoquímicas con la adición de omega-3.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación es de tipo básico-experimental.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población está referida a lechones de traspatio criados en la región, la muestra a considerar está constituida por 10 lechones de traspatio, escogidos de 03 corrales diferentes, del caserío El Limón, distrito Pampas de Hospital, departamento de Tumbes.

Para esta investigación de estudio la muestra estuvo constituida por las bacterias ácido lácticas asociadas a la parte final del tracto digestivo del lechón. Fueron recogidas en 10 tubos de ensayo uno por cada lechón, para ser transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes, donde se realizó los análisis microbiológicos, bioquímicos, molecular. Y finalmente ser utilizadas en el proceso de inoculación láctea (yogur), realizando sus pruebas correspondientes a métodos físico-químicos y microbiológicos.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DE INVESTIGACIÓN

3.3.1. Materiales de laboratorio

Asa bacteriología

Asa de Drigalski

Espátula doble con cuchara

Frascos con tapa rosca
Hisopos estériles
Láminas portaobjeto
Matraces de 250 y 500 ml
Mechero
Micropipetas 10, 100 y 1000 μ l
Microtubos 0.2 y 1.5 ml
Placas Petri
Probetas de 500 ml
Puntas para micropipetas 10, 100 y 1000 μ l
Termómetro
Tubos de Centrifuga
Cocineta eléctrica
Contador de colonias
Equipo electroforético
Incubadora
Microcentrífuga refrigerada
Microscopio electrónico
Potenciómetro pH
Refrigerador
Termociclador
Transiluminador UV

3.3.2. Medios de cultivos y reactivos

Agarosa
Agar MRS
Agar Mueller Hinton
Agar SS
Agar EMB
Agua destilada, agua ultrapurificada
Azul de anilina 0.03%
Caldo MRS
Cloroformo HPLC
Etanol absoluto

- Fenolftaleína 1%
- NaOH 0.1 y 1 N
- Primers (8F y 1510R)
- Solución bromuro de etidio
- Solución de lavado (Etanol a 75%)
- Solución disolvente (NaCl 1.2M)
- Solución lisis (DTAB 2%)
- Solución precipitante (CTAB 5%)
- Solución salina 8.5%
- Solución TAE 1X
- Tampón de depósito, Tampón TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM)
- Taq ADN polimerasa (recombinante)

3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.4.1. Método de investigación

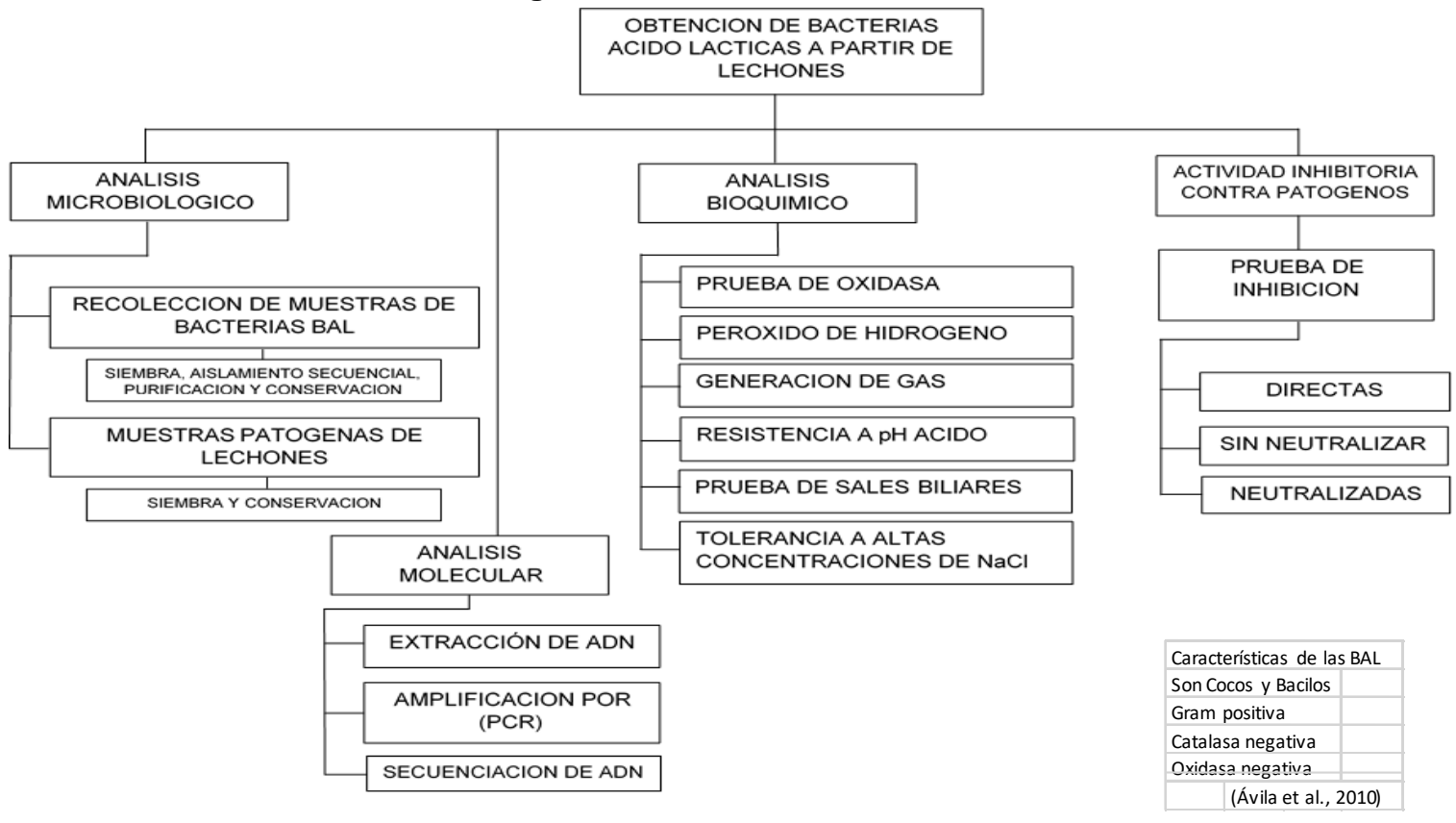


Diagrama 1: Obtención de bacterias ácido lácticas de la parte final del tracto digestivo de lechones.

3.4.2. Obtención de la muestra

Para este estudio de investigación, se procedió a recolectar a partir de lechones de traspatio, 10 muestras de epitelio de la parte final del tracto digestivo de animales sanos, que fueron alimentados con balanceado sin antibióticos. Las muestras se recolectaron por medio de hisopado estéril (raspado), colocándolos en tubos de ensayo tapa rosca.

Las muestras fueron rotuladas de la siguiente manera:

- Corral 01 – Lechón 01
- Corral 01 – Lechón 02
- Corral 01 – Lechón 03
- Corral 01 – Lechón 04
- Corral 02 – Lechón 01
- Corral 02 – Lechón 02
- Corral 02 – Lechón 03
- Corral 03 – Lechón 01
- Corral 03 – Lechón 02
- Corral 03 – Lechón 03

Fueron transportados en recipientes herméticos y llevados en cadena de frío al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud donde se procedió a realizar los análisis respectivos.



Figura 1: Colecta de muestras de la porción final del tracto digestivo del lechón.

3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

3.5.1. Recolección de muestras de bacterias BAL

- **Preparación de diluciones decimales.**

Se sumergió cada muestra de forma aséptica en solución salina fisiológica estéril al 0.85% (diluyente), se homogenizó por 5 a 10 segundos para obtener una buena dilución de 10^{-1} . Seguidamente se transfirió 1 ml para los siguientes tubos con 9 ml del diluyente estéril. Realizándose las diluciones (hasta 10^{-5}) necesarias para obtener un número apropiado para realizar el recuento de colonias bacterianas.

- **Siembra, identificación visual y recuento de BAL.**

Se realizó la siembra por el método de superficie, tomando 25 uL de las diluciones decimales en placas con agar selectivo para el género *Lactobacillus* MRS y agar MRS + Azul de anilina 0.03%. El cual se procedió a identificarlas mediante un examen visual de la carga microbiana, por medio de la tinción azul de las colonias en la superficie del agar.

- **Aislamiento secuencial, interpretación de los cultivos y tinciones bacterianas.**

Se seleccionó las colonias azules para proceder al aislamiento en agar MRS realizándose por el método de estría, verificando así la población BAL que se obtuvo en la siembra anterior, se realizó la interpretación de las colonias obtenidas caracterizándolas macroscópicamente: Por tamaño, forma, elevación, margen, color, densidad y consistencia. Las tinciones bacterianas identificaron el grupo de bacteria al cual pertenecen ayudando a mejorar el contraste en la figura vista al microscopio.

- **Purificación y conservación de BAL.**

Se procedió de acuerdo a la observación y confirmación de tinción Gram. Utilizando tubos con agar MRS inclinado con ángulo de 20° sembrando por el método de estría y conservando a una temperatura de 4°C y en criopreservación con glicerol a -20°C .

- **Muestras patógenas de lechones - Siembra, identificación y conservación de muestras patógenas.**

Se procedió la siembra por el método de agotamiento, en medios específico como: agar SS y agar EMB. Se identificó visualmente, se aisló y conservaron las muestras de bacterias patógenas del lechón.

3.5.2. Análisis bioquímicos

A las cepas BAL aisladas y purificadas se les realizaron pruebas de selección. Estas fueron:

- **Prueba de oxidasa.**

Se determinó utilizando tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la presencia de la enzima citocromo C-oxidasa. El procedimiento consistió en colocar en la parte inferior de la tira reactiva una porción de masa de bacterias. Observando los resultados dentro del minuto transcurrido, si la zona impregnada cambia a un color azul-violeta es considerado como positivo, pero si al pasar los dos minutos no cambia el color de la masa de las BAL es considerado negativo.

- **Prueba de la catalasa.**

Se especificó la capacidad que tienen las BAL para desdoblar el H_2O_2 al 30%, en agua y oxígeno. El procedimiento más común fue poner una gota de H_2O_2 en un portaobjetos y posteriormente con el asa bacteriológica estéril colocar una masa de BAL. Si hay burbujeo intenso resulta positivo significando que hay producción de oxígeno por lo está presente la enzima catalasa. Al no haber burbujeo resultado es negativo.

- **Generación de gas.**

Se verificó la generación de CO_2 según el proceso fermentativo. Las BAL fueron cultivadas en caldo MRS. El medio fue dispensado en tubos de Durham invertidos. Después de la siembra fueron incubadas durante 24 horas a $37^\circ C$.

Se consideraron positivos los tubos con burbujas de gas en los viales, según el método de (Yimin et al., 1999).

- **Resistencia a pH bajos.**

Las cepas BAL seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 37°C por 24 horas. De acuerdo a (Ávila et al., 2010) se midió el crecimiento de las BAL por densidad óptica (DO_1) a 600 nm en un espectrofotómetro UV. En tubos falcón de 15ml de capacidad se añadió 10ml de caldo MRS ajustados a un pH 2.5, 3.5, 4.5 con HCL y según (Rondón et al., 2008) se tomó 1ml inoculándolo en los tubos con caldo MRS con pH ajustados.

Las muestras fueron incubadas a 37°C por 24 horas, se realizó la prueba de viabilidad en el recuento de bacterias por medio de agar MRS antes de la incubación (h_0) y después de (h_{12}).

- **Tolerancia a sales biliares.**

Se determinó la resistencia de las cepas BAL en sales biliares cultivándolas inicialmente en caldo MRS a 37°C por 24 horas. De acuerdo a (Ávila et al., 2010) se midió el crecimiento de las BAL por densidad óptica (DO_1) a 600nm en un espectrofotómetro UV. En tubos falcón de 15ml de capacidad se añadió 10ml de caldo MRS enriquecidos con 1g (1% p/v), 5g (5% p/v) y 10g (10% p/v) de Ox-Bilis y según (Rondón et al., 2008) se tomó 1ml inoculándolo en los tubos con caldo MRS con sal bilis ajustados, se incubó a 37°C por 24 horas.

Se realizó la prueba de viabilidad en el recuento de bacterias por medio de agar MRS antes de la incubación (h_0) y después de (h_{12}).

- **Tolerancia a altas concentraciones de NaCl.**

Las cepas BAL se cultivaron inicialmente en caldo MRS a 37°C por 24 horas. De acuerdo a (Ávila et al., 2010), se midió el crecimiento de las BAL por densidad óptica (DO_1) a 600nm en un espectrofotómetro UV. En tubos falcón de 15ml de capacidad se añadió 10ml de caldo MRS enriquecidos con 5g (5% p/v), 9g (9% p/v) y 13g (13% p/v) de NaCl y según (Rondón et al., 2008) se tomó 1ml inoculándolo en los tubos con caldo MRS con NaCl, se incubó a 37°C por 24 horas.

Se realizó la prueba de viabilidad en el recuento de bacterias por medio de agar MRS antes de la incubación (h_0) y después de (h_{12}). (Mogollón et al., 2021).

3.6. Actividad inhibitoria en microorganismos patógenos

Las cepas BAL encontradas se enfrentaron a bacterias patógenas. Estas fueron sembradas y conservadas en tubos con agar PCA inclinado, se observó la concentración o estandarización por medio de la dilución en tubos con solución salina al 0.85%.

3.6.1. Método directo o capa doble

Las cepas BAL se activaron en caldo MRS a 37°C por 24 horas posteriormente. En la placa de Petri se vertió la primera capa de agar MRS sembrándose las cepas activadas mediante la técnica de hisopado, que consistió en realizar una delgada línea. Después que las cepas se impregnaron en el agar, se vertió la segunda capa de agar Mueller Hinton para sembrar por superficie las cepas patógenas añadiendo 25 μ l.

Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y se consideró como actividad inhibitoria positiva la observación de halo alrededor de las cepas BAL (Cástulo et al., 2008).

3.6.2. Método de pocillo.

Sin Neutralizar:

Se inició con la siembra de cepas BAL en caldo MRS a 37°C por 24 horas, después se determinó el pH para cada cepa. Se utilizó microtubos de 1.5ml tomándose directamente 1ml de los caldos y se centrifugó a 10.000RPM durante 10min, obteniendo el sobrenadante.

Seguidamente en placas con agar Mueller Hinton se sembraron por superficie 25 μ l de cepas patógenas y realizándose después perforaciones cilíndricas con un diámetro de 6mm. Para luego ser incubadas en cada perforación 35-40 μ l del sobrenadante acidificado por cada cepa.

Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. La lectura positiva se determinó y midió por la formación de halos de inhibición de las BAL indicadoras.

Neutralizadas

Se inició con la siembra de cepas BAL en caldo MRS a 37°C por 24 horas, después se ajustó a un pH 6.5 - 7 con una solución de NaOH 1N (Cástulo et al., 2008). Se utilizó microtubos de 1.5ml tomándose directamente 1ml de los caldos. Centrifugándose a 10.000RPM durante 10min, obteniendo el sobrenadante.

Seguidamente en placas con agar Mueller Hinton se sembraron por superficie 25µl de cepas patógenas y realizándose después perforaciones cilíndricas con un diámetro de 6mm. Para luego ser incubadas en cada perforación 35-40µl del sobrenadante neutralizado por cada cepa.

Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. La lectura positiva se determinó y midió por la formación de halos de inhibición de las BAL indicadoras.

3.7. ANÁLISIS MOLECULAR.

Se realizó la identificación molecular de bacterias probióticas como así también de bacterias patógenas extraídas del lechón.

3.7.1. Extracción de ADN.

“La extracción de ADN se realizó utilizando el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich et al., 1991, adaptado para células bacterianas según Dulanto 2013).

Se procedió a pesar las muestras de BAL en un microtubo 1.5 mL en la balanza analítica hasta obtener una cantidad entre de 25 a 30 mg.

Se agregó 600 uL de solución de lisis (DTAB) agitando en vórtex por 20 segundos, luego se procedió a incubar a 75°C por 10min para después enfriar a temperatura ambiente por 5min.

Se agitó en vórtex por 20 segundos, adicionándole 700µl de cloroformo, agitando nuevamente en vórtex por 20 segundos centrifugándose a 13000 RPM durante 5min.

Se Transfirió 250 uL del sobrenadante a otro microtubo de 1.5 mL que contiene previamente 100 uL de solución precipitante (CTAB) y 900 uL de agua ultrapura.

Se agitó en vórtex e incubo a 75°C durante 5min. Después se enfrió a temperatura ambiente y centrifugo a 13000 RPM por 10min.

Se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet (ADN) con 150 uL de solución disolvente, incubando a 75°C durante 5 min, se enfrió a temperatura ambiente.

Se centrifugo a 13000 RPM por 5min, transfiriendo 150 uL del sobrenadante a un nuevo microtubo con 300 uL de etanol absoluto, agitando en vórtex por 20 segundos, centrifugándolo a 13000 RPM por 5min.

Para finalizar se lavó el pellet con 200 uL de solución de lavado, volteándose el tubo varias veces para secar el pellet por 15 min sin perderlo y resuspendiendo con 200 uL de tampón TE (Tris 10mM- EDTA 1mM) almacenándolo a -20°C. (Mogollón et al., 2021).

3.7.2. PCR (Reacción en cadena polimerasa).

La amplificación de la región 16S ARNr, se utilizó los cebadores universales 8F (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) y 1510R (5´ GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3´) descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud et al., 2003).

El volumen final de cada reacción fue 25 uL, constituida por 2.5 uL de buffer Taq 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTPs (10mM), 0,5 U de Taq ADN polimerasa, 10pmol de cada cebador y 2 uL de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y consistió de 01 ciclo a

94°C por 5min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 5 min. (Mogollón et al., 2021).

3.7.3. Electroforesis.

De cada producto de amplificación de la reacción en cadena polimerasa (PCR) 10µl fueron migrados en gel de agarosa al 1% con tampón de migración TAE 1X. La migración se realizó a 100V durante 30 min; conjuntamente se procedió a migrar un marcador de peso molecular de 50 pb. El gel es teñido con solución de bromuro de etidio (50 uL/100 mL) y visualizado utilizando un transiluminador UV. (Mogollón et al., 2021).

3.7.4. Secuenciación de los productos de la PCR.

Se empleó 10 uL de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, fueron trasladados a microtubos de 0.2 mL. Igualmente se preparó en microtubos de 0.2ml porciones de 5 uL de cada cebador universales para el gen 16S ARNr. Estas se dirigieron empacadas y enviadas a la empresa Macrogen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado. Las secuencias de ADN fueron alineadas con el software libre MEGA 7 y comparadas con las secuencias de 16S ARNr que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software libre BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). (Mogollón et al., 2021).

3.8. ELABORACIÓN DEL INÓCULO LÁCTEO.

Para el desarrollo experimental en el proceso de elaboración y evaluación del inóculo lácteo. Se llevó a cabo el siguiente diagrama.

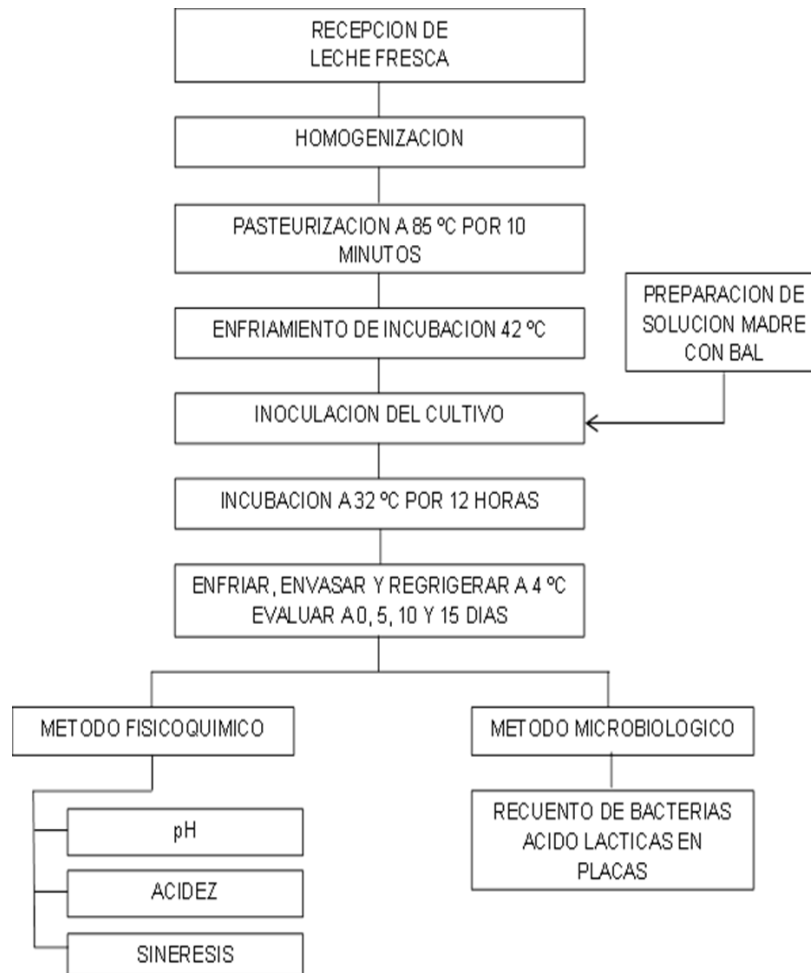


Diagrama 2: Proceso de elaboración y evaluación del inóculo lácteo. Las etapas se describen a continuación:

3.8.1. Recepción de leche fresca

La leche fresca se procedió a una inspección organoléptica para verificar los estándares de calidad permitidos. Asimismo, se tamizó para eliminar y prevenir cuerpos extraños (Revilla, 1982).

3.8.2. Homogenización

En esta etapa se homogenizó para que los glóbulos grasos sean divididos y dispersados mecánicamente haciendo una emulsión más estable entre la grasa y la leche (Revilla, 1982).

3.8.3. Pasteurización

Se efectúa la pasteurización de la leche a una temperatura 75°C por un tiempo de 10 minutos para destruir los microorganismos patógenos y la flora que no interese (Hernández, 2003). Además, la pasteurización con los parámetros indicados favorece una buena coagulación y reduce la separación de suero.

3.8.4. Enfriamiento de incubación

La leche debe ser enfriada hasta la temperatura necesaria para el óptimo crecimiento de los microorganismos, que oscila entre los 40 y 45 °C. Para esta operación se recomienda que se haga lo más higiénicamente con el fin de no contaminar la mezcla además de hacerlo rápido (Alais, 1998).

3.8.5. Preparación del inóculo lácteo

Los inóculos lácteos se obtuvieron de leches fermentadas utilizando las BALs, aisladas y evaluadas como probióticos, este producto preparado a partir de leche fresca pasteurizada y fermentada que actuó como transporte para las BAL que posterior para preparar dosis de un 1 mL.

Se preparó el cultivo madre para ser dosificado en el inóculo lácteo, utilizando leche fresca y las BAL extraídas de la parte final del tracto digesto del lechón.

Activación de cepas BAL

Siembra de las BAL en agar MRS + Azul de anilina, incubándose a 37°C por 48 a 72 horas (Jurado et al., 2009). Siembra de las BAL en caldo MRS a 37°C por 48 horas.

Concentración de BAL por espectrofotometría

La absorbancia o densidad óptica (DO) es cercano a 1 y longitud de onda 630 nm (Hernández et al., 2002).

Preparación de la solución madre

En los frascos estériles de 250 ml se agregó la leche y posteriormente 1 ml de caldo sembrado de BAL, en iguales concentraciones de densidad óptica. Incubándose a 32°C por 12 horas.

Inoculación láctica

Se retiró 50 ml de cada de solución madre de los inóculos para ser agregados en medio litro de leche pasteurizada. Se incubó a 32°C por 12 horas, enfrió a 4°C y se realizó las evaluaciones químicas y microbiológicas con respecto a los 0, 05, 10 y 15 días de haberse preparado.

3.8.6. Análisis químicos del inóculo lácteo

El valor de pH es medido por el método 981.12 (AOAC, 1990) introduciéndose en el inóculo lácteo el electrodo del potenciómetro digital, el cual fue antes calibrado usando soluciones buffers de pH de 4.00 y 7.00.

Se tomó entre 40 a 45 mL del inóculo lácteo en un recipiente, se introdujo el electrodo del pH metro, se esperó que se estabilizara la lectura y se procedió a registrarla. Así fue consecutivo la evaluación de pH a los 0, 05, 10 y 15 días de almacenamiento a 4°C.

La determinación de la acidez titulable se llevó a cabo en muestras del inóculo lácteo de 5g, diluidas a la mitad con tres gotas de fenolftaleína y después se empieza a titular con NaOH de 0.1N hasta obtener un color rosa pálido persistente (López-Malo, 2000).

$$\% \text{ de acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}}}{W_m} * 0.09 * 100$$

V_{NaOH} :	Volumen de NaOH gastado
N_{NaOH} :	Normalidad de NaOH
W_m :	Peso de muestra

La acidez titulable se procedió a evaluar a los 0, 05, 10 y 15 días de almacenamiento a 4°C.

La evaluación de sinéresis se utilizó una centrifuga de tubos. Se pesó la muestra previamente (10 g) y se colocó en los tubos, dejándose centrifugar por 20 min a 5.000 RPM. Después de la centrifugación se obtuvo el peso del sobrenadante y se calculó el porcentaje de sinéresis (p/p) mediante la relación entre peso del sobrenadante y el peso de la muestra multiplicado por 100 (Díaz et al., 2004).

Evaluación consecutiva a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento a 4°C.

3.8.7. Análisis microbiológico del inóculo lácteo

El recuento se realizó en comparación al requisito de identidad empleado por NTP 202.092:2014, utilizando el método ISO 7889:2003 (IDF 117:2003) especificado para la enumeración de microorganismo característicos en el inóculo lácteo (yogur) por la técnica de recuento de colonias a 37°C.

Cuadro de requisitos de viabilidad en yogur

<i>Requisitos</i>	<i>Recuento</i>	<i>Método de ensayo</i>
<i>Bacterias lácticas totales (UFC/g)</i>	Min. 10 ⁷	ISO 7889 (IDF 117)

El recuento de colonia se evaluó en los 0, 5, 10 y 15 días almacenamiento.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las 10 muestras sembradas por dilución, superficie y duplicado con agar MRS + azul de anilina ayudaron al reconocimiento de los microorganismos ácidos lácticos verificando de manera visual las colonias teñidas de azul. Luego fueron sembradas consecutivamente en agar MRS hasta obtener las bacterias puras.

La muestra del lechón 05 presenta mayor crecimiento de $2.80E+04$ UFC/ml, seguido por la cepa 01 con $2.60E+04$ UFC/ml. Las muestras de lechones 04, 09, 07 y 02 están próximas a valores similares, en tanto las muestras 03, 06, 08 y 10 presentaron menos crecimiento entre $1.00-1.20+04$ UFC/ml.

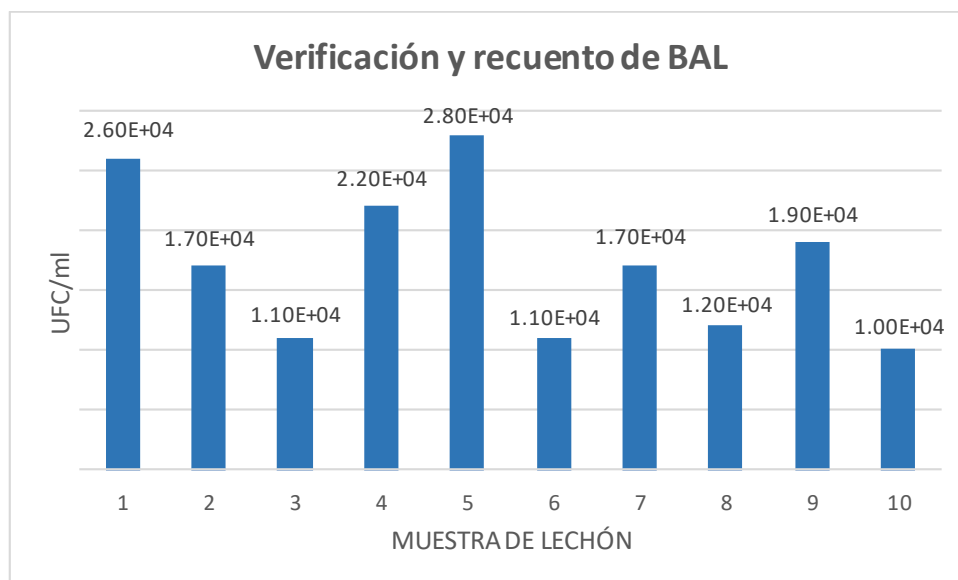


Gráfico 1: Resultados promedios en evaluación inicial de las muestras por diluciones de 10^{-1} al 10^{-5} para verificación y recuento de BAL.

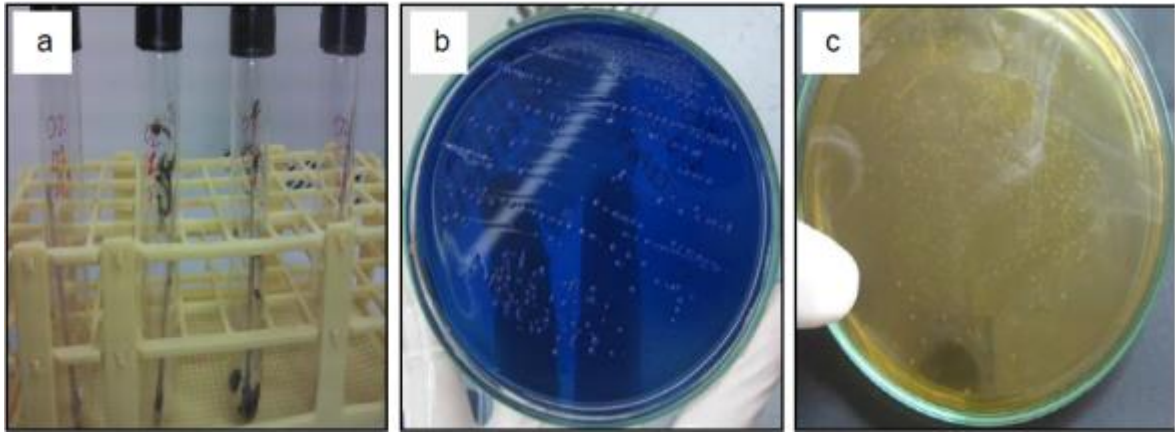


Figura 2: a) Muestras b) selección de cepas ácidos lácticas con agar MRS y azul de anilina c) aislamiento secuencial de las BAL para su purificación.

4.1.1. Evaluación de muestras patógenas en lechones

Las muestras iniciales de los lechones fueron sembradas por el método de agotamiento en medios específicos para patógenos como: agar EMB y agar SS.

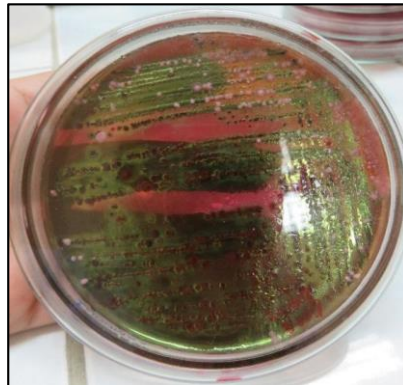


Figura 3: Identificación de colonias con coloración verdosa y brillo metálico del género *Escherichia* (A). Se aisló y conservó en tubos con agar inclinado.

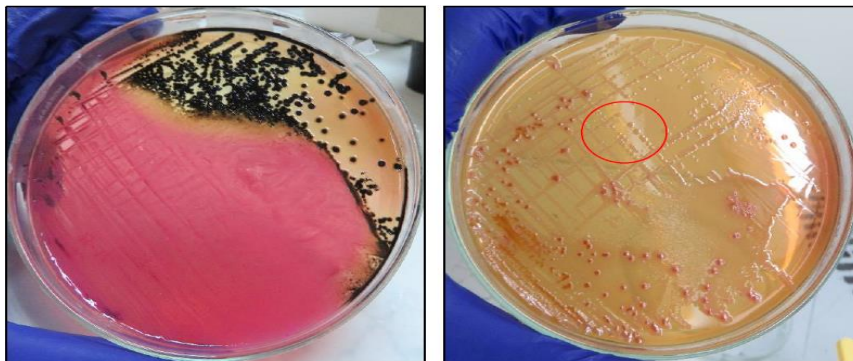


Figura 4: Agar SS permitió el desarrollo de bacterias patógenas de colonias incoloras del género *Shigella* (B). Se aisló y conservó en tubos con agar inclinado.

4.1.2. Interpretación de los cultivos bacterianos

Después del crecimiento de UFC, se visualizó el perfil de las características macroscópicas de colonias mediante el crecimiento en superficie de las placas con agar MRS. Según (López y Torres, 2006). El tamaño de las colonias bacterianas está clasificado en:

- Diminutas: colonias puntiformes \leq a 0.5 mm de diámetro.
- Pequeñas: de 1 a 2 mm de diámetro.
- Medianas: de 2 a 4 mm de diámetro.
- Grandes: colonias \geq a 4 mm de diámetro.

Dichas características se verán a continuación:

Tabla 1: Visualización de las características macroscópicas de las colonias

<i>Bacterias ácido lácticas</i>	<i>Tamaño (mm)</i>	<i>Forma</i>	<i>Elevación</i>	<i>Margen</i>	<i>Color</i>	<i>Densidad</i>	<i>Consistencia</i>
CEPA 01	Pequeñas 1.72	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 02	Pequeñas 1.82	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 03	Medianas 2.44	Circular	Plana	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 04	Pequeñas 1.28	Circular	Plana	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 05	Pequeñas 1.51	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 06	Medianas 3.54	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 07	Medianas 3.54	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 08	Diminutas 0.48	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 09	Diminutas 0.48	Circular	Plana	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa
CEPA 10	Diminutas 0.48	Circular	Plana	Entero	Blanco	Opaca	Viscosa

4.1.3. Tinciones bacterianas

El principal colorante (cristal violeta) ingresó en el citoplasma de la célula teniéndolas de violeta. Después el mordiente (yodo) fijó las tinciones aumentando la afinidad entre el colorante y las células. Luego la aplicación del agente decolorante (alcohol ácido) disolvió el colorante no fijado por el mordiente para finalmente usar el colorante de contraste (safranina) que determinó el grupo de bacterias a la cual pertenecen las cepas bacterias adquiriendo un color azul-violeta (GRAM POSITIVAS).

Llevadas al microscopio se observó la forma de bacteria. Bacilos: de forma cilíndrica, algunos están aislados y otros agrupados cuando pertenecen juntos después del proceso de división. Cocobacilos: Se presentaron en bacilos pequeños, redondos. Cocos: Son de forma más o menos esféricas.

Tabla 2: Grupo y forma de las cepas BAL.

<i>Cepas</i>	<i>Grupo de bacteria</i>	<i>Forma de bacteria</i>
01	Gram positivas	Bacilos
02	Gram positivas	Cocobacilos
03	Gram positivas	Bacilos
04	Gram positivas	Bacilos
05	Gram positivas	Cocos
06	Gram positivas	Cocobacilos
07	Gram positivas	Cocos
08	Gram positivas	Bacilos
09	Gram positivas	Bacilos
10	Gram positivas	Bacilos

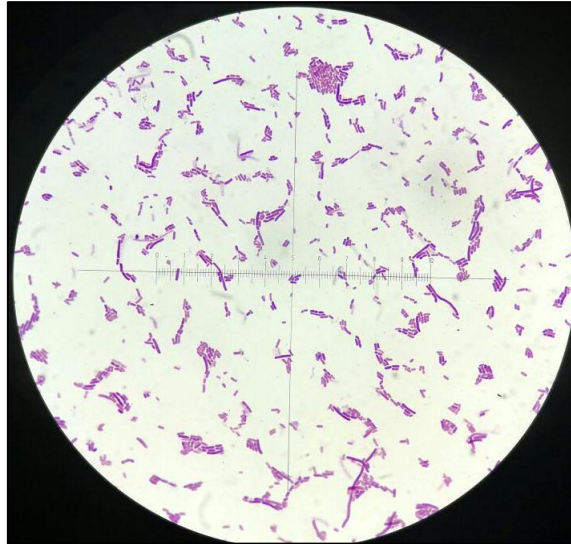


Figura 5: Identificación del grupo de bacterias al cual pertenecen “Gram positivas”. Uno de los tipos de bacteria encontrados “bacilos”.

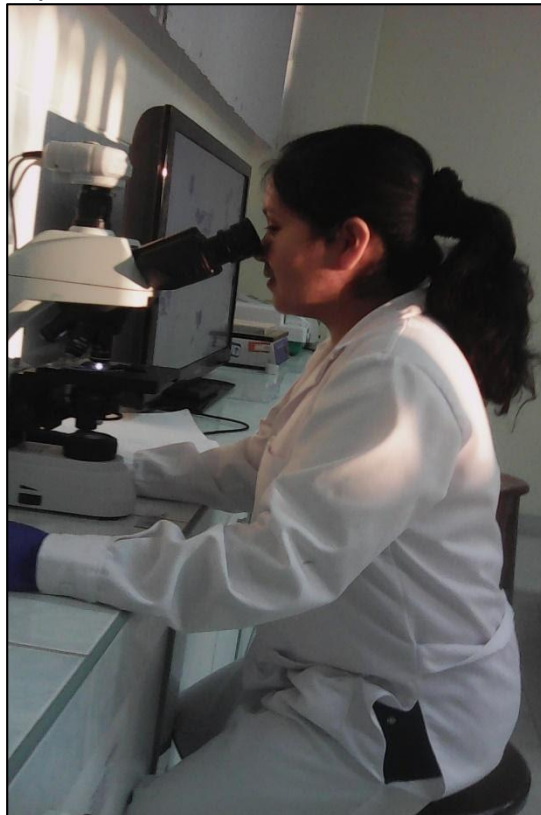


Figura 6: Observación a través del microscopio, equipo de gran importancia en la identificación de BAL.

4.2. EVALUACIÓN DE LOS ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

4.2.1. Prueba de oxidasa, peróxido de hidrógeno y generación de gas.

Los resultados en la prueba oxidasa fueron completamente negativas. Esto sucede porque en las cepas BAL en estudio no producen la enzima citocromo C-oxidasa en su proceso de respiración. No son aeróbicas, por lo que no necesitan en su membrana celular oxígeno.

En cambio, los resultados de catalasa dieron negativas en su mayoría la no ser productoras de H₂O₂. Con excepción en la cepa 03 que resulto positiva al poseer un efecto oxidante mediante el desdoblamiento en agua y oxígeno.

En la generación de gas la mayoría de las cepas BAL en estudio no produjeron CO₂ lo cual es favorable para los siguientes procedimientos. En tanto las cepas 04, 08 y 10 su resultado fue positivo como consecuencia del metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono y glucosa (Rondón et al., 2008).

Tabla 3: Evaluación bioquímica de cepas BAL

Cepas	Oxidasa	Peróxido de hidrógeno	Generación de gas
01	-	-	-
02	-	-	-
03	-	+	-
04	-	-	+
05	-	-	-
06	-	-	-
07	-	-	-
08	-	-	+
09	-	-	-
10	-	-	+

Prueba positiva: + Prueba negativa: -

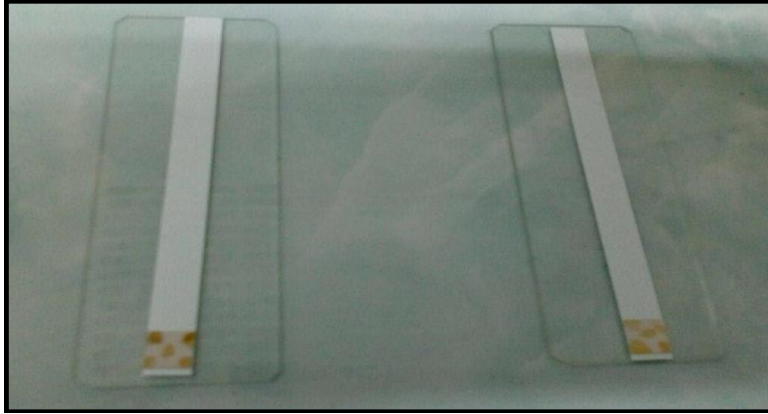


Figura 7: Reacción negativa de la prueba oxidasa, al no cambiar el color de la masa bacteriana.

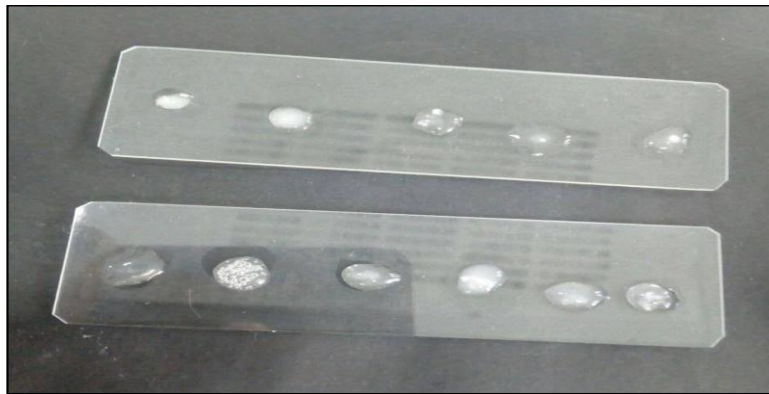


Figura 8: Reacción negativa de la prueba catalasa, al hacer burbujas hay reacción enzimática con el peróxido de hidrogeno.



Figura 9: Reacción negativa en la mayoría de las cepas. A excepción de la cepa 03 que se detectó formación de burbujas.

4.2.2. Resistencia a pH bajo

Las cepas que no lograron adecuarse a ninguna concentración de pH, fueron descartadas definitivamente estas son 03, 04, 08, 09 y 10.

La concentración de cepas BAL se determinó por medio del espectrofotómetro a una densidad óptica (DO) a 600 nm. Posterior a eso fueron sembradas en caldo MRS a distintas concentraciones de pH 2.5, 3.5, 4.5 la cual determinó la resistencia que tienen en adaptarse y crecer en estos medios. El resultado del gráfico 02, presenta la estimación inicial en UFC/ml en donde la cepa 01 presentó mayor cantidad de UFC/ml inicialmente antes de ser incubadas a 37°C por 24 horas.

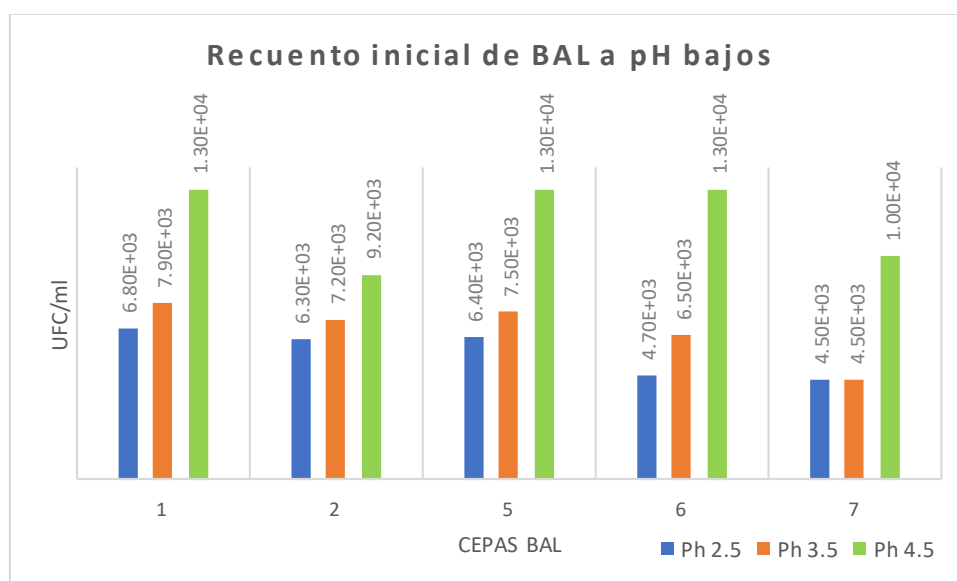


Gráfico 2: El recuento inicial de cepas BAL en caldo MRS ajustados a diferentes concentraciones de pH.

El gráfico 03, muestra la viabilidad que tuvieron las BAL. En la concentración de pH 2.5 se vieron afectadas todas las cepas al no resistir un medio de cultivo muy ácido. Lo que significa que, al incrementar las condiciones ácidas, el crecimiento se ve reducido en su totalidad. Con diferencia a la concentración de pH 3.5 donde las cepas 01, 02 y 05 mostraron una mejor tolerancia al pH ácido, presentando un crecimiento adecuado, las cepas 06 y 07 tuvieron un crecimiento menor.

En donde sí presentaron un crecimiento superior con respecto a las cepas 01, 02, 05, 06 y 07 fue en la concentración de pH 4.5. Esto se debe a la capacidad de crecimiento de la cepa (presencia de turbidez) que está relacionada con la capacidad de producir ácido, por lo que a mayor población, mayor cantidad de ácido producido (Rondón et al., 2008). Es decir estas cepas BAL son capaces de sobrevivir las barreras del tránsito gastrointestinal.

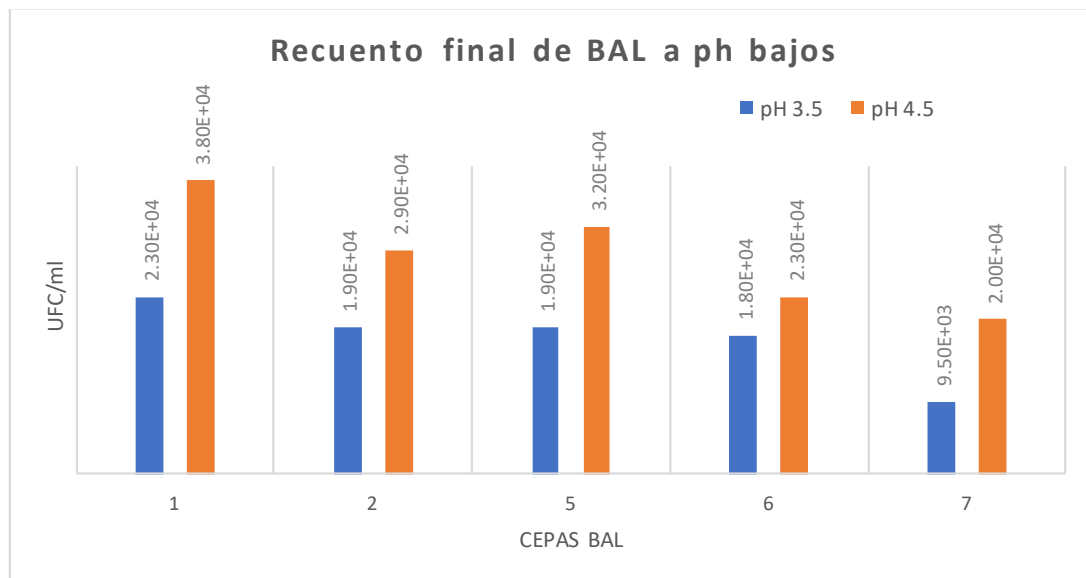


Gráfico 3: El recuento final de cepas BAL en caldo MRS ajustados a diferentes concentraciones de pH.



Figura 10: Crecimiento y resistencia de BAL en caldo MRS con pH 4.5 después de las 12 horas de incubación a 37°C.

4.2.3. Tolerancia a sales biliares

Igualmente, que la anterior prueba las cepas que no lograron adecuarse a ninguna concentración de Ox-Bile, fueron descartadas definitivamente estas son 03, 04, 08, 09 y 10.

El gráfico 04, nos indica la estimación inicial en UFC/ml de cepas en esta prueba confirmaremos la resistencia y viabilidad de las BAL en simulación al tracto gastrointestinal.

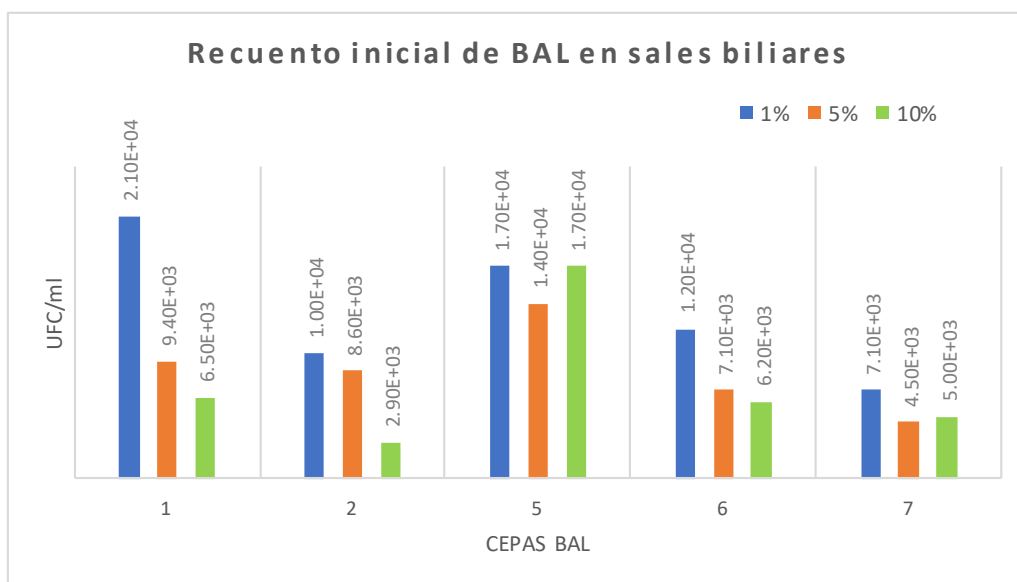


Gráfico 4: El crecimiento de las cepas BAL en distintas concentraciones de Ox-Bile, se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO_{600}) antes de la incubación por 12 horas.

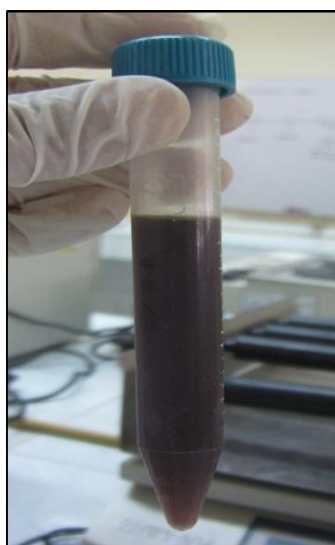


Figura 11: Concentración de BAL (DO_1) e inoculación a diferentes concentraciones de sales biliares.

El gráfico 05, se observa diferencias claras entre las cepas BAL. La cepa 05 posee mayor resistencia demostrando un alto crecimiento a $1.10E+04$ UFC/ml al 1% y $7.00E+03$ UFC/ml al 5%, seguido por 06, 01, 02 y 07 donde las cepas tuvieron un crecimiento medio resistiendo así las condiciones hostiles presentadas. Sin embargo, al 10% no pudieron resistir, no se encontró crecimiento alguno de ninguna cepa.

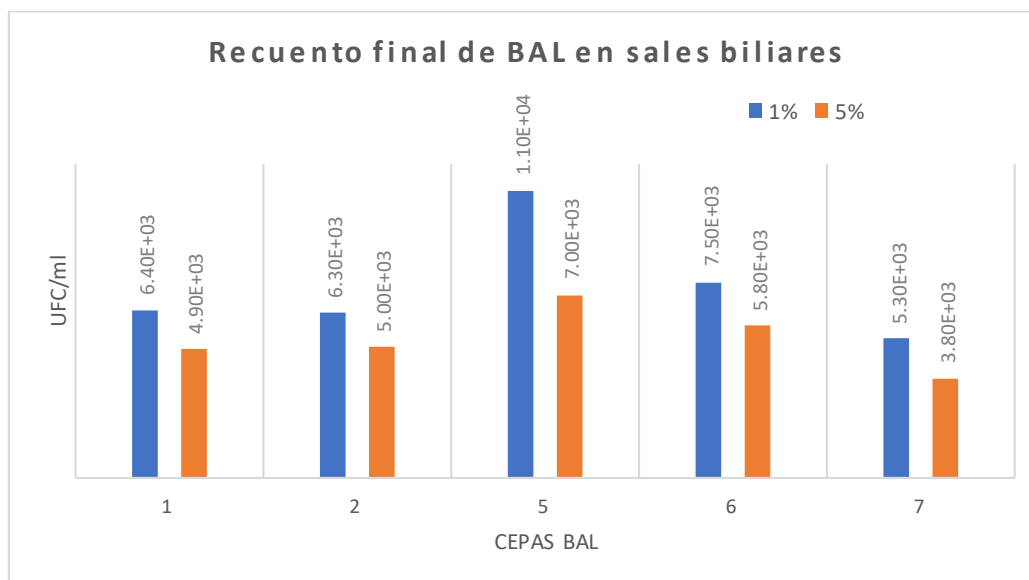


Gráfico 5: Cepas BAL evaluadas y seleccionadas demostraron nuevamente sobrevivir a 1 y 5% de sales biliares.

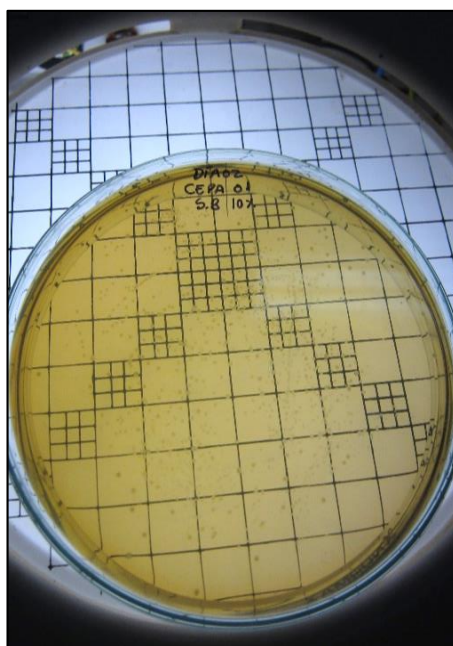


Figura 12: Recuento de UFC de BAL en un medio de cultivo MRS con sales biliares después de las 12 horas de incubación a 37°C .

4.2.4. Tolerancias a altas concentraciones de NaCl

Las cepas 03, 04, 08, 09 y 10 que no lograron resistir altas concentraciones de Cloruro de sodio, fueron descartadas.

La concentración de cepas BAL se determinó por medio del espectrofotómetro UV a 600 nm. Posterior a eso fueron sembradas en caldo MRS con distintas concentraciones de NaCl 5, 9, 13% (p/v) la cual determinó la resistencia y la viabilidad de crecer en estos medios. El resultado del gráfico 06, presenta la estimación inicial en UFC/ml en donde la cepa 05 presentó mayor cantidad de UFC/ml inicialmente antes de ser incubadas a 37°C por 24 horas.

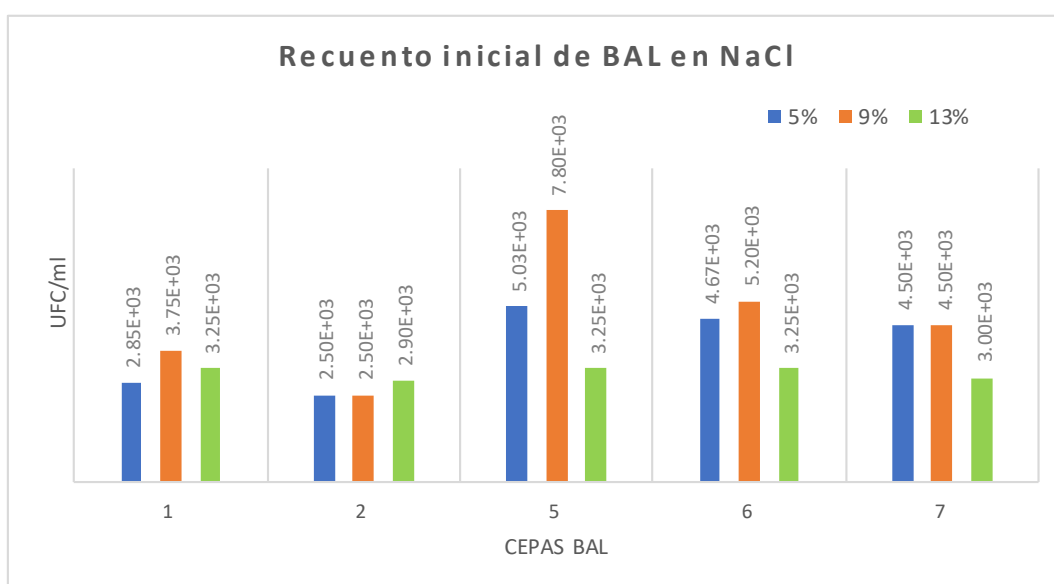


Gráfico 6: Recuento inicial de cepas BAL en caldo MRS a diferentes concentraciones de NaCl.

Los resultados del gráfico 07, demuestra que la cepa 05 presentó mayor tolerancia y crecimiento en todas las concentraciones realizadas, evidenciando así el poder de resistir las pruebas bioquímicas aplicadas en esta investigación. Las cepas 01, 06 mostraron un crecimiento paralelo en todas las concentraciones, la cepa 07 su crecimiento fue la menor de todas pero considerable para las pruebas. En tanto la cepa 02 mostró no resistir concentraciones altas a 9 y 13% (p/v).

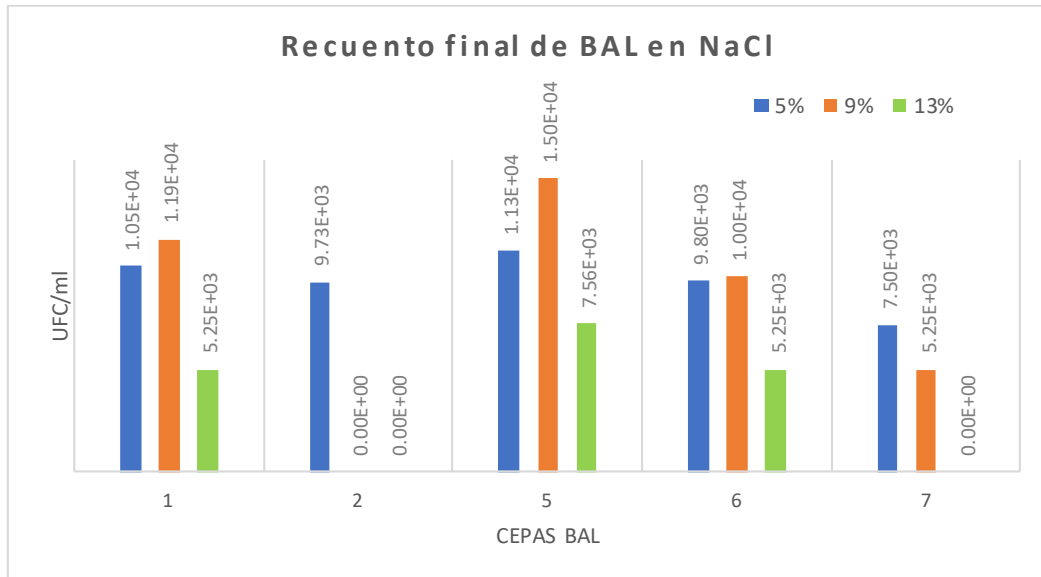


Gráfico 7: Resistencia y viabilidad de cepas BAL incubadas a 37°C por 24 horas en caldo MRS en NaCl de 5, 9 y 13%.



Figura 13: La cepa 02 no demostró resistencia al caldo MRS en altas concentraciones de NaCl al 9 y 13%.

4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS.

Para evaluar el efecto de inhibición frente a la bacteria patógena. Se realizó pruebas en placa, con las cepas BAL y los sobrenadantes de los cultivos.

4.3.1. Método de capa doble: visualizar la inhibición

Los resultados muestran el efecto de inhibir a bacterias patógenas indicadoras en diferentes intensidades. Algunas cepas como 02 y 05 mostraron tener mayor inhibición en todas las patógenas ya que no se observó crecimiento de estas, mientras que las otras su intensidad es variada según al tipo de bacteria patógena con la que se enfrentó.

Esta inhibición se debe a los productos metabólicos que desarrollan las cepas debido a la producción de acidez.

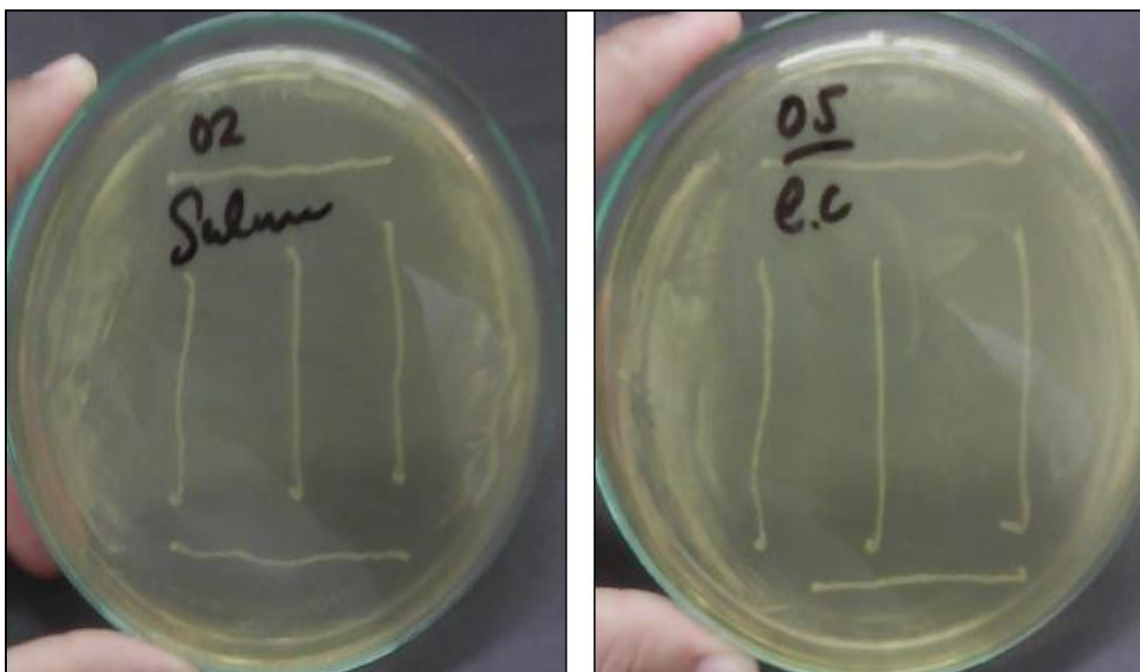


Figura 14: Las cepas 02 y 05 mostraron visualmente tener mayor inhibición contra las patógenas de *Shigella flexneri* (B) y *Escherichia fergusonii* (A).

Induciendo al inicio que las cepas patógenas conservadas podrían ser *Salmonella* y *E. coli*, por la observación de las colonias obtenidas al inicio de la investigación.

4.3.2. Método directo o por contacto

Se sembró la cepa BAL en agar MRS por técnica de hisopado, paralelamente en agar Mueller Hinton se sembró 25µl de la cepa patógena por técnica de superficie. De la placa con BAL se extrajo bocados circulares de 6mm de diámetro y se colocaron en la placa con el patógeno.

4.3.3. Método de pocillo

a. Sin neutralizar

Se realizó la medición de pH a las cepas BAL para después obtener el sobrenadante.

Tabla 4: Medición del pH del sobrenadante de cada cepa BAL.

Cepas	01	02	05	06	07
<i>pH</i>	4.47	4.48	4.46	4.55	4.47

Los resultados del pH promedio de 4.486 evidenciaron la presencia y el efecto de actividad antagónica (halos de inhibición) alrededor de las perforaciones, indicando la sensibilidad de las cepas patógenas frente a la producción de ácidos orgánicos (sobrenadante) de las cepas BAL sembradas en el caldo MRS.

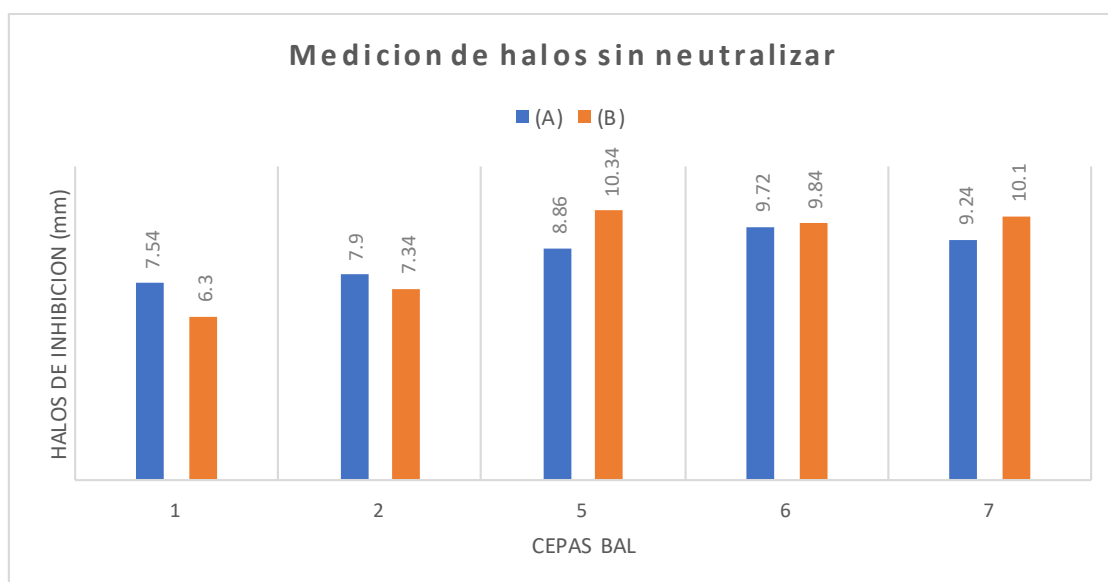


Gráfico 8: La lectura del grado de antagonismo se realizó midiendo el diámetro de los halos en mm. La cepa 05 presentó mayor poder de inhibición frente a las cepas patógenas (A) y (B). Seguido por la cepa 06, 07, 02 y 01.

b. Neutralizada

Las BAL también producen sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica (O'keeffe et al., 1999); (Requena y Peláez, 1995). Estas sustancias proteicas exhiben un modo de acción bactericida o bacteriostático (Pilet et al., 1995; O'keeffe et al., 1999). Algunas son simples proteínas, mientras que otras son moléculas complejas con componentes lipídicos o carbohidratos (Medina et al., 1992). Los sobrenadantes se probaron ajustados a un pH de 6.5 – 7, con el fin de excluir que la inhibición se diera por la producción de los ácidos orgánicos. Se ajustó el pH de los sobrenadante de cada cepa BAL para la evaluación.

Tabla 5: Medición del pH neutralizado de los sobrenadante de cada cepa BAL.

Cepas	01	02	05	06	07
pH	6.88	6.94	7.06	7.09	7.00

En los resultados hubo una ligera presencia de halo de inhibición con *Shigella flexneri*, pero se presentaron halos con *Escherichia fergusonii* en las pruebas realizadas, mostrando menores halos producidos por las bacterias sin neutralizar. Se reporta que las BAL producen sustancias peptídicas que producen un modo de acción bactericida (Vélez et al., 2015a). Se sugiere que la presencia del ácido láctico es necesaria para inhibir patógenos (Cástulo et al., 2008).

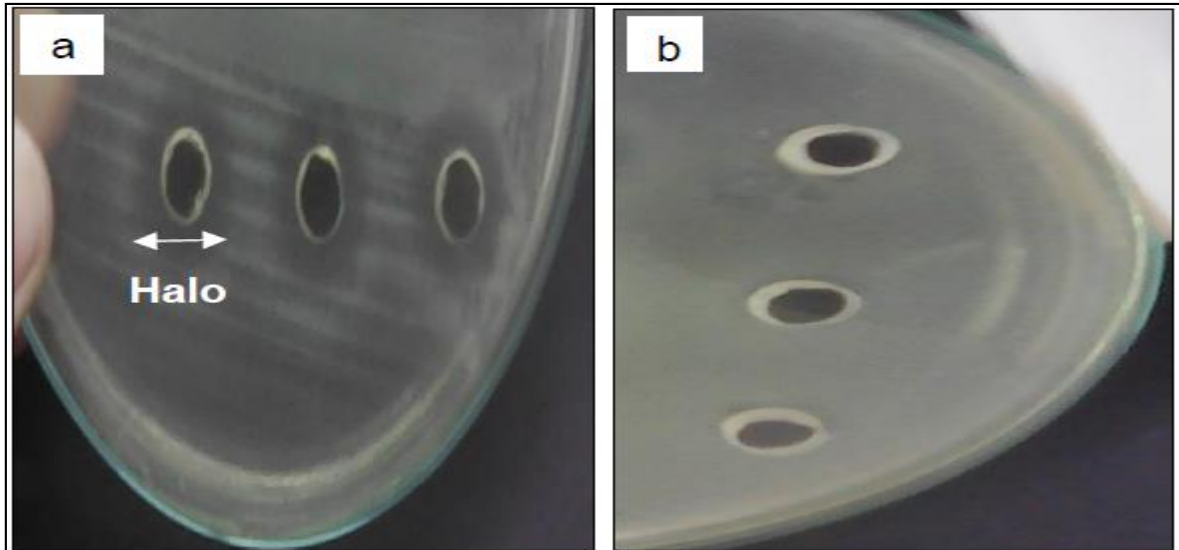


Figura 15: a) Efecto inhibitorio de los sobrenadantes acidificados por la producción de ácidos orgánicos. b) sobrenadantes neutralizados con HCL tuvieron un ligero halo pero en menor tamaño que la prueba sin neutralizar.

Tabla 6: Tamaño de halo de las pruebas de inhibición de BAL contra los patógenos de *Shigella flexneri* y *Escherichia fergusonii*

Cepas	<i>Escherichia fergusonii</i>			<i>Shigella flexneri</i>		
	Directo	Sin neutralizar	Neutralizado	Directo	Sin neutralizar	Neutralizado
01	6.52 ± 0.132	7.54 ± 0.43	6.85 ± 0.36	6.00	6.30 ± 0.56	6.00
02	6.94 ± 0.44	7.90 ± 0.078	7.10 ± 0.60	6.00	7.34 ± 0.05	6.00
05	8.46 ± 3.02	8.86 ± 0.62	8.76 ± 3.80	6.9 ± 0.45	10.34 ± 0.13	7.34 ± 0.89
06	8.33 ± 2.70	9.72 ± 1.88	8.52 ± 3.17	6.72 ± 0.25	9.84 ± 0.40	6.84 ± 0.35
07	8.25 ± 2.53	9.24 ± 0.60	8.65 ± 3.51	6.24 ± 0.02	10.10 ± 2.0	7.10 ± 0.60

Las cepas 5, 6 y 7 (*Enterococcus faecium*) evaluados, presentaron en los tres métodos los mayores halos frente a *Escherichia fergusonii*, siendo el método del pocillo sin neutralizar las que generaron mayores halos, parecidos a los ya reportados (Vélez et al., 2015a).

4.4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS MOLECULAR

4.4.1. Secuenciación de ADN

Cepas probióticas:

Para la cepa BAL 01 es semejante a *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 RNA, con identidad de 99%, cobertura de 100% de la secuencia nucleotídica.

CACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAA
TACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTTGG
CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC
GGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCAC
AATGGAAGTGGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGA
AGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAG
TAACTGTTACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTT
CGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAA
GAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGC
TCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCG
TAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGA
GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCT
TAGAAAATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGT
CGTCGTACCTCCTGTCCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGC
AAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGT
AGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CCATGGGAGTTTGTAACGCC

Entre las cepas 02 con cepa 05, igual la cepa 06 y cepa 07 son similares resultando ser *Enterococcus faecium* NBRC 100486, con identidad de 99%, cobertura de 100% de la secuencia nucleotídica.

GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGA
TAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGT
TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTG
CATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGAC
CGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTG
TTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAA
CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG
TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTT
TCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAG
TGACAGGTGGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTT
GGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGC
TTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAT
CGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC GGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAG

Cepas patógenas:

La primera muestra extraída (A) es semejante a *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 RNA, con identidad de 99%, cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica.

CTTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGC
CTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT

CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGC GTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAG
TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACG
TTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAT
ACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC GTAAAGCGCACGCA
GGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
TG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGC GAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGA
GGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCTGGTCTTGACATCCACAGA ACTTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG
GGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGC
GGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA
CCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCC GTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAA
TAGAAGT.

En la segunda muestra extraída (B) de las bacterias patógenas es semejante a *Shigella flexneri* ATCC 29903 RNA, con identidad de 99%, cobertura de 100% de la secuencia nucleotídica.

AGCTTGCTGTTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAA
ACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT
AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGAT
GTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG

ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGAC
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCA
TTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGAC
TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTC
GACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGA
AGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGT
GCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
TGTGAAATGGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
GTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACT
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
CTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAG
CAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG
GTTGCAAAGAAGT

A continuación, se detalla a las bacterias encontradas en la secuenciación de ADN.

Tabla 7: Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas extraídas de la parte final del tracto digestivo del lechón.

Cepas	Tamaño de secuencia (pb)	Especie identificada	Identidad %	N° de accesión
BAL 01	1371	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99	NR075036.1

BAL 02	1328			
BAL 05	1344	<i>Enterococcus faecium</i>	99	NR113904.1
BAL 06	1366			
BAL 07	1383			
(A)	1352	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	NR074902.1
(B)	1359	<i>Shigella flexneri</i>	99	NR026331.1

Las cepas BAL encontradas e identificadas molecularmente, con capacidad probiótica están acondicionadas para su utilización en la producción de inóculos lácteos para la alimentación porcina.

4.5. EVALUACIÓN DEL INÓCULO LÁCTEO

4.5.1. Evaluación físico-química (pH y acidez)

Las cepas 01, 02, 05, 06 y 07 fueron seleccionadas como probióticas al caracterizarse y resistir los análisis anteriores. Estas fueron inoculadas para la obtención del yogur probiótico. Se realizó el estudio del comportamiento de las cepas BAL en dos recipientes con 500ml leche en combinación de cultivos mixtos. El primer recipiente se inoculo las cepas 01, 02 y 05 y el segundo está comprendido por las cepas 01, 05 y 06.

En la siguiente tabla N° 8 se presentan los valores iniciales y finales durante su almacenamiento.

Tabla 8: Evaluación de pH y acidez de los inóculos lácteos (yogur) a diferentes días de almacenamiento a 4°C.

RECIPIENTE 01			RECIPIENTE 02		
Días	pH	Acidez %	Días	pH	Acidez %
0	4.65	0.80	0	4.94	0.47
5	4.61	0.86	5	4.88	0.50
10	4.57	0.90	10	4.82	0.55
15	4.53	0.93	15	4.78	0.58

La norma del CODEX para leches fermentadas, CODEX STAN 243–2003 (revisada, 2008, 2010) menciona que todos los yogures deberán tener un pH ≤

a 4.6. Durante los 15 días de almacenamiento se observó un descenso de pH y aumento acidez adecuada para el primer recipiente, sin embargo el segundo recipiente la disminución del pH fue lenta a igual que la producción de acidez, sin poder llegar a los rangos establecidos.

De acuerdo a lo establecido por la NTP 202.092:2014, la acidez para el yogur entero expresada en g de ácido láctico % se encuentra entre 0.6 – 1.5. El resultado de la muestra extraída del recipiente 01 está en un rango aceptable por la norma. El recipiente 02 muestra que la poca acidez presentada se debió a que el pH disminuye lentamente. Según (Adams y Moss, 1997), señalan que el almacenamiento bajo refrigeración detiene el crecimiento de las cepas BAL, sin embargo la acidez continua lentamente por su actividad residual. También (Rojas et al., 2007) señala que la formación de ácido láctico está enlazadas con el descenso del pH que tiene lugar no solo en la incubación, sino también durante el almacenamiento del yogur, pues las BAL quedan viables, aunque en este último caso el descenso es menos debido al efecto de la baja temperatura.

4.5.2. Evaluación físico-química (Sinéresis)

El grado de sinéresis medido de los inóculos lácteos (yogur) aumentó durante su almacenamiento debido a la pérdida de estabilidad, retención de agua y sus componentes. En la tabla N° 9 se presentan los valores de la evaluación del grado de sinéresis durante su almacenamiento.

Tabla 9: Evaluación del grado de sinéresis durante el almacenamiento de los inóculos lácteos (yogur) a 4°C.

RECIPIENTE 01		RECIPIENTE 02	
Días	Sinéresis %	Días	Sinéresis %
0	0.36	0	0.39
5	0.49	5	0.45
10	0.55	10	0.53
15	0.61	15	0.58

Según (Díaz-Jiménez et al., 2004) la baja concentración de sinéresis de algunos yogures en almacenamiento se debe a la incorporación de fibra que ayudo a evitarla. También (Peng et al., 2009), menciona que el contenido de sólidos en un yogur con textura fuerte ayuda a prevenir la separación de lactosuero.

4.5.3. Evaluación microbiológica

Viabilidad de BAL

El medio de cultivo utilizado para el recuento de las BAL resultó adecuado permitiendo el crecimiento selectivo de los probióticos estudiados. Los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

Tabla 10: Recuento viable de BAL en inóculo lácteo durante el almacenamiento de los inóculos lácteos (yogur) a 4°C.

<i>RECIPIENTE 01</i>		<i>RECIPIENTE 02</i>	
<i>Días</i>	<i>UFC/g</i>	<i>Días</i>	<i>UFC/g</i>
0	4.8x10 ⁶	0	2.8x10 ⁴
5	1.5x10 ⁷	5	7.4x10 ⁴
10	2.7x10 ⁷	10	9.6x10 ⁴
15	3.9x10 ⁷	15	1.1x10 ⁶

En el primer recipiente del inóculo lácteo la incorporación de la mezcla de cultivos mixtos muestra un aumento progresivo de microorganismos probióticos a partir del inicio hasta final de los 15 días de almacenamiento. Mientras que en el segundo recipiente la viabilidad de los microorganismos fue lentamente su crecimiento de los probióticos. El recuento de las BAL en ambas mezclas es semejante a lo que recomienda la NTP 202.092:2014, utilizando el método de ISO 7889:2003 (IDF 117:2003) para la preparación de yogures (Simanca et al., 2013), considerando como mínimo para números de microorganismo de bacterias lácticas totales durante su vida útil de 10⁷ UFC/g, obtenidos en las mezclas a los 15 días de refrigeración (3.9x10⁷ UFC/g y 1.1x10⁶ UFC/g).

El aislamiento y resistencia de las BAL las pruebas bioquímicas fueron el siguiente perfil: catalasa negativa, no productoras de gas, resistente a valores bajos de pH, sales biliares y tolerancia a NaCl. Los efectos han sido investigados por diferentes autores (Jurado et al., 2009; Vélez et al., 2015b), como pasos obligados para la selección de cepas. Igualmente en esta investigación, se aislaron cepas BAL obtenidas de la parte final del tracto digestivo del lechón para la caracterización de cepas probióticas demostrando: prueba oxidasa y catalasa negativa, cepas no productoras de gas, resistencia y crecimiento a pH bajos de 3.5 y 4.5 con un recuento de $3.80E+04$ UFC/ml, como lo es también en Ox-Bilis manifestó resistencia con un crecimiento de $1.10E+04$ UFC/ml y tolerancia a NaCl con $1.50E+04$ UFC/ml.

Se encontró que la presencia de bacterias probióticas es necesaria para la inhibición de microorganismos patógenos al probar los sobrenadantes sin neutralizar, el efecto antagónico fue atribuido por los ácidos orgánicos. Según (Jurado et. al., 2009), el género *Lactobacillus* ssp., reúnen las características de uso probiótico para el uso potencial como probióticos en pruebas realizadas para causar la pérdida de actividad en bacterias patógenas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*.

Con respecto a las bacterias encontradas e identificadas molecularmente. (Martín, 2016), menciona que el consumidor actualmente demanda de alimentos menos procesados, más naturales y mayor tiempo de vida útil. Es así que la utilización de la reuterina, como compuesto antimicrobiano producido por algunas cepas de *L. reuteri* sea utilizado como un bioconservante en alimentos RTE (ready-to-eat), añadiéndose en forma individual y en combinación con otros dos bioconservantes, comprobándose su efecto antimicrobiano de la reuterina producida in situ mediante la adición de *L. reuteri* INIA P572 en la elaboración de productos lácteos. Su potencial probiótico también se evaluó frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* en jamón cocido y salmón ahumado.

Por otro lado, (Gardiner et al., 1999), evaluó la eficacia de la cepa *Enterococcus faecium* PR88 en su idoneidad como un complemento inicial para la fabricación de queso Cheddar manteniendo su viabilidad a niveles de 3×10^8 UFC/g durante

09 meses de maduración. Observando una mayor proteólisis, niveles altos de compuesto volátiles activos al olor y sin afectar la composición del queso en su sabor, aroma y textura. También (Scharek et al., 2005), menciona que las bacterias encontradas e identificadas molecularmente como *Enterococcus faecium*, son utilizadas como probióticos en la alimentación de cerdas y lechones sobre el sistema inmune y la colonización intestinal de linfocitos intestinales ejerciendo funciones de defensa en el organismo.

En la evaluación del inóculo lácteo, el descenso de pH para el primer recipiente fue óptimo desde el primer día de almacenamiento con un pH de 4.65, así mismo la norma del CODEX STAN 243–2003, refiere que todos los yogures deben tener un $\text{pH} \leq 4.6$, (Hattingh y Viljoen, 2001; Rojas et al., 2007; Reyes y Vélez, 2015) señalan que el ácido láctico está vinculado con el descenso del pH, no solo en la incubación sino también durante su almacenamiento. (Rivera, 2002) manifiesta que el pH del yogur baja en función al tiempo que se realiza la producción de ácido láctico, por acción de las BAL que intervienen en la degradación de la lactosa en lactato y ácido láctico. La NTP 202.092:2014, señala que la acidez del yogur se encuentra entre 0.6 – 1.5 %, cumpliendo con establecido el inóculo lácteo del primer recipiente, mientras que el segundo recipiente muestra poca acidez debido a la disminución lenta del pH.

El grado de sinéresis evaluado en los inóculos lácteos aumento durante su almacenamiento debido a la separación innecesaria de agua y sus componentes entre 0.36-0.61% el primer recipiente y el segundo 0.39-0.58%. Según (Molina, 2009), la adición y comparación de tres estabilizantes comerciales utilizados en la elaboración de yogur y almacenados durante cuatro semanas, se observaron que las pérdidas de líquido (sinéresis) fueron muy bajas de 0.12 a 0%. También (Reyes y Vélez, 2015), menciona que la adición de microcápsulas de ácidos grasos en yogur y almacenado por tres semanas en refrigeración. Muestran que los componentes de las microcápsulas, como la goma arábica y la maltodextrina, favorecieron la acción de retención de agua, debido a que contribuyen al efecto de malla en la red tridimensional del gel formado en el yogur.

De acuerdo a la NTP 202.092:2014, utilizando el método ISO 7889:2003 (IDF 117:2003) menciona que para la enumeración de microorganismo característicos de las bacterias lácticas totales sea mínimo de 10^7 UFC/g durante su período de vida útil. Los inóculos lácteos almacenados en refrigeración por 15 días mostraron alcanzar el 3.9×10^7 y 1.1×10^6 UFC/g garantizando que el producto elaborado contiene bacterias probióticas que conservan su viabilidad y actividad probiótica durante el almacenamiento. Por otro lado (Zapata et al., 2015) demuestra que el efecto del tiempo de almacenamiento del yogur saborizado con mortiño revelaron una concentración de 10^6 UFC/g manteniéndose los 16 primeros días, cumpliendo con la NTC 805 requisitos de bacterias viables lácticas totales, al final de la vida útil.

CONCLUSIONES

Las características macroscópicas de cada BAL como: la visualización de colonias, tipo y grupo bacteriano, ayudan de manera inicial a la caracterización de cepas de acuerdo a los diferentes resultados beneficiosos que tienen.

En la caracterización bioquímica son de gran importancia en el crecimiento y supervivencia de las BAL en el tracto gastrointestinal. Consideradas como una condición para evaluar las cepas probióticas.

El mecanismo de los halos de inhibición por la actividad antagónica contra los patógenos destaco por la producción de ácidos orgánicos en los sobrenadantes sin neutralizar de las cepas BAL con 24 horas de fermentación de carbohidratos.

Para obtener ADN puro de las cepas BAL es necesario la complementación de factores importantes como: un buen rendimiento de los kits comerciales a utilizar, la cantidad adecuada (25-30µg) de muestra a evaluar y el buen desempeño de las técnicas en el área de biología molecular.

Las muestras de las cepas BAL fueron analizadas mediante el análisis de PCR, utilizándose un termociclador las muestras fueron sometidas a 30 ciclos: 94°C por 30 segundos (desnaturalización ADN), 55°C por 45 segundos (hibridación o alineamiento de cebadores), 72°C por 1 min (extensión, amplificación en copias del genoma de ADN) y un paso final a 72°C por 4 minutos (reparación de la hebra del ADN).

Se logró elaborar un inóculo lácteo (yogur) firme con cepas nativas de la parte final digestiva del lechón, mediante un proceso sencillo y adecuado, monitoreando el comportamiento de las cepas BAL, con un pH y acidez adecuados. Además, se

descubrió el aumento de sinéresis por la falta de retención de agua y sus componentes, la viabilidad de las cepas BAL fueron óptimas por los 15 días de vida útil del producto.

RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomienda verificar el tipo de fermentación que presenten las BAL como homofermentativas o heterofermentativas, como base en el producto final de su fermentación y así confirmar las cepas con mayor producción de ácido láctico.

Se debe realizar la conservación de cepas BAL utilizando temperaturas bajas -20°C y glicerol al 30% como crioprotector.

Se recomienda utilizar los inóculos lácteos dentro de los 15 días establecidos para así evitar una post-acidificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. (Asociación de Química Analítica Oficial). (1990). Métodos oficiales de Análisis. 15 ed. Washington DC., EE.UU.
- Adams M. & Moss M. (1997). Microbiología de los Alimentos. Acribia, Zaragoza, España. 317-330.
- Aguilar G. (2012). Técnicas y métodos de aislamiento y selección de microorganismos. Recuperado el 04 de Octubre del 2016, de <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos>.
- Alais C. (1998). Ciencia de la Leche. Compañía Editorial Continental, S.A. España.
- Alejos L., Aragón M. & Cornejo A. (2004). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 1-25.
- Ankenman L. & Morr C. (1996). Mejora el ácido, el sabor y la producción de compuestos volátiles en un alto contenido en proteínas y fibra de yogur de leche de soja como producto. *Revista de ciencia de los alimentos*, 61 (2), 331-336.
- Ávila J., Ávila M., Tovar B., Brizuela M., Perazzo Y. & Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20 (2), 161-169.
- Axelsson L. (1998). Bacterias del ácido láctico: clasificación y fisiología. en: bacterias del ácido láctico, microbiología y aspectos funcionales. Marcel dekker inc. 1-72.

- Baumforth K., Nelson P., Digby J., Neil J. & Murray P. (1999). Desmitificado la cadena de la polimerasa reacción. *Mol Pathol.*, 52, 1-10.
- Blum S., Álvarez S., Haller D., Pérez, P. & Schiffrin J. (1999). Microbiota intestinal y la interacción con inmunocompetente Células. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 199-205.
- Botero M., Toro D. & Castaño J. (2011). Manual práctico de microbiología general. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Carr F., Chill D. & Maida N. (2002). Las bacterias del ácido láctico: una encuesta de literatura. *Revisiones críticas en microbiología*, 28 (4), 281-370.
- Cástulo I., Gómez H, Alaníz R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *Revista digital científica y tecnológica*, 6, 1-17.
- Conway P. (1994). Proc. VI simposio internacional de fisiología digestiva en cerdos. Publicacion de EAAP. Ban Doberan – Alemania. 231-240.
- Díaz-Jiménez B., Sosa M., & Vélez J. (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Revista mexicana de ingeniería química*, 03 (3), 287-305.
- Dilworth B. & Day E. (1978). Lactobacillus culturas en las dietas de crianza. *Ciencia avícola*, 57, 1101-1104.
- Fennema O. (2000). Química de los alimentos. Editorial Acribia. 2ª edición Zaragoza (España)
- Flores H., Maida R., Solís H., Illescas E. & Zavala F. (2009). Identificación molecular de bacterias causales mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR. 148-155.
- Fox S. (1988). Probióticos: intestinales inoculantes para animales de producción. 83 (8), 806-810.
- Fuller R. (1989). Probióticos en el hombre y los animales. *Bacteria aplicada*, 66, 365-78.

- García H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.*, 1 (2), 31-41.
- Gardiner G., Ross R., Wallace J., Scanlan F., Jägers P., Fitzgerald G., Collins K. & Stanton C. (1999). Influencia de un cultivo adjunto de probióticos de *Enterococcus faecium* en la calidad del queso cheddar. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (12), 4907-4916. doi: 10.1021/jf990277m.
- Hattingh A. & Viljoen B. (2001). El yogur como alimento portador probiótico. *Revista internacional lechera*, 11, 1-17.
- Hernández A. (2003). Microbiología Industrial, productos lácteos. San José, Costa Rica, 1^{era} edición. EUNED. 296.
- Hernández C., Pantoja L. & Turriago S. (2002). Evaluación de la presencia de bacteriocinas en cultivos de bacterias ácido lácticas. Tesis para optar título de ingeniero de producción agroindustrial, Bogotá, Colombia.
- Illescas, C. (2001). Curso teórico práctico sobre lactología. Pp 13-17, 67-73.
- ISO 7889:2003 (2003) Yogur-Enumeración de microorganismos característicos - Técnica de recuento de colonias a 37°C.
- Jensen B. (1998). Ambiente intestinal de cerdos. *J. Anim. Feed Sci.*, 7, 45-64.
- Jurado H., Aguirre D. & Ramírez C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdo como alternativa al uso de antibióticos. *Revista mvz Cordova*, 1723-1735.
- Kurzak P., Ehrmann M. & Vogel R. (1998). Diversidad de bacterias de ácido láctico asociadas con patos. *Aplicado sistemáticamente Microbiología*, 21, 588-592.
- López L. & Torres C. (2006). Trabajo práctico N°06 Identificación. Universidad Nacional de Nordeste, Facultad de Agroindustrias. Microbiología general.
- López-Malo A. (2000). Manual de prácticas de análisis de alimentos. Universidad de las Américas. Puebla. México.
- MacFaddin J., Rondinone S. & Giovaniello O. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^{era} edición.

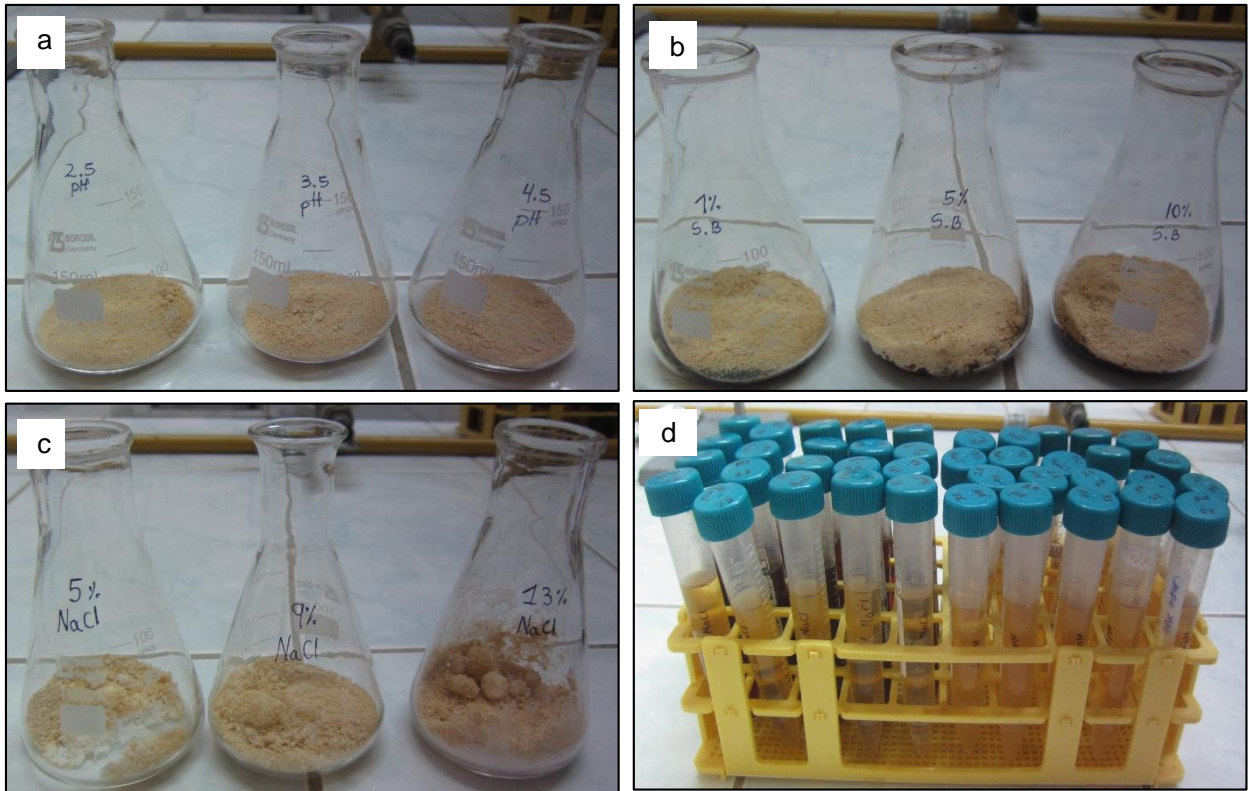
- Martín I. (2016). Potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* y aplicación de la reuterina como bioconservantes alimentario. Tesis para optar el grado de doctor, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Medina M., Gaya P. & Núñez M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista Española de Lechería*, 34, 28-32.
- Mogollón, C. R., Mogollón, G. O., Aguilera, R. A., Ortiz, J. Q., & Suárez, H. S. (2021). Production and evaluation of probiotic milk inocula obtained from the digestive tract of piglets (*Sus scrofa domesticus*) proposed for pig feed. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(1), 120–137. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V12I1.5445>
- Miles R. (1993). Manipulación de la microbiota del tracto gastrointestinal: formas naturales de prevenir la colonización por patógenos. En: Biotecnología en la alimentación Industria. *Publicaciones técnicas de Alltech*, 133-150.
- Miles, R., Arafa, A., Harms, R., Carlson, C., Ried, B. & Crawford, J.S. (1981). Efectos de una vida no liofilizada Cultivo de *Lactobacillus acidophilus* en Rendimiento, calidad del huevo y microbiota intestinal en capas comerciales. *Revista de ciencias avícolas*, 60, 993-1004.
- Molina I. (2009). Comparación de tres estabilizantes comerciales utilizados en la elaboración de yogur de leche descremada de vaca. Tesis para optar el título de licenciada zootecnista no publicada, Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, Guatemala.
- Monsalud R., Magbanua F., Tapay L., Hedreyda C., Olympia M., Migo V., Kurahashi M. & Yokota A. (2003). Identificación de cepas de vibrio patógenas y no patógenas de camarones y criaderos de camarón en Filipinas. *Revista de microbiología general y aplicada*, 49, 309-314.
- Mordenti A. (1986). Probióticos y nuevos aspectos de promotores de crecimiento en producción porcina. *Informe Zootécnico*, 32, 69-72.
- Mullis KB. (1990). El origen inusual de la polimerasa reacción en cadena. *Sci Am.*, 262 (4), 56-65.

- NTP LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS. (2014) Leches fermentadas, Yogur, Requisitos, 5ta edición, 11-28.
- Padilla F. (2006). Crianza de porcinos. Miraflores. Macro EIRL.
- Pardio V., Krzysatof N., Waliszewski K. & Robledo G. (1994). Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam Nutr.*, 6-10.
- Pauletti M., Santa Cruz L., Mazza G., Rozycki S., Sabbag N. & Costa S. (2004). Fabricación de yogur con células inmovilizadas. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos*, 4, 190-196.
- Peng Y., Serra M., Home D. & Lucey J. (2009). Efecto de la fortificación con varios tipos de proteínas de la leche sobre las propiedades reológicas y la permeabilidad del yogur sin grasa. *Revista de ciencias de los alimentos*, 74, 666-673.
- Penna F. (1998). Diarrea y probioticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Rev enfer infec ped.*, 11 (6), 182.
- Quemac M. (2014). Evaluación de tres dosis de probiótico (*rhodopseudomonas spp*, *lactobacillus spp*, *saccharomyces spp*) en la alimentación para el engorde de cerdos. Tesis para optar el título de ingeniería en desarrollo integral agropecuario. Universidad Politécnica Estatal del Carchi. Tulcan-Ecuador.
- Quiles A. (2004). Factores que indican en la mortalidad neonatal en los lechones. Departamento de producción animal. Facultad de veterinaria. Universidad de murcia. Murcia-España.
- Radecki S, Yokoyama M., Miller E., Ullrey D. & Lewis A. (1991). Nutrición porcina. Butterworth Heinemann. Boston, USA. 439-447.
- Requena T. & Peláez C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 35, 19-44.
- Revilla A. (1982). Tecnología de la Leche: Procesamiento, manufactura y análisis. Ed.IICA. San José-Costa Rica.

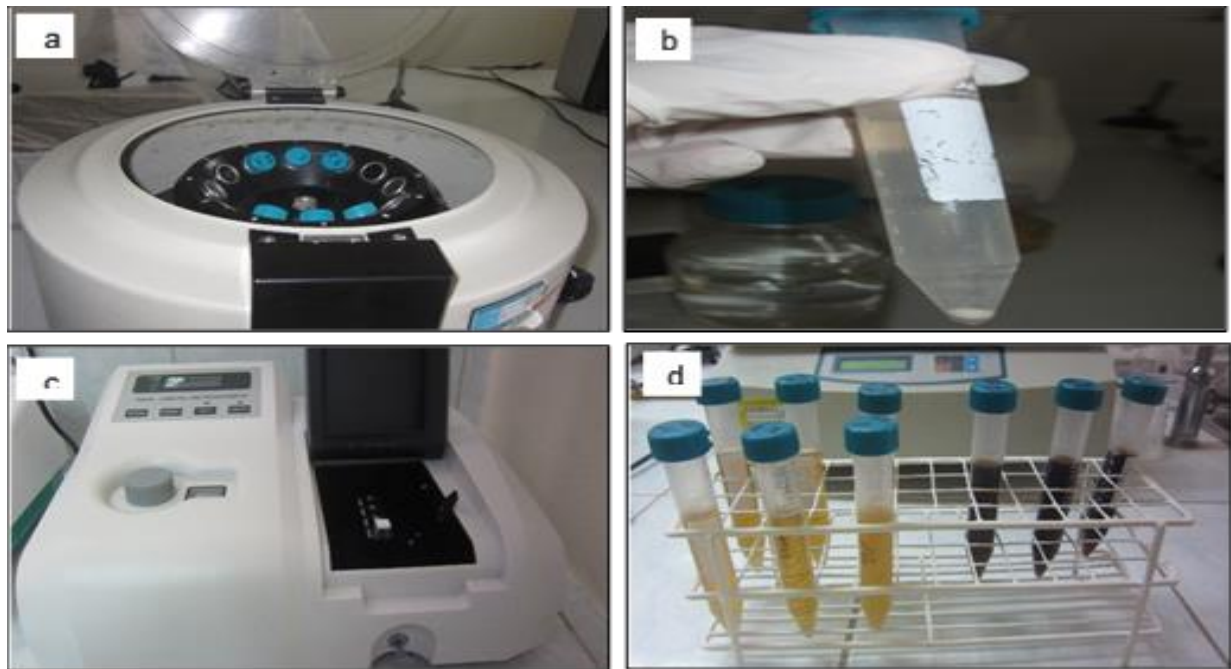
- Reyes C. & Vélez J. (2015). Propiedades fisicoquímicas y de flujo de un yogur asentado enriquecido con microcápsulas que contienen ácidos grasos omega-3. *Revista información tecnológica*, 26 (5), 87-96. doi: 10.4067/S0718-07642015000500012.
- Rivera S. (2002). Adición de cinco niveles de leche de soya (10, 20, 30, 40 y 50 %) en la elaboración de yogur. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias. ESPOCH, Riobamba, Ecuador.
- Rojas W., Chacón A. & Pineda M. (2007). Características del yogur batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Revista agronomía mesoamericana*, 18 (2), 221-237.
- Rondón J., Samaniego M., Bocourt R., Rodríguez S., Millán G., Ranilla J., 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. *Revista ciencia y tecnología alimentaria*, 6, 56-63. doi: 10.1080/11358120809487628.
- Ruiz J. & Ramírez A. (2009). Elaboración de yogur con probióticos (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina, *Revista facultad de agronomía*, 26, 223-242.
- Scharek L., Guth J., Reiter K., Weyrauch K.D., Taras D., Schwerk P., Schierack P., Schmidt M.F.G., Wieler L. & Tedin K. (2005). Influencia de una cepa probiótica de *Enterococcus faecium* en desarrollo del sistema inmune de cerdas y lechones. *Instituto de Inmunología y Biología Molecular*, 105, 151-161.
- Simn R., Rosmini M., Ehrmann M. & Vogel R. (2004). Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. *Revista FAVE*, 3, 1-2.
- Simanca MM, Andrade RD, Artega MR. (2013). Efecto del salvado de trigo en las propiedades físicoquímicas y sensoriales del yogur de leche de bufala. *Inf Tech*, 24(1), 287-305.

- Templeton NS. (1992). La reacción en cadena de la polimerasa. Historia, métodos y aplicaciones. *Rev. Diagn Mol Pathol*, 58-72.
- Tuomola M., Crittenden R., Playne M., Isolauri E. & Salminen S. (2001). Criterios de aseguramiento de calidad para bacterias probióticas. *Revista estadounidense de nutrición clínica*, 73, 393-398.
- Universidad Complutense de Madrid. (2016). Prácticas de secuenciación genética. Recuperado el 17 de octubre de 2016, de <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/avg/practicas/secuencia/secuencia.htm>
- Uribe J. (1998). Manejo del lechón. Manual porcino. Recuperado el 17 de octubre de 2016, de <http://www.ceba.com>.
- Vázquez S., Suárez H. & Zapata S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de nutrición*, 36, 64-71.
- Vélez J., Gutiérrez L. & Montoya O. (2015a). Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 68, 7481-7486. doi:10.156/rfnam.v68n1.47834.
- Vélez J., Gutiérrez L. & Montoya O. (2015b). Identificación molecular y evaluación de la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas aisladas del calostro de cerdas. *Rev. CES Med Zotec.*, 10 (2), 141-149.
- Yimin C., Puangpen S., Premuda S. & Yoshimi B. (1999). Clasificación y caracterización de bacterias ácido láctico aislados de los intestinos de los carpas y gambas de agua dulce. *Rev. J. Gen Appl. Microbiol.*, 45, 177-184.
- Zapata I., Sepúlveda U. & Rojano B. (2015). Efecto del Tiempo de Almacenamiento sobre las Propiedades Fisicoquímicas, Probióticas y Antioxidantes de Yogurt Saborizado con Mortiño (*Vaccinium meridionale Sw*). *Revista información tecnológica*, 26 (2), 17-28. doi: 10.4067/S0718-07642015000200004

ANEXOS



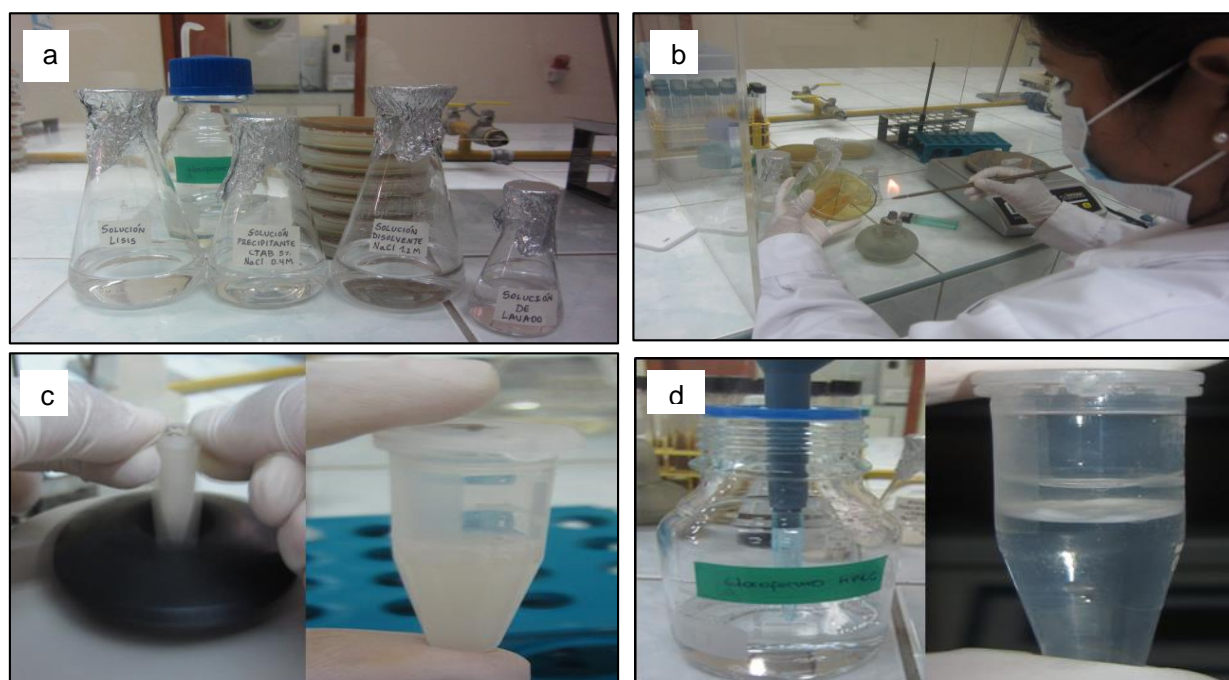
Anexo 1 Figura 15: Preparación de materiales para pruebas bioquímicas **a)** pH bajos **b)** sales biliares **c)** cloruro de sodio **d)** caldo MRS esterilizados con diferentes insumos



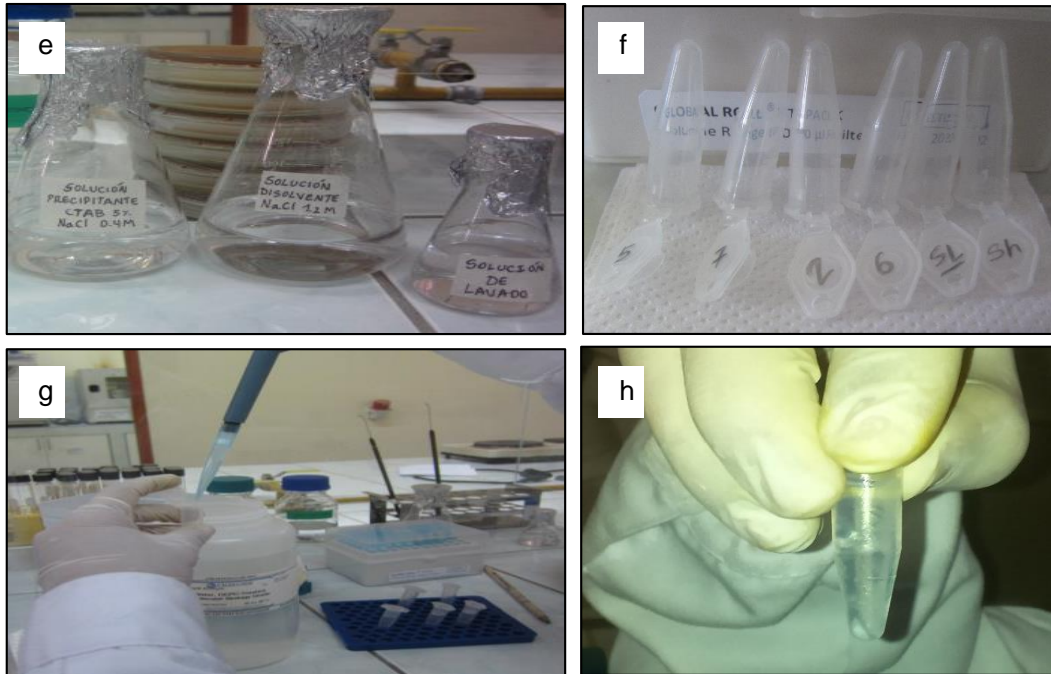
Anexo 2 Figura 16: **a)** y **b)** concentración de cepas BAL cultivadas en caldo MRS **c)** medición del crecimiento de BAL por densidad óptica **d)** cepas viables.



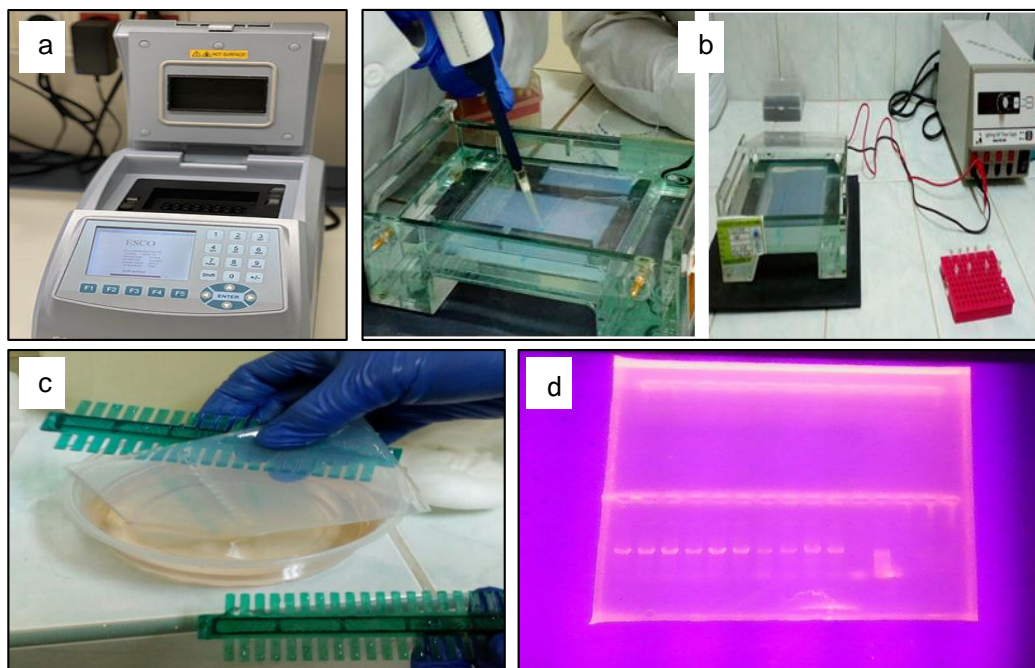
Anexo 3 Figura 17: Evaluación de la actividad inhibitoria **a)** método directo o capa doble **b)** evaluación del pH sin neutralizar y neutralizado **c)** centrifugación para obtener los sobrenadantes **d)** incorporación de sobrenadantes para el enfrentamiento con microorganismos patógenos.



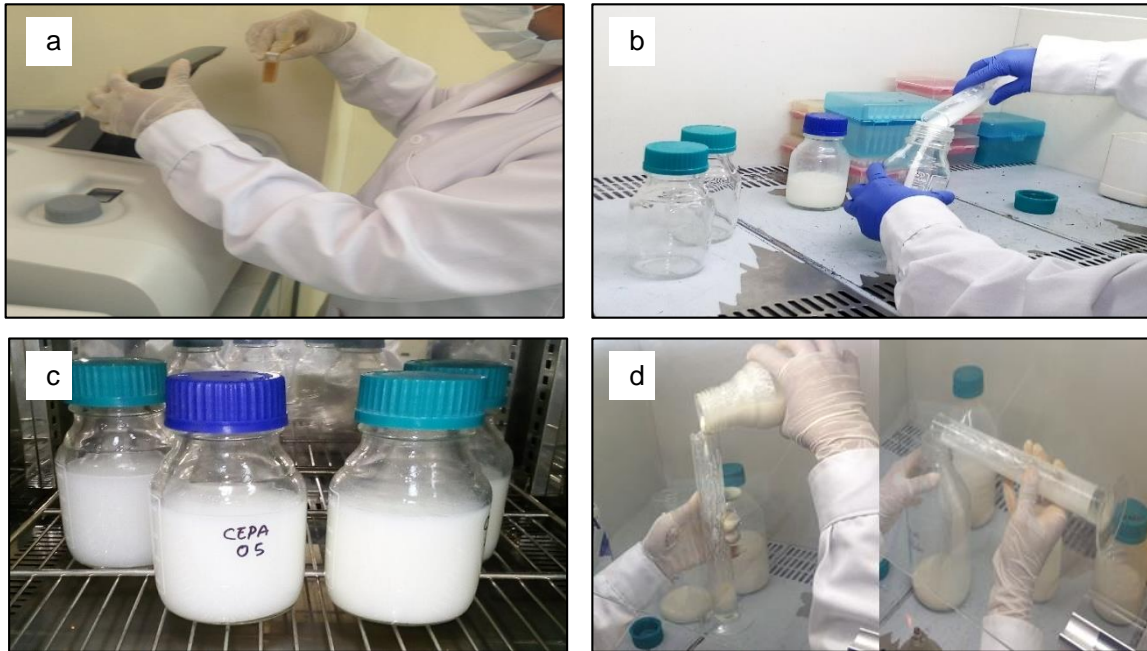
Anexo 4 Figura 18: Extracción de ADN **a)** reactivos empleados **b)** obtención de masa bacteriológica 25-30 mg **c)** adición de solución lisis DTAB **d)** incorporación de cloroformo HPLC.



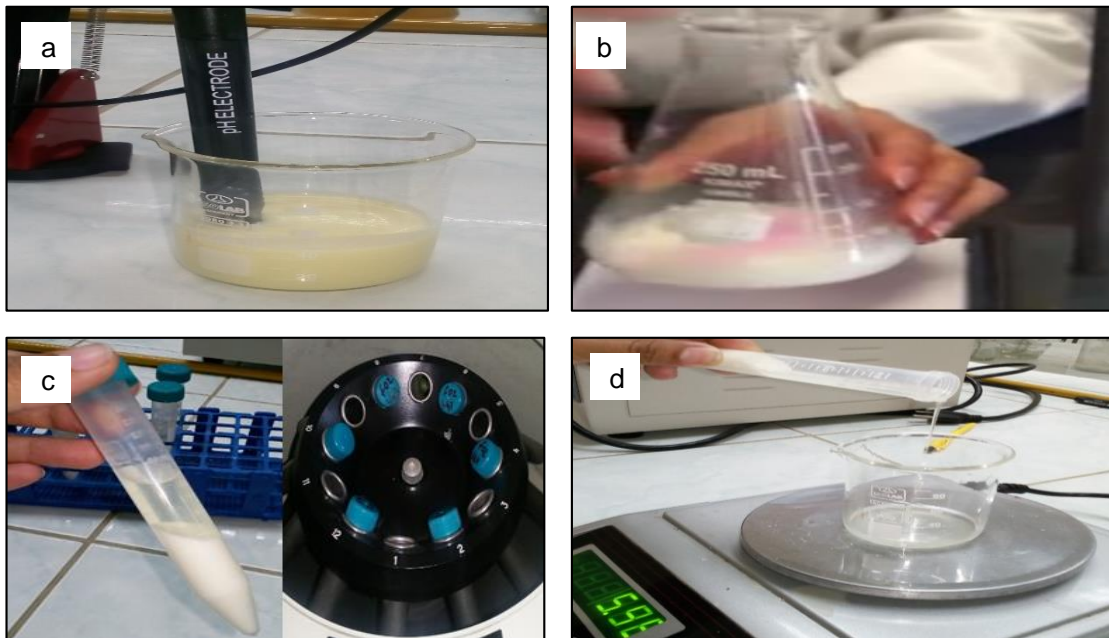
Anexo 5 Figura 19: e) adición de solución precipitante CTAB, para obtención del pellet ADN, solución disolvente NaCl y solución de lavado f) deshumedecer el pellet g) resuspensión con agua ultrapurificada h) ADN extraído y conservado a - 20 °C.



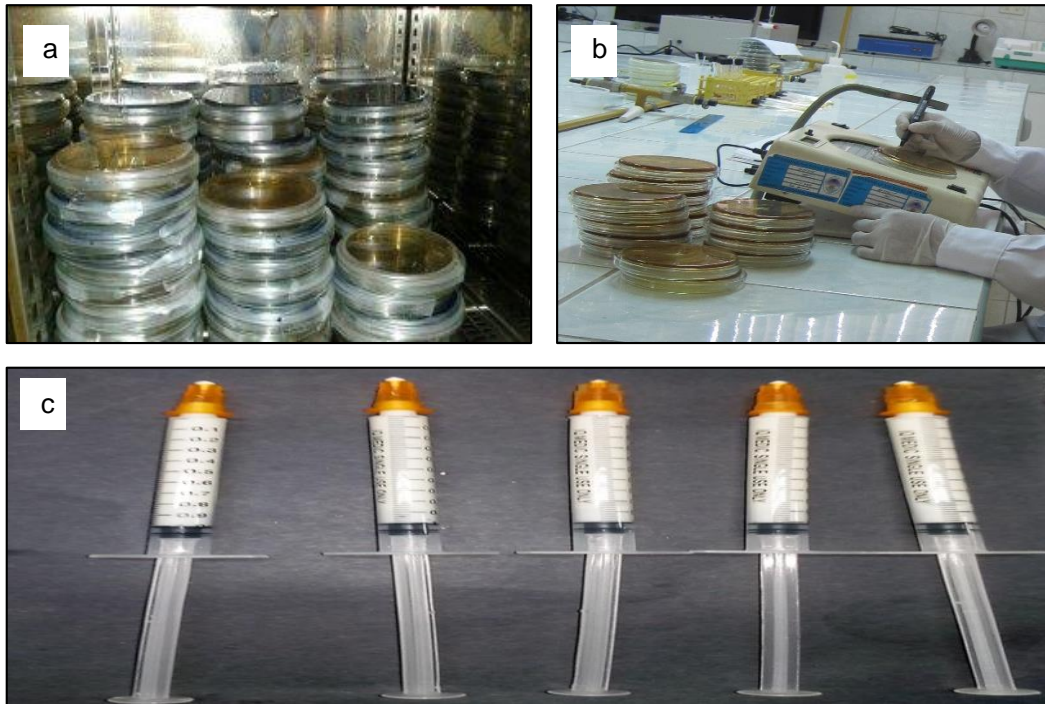
Anexo 6 Figura 20: a) amplificación de ADN por termociclador b) migración de ADN en gel agarosa por electroforesis c) inmersión del gel en bromuro de etidio d) verificación del ADN bacteriano por transiluminador UV.



Anexo 7 Figura 21: Elaboración de inóculo lácteo **a)** activación y concentración de cepas BAL **b)** inoculación de las BAL en leche pasteurizada **c)** incubación a 37°C de solución madre **d)** inoculación e incubación de las soluciones madres en recipientes de 500 ml de leche.



Anexo 8 Figura 22: Evaluaciones físico-químicas **a)** medición de pH **b)** medición de los grados de acidez **c)** centrifugación para evaluar el grado de sinéresis **d)** medición de la pérdida de retención de agua y sus componentes (sinéresis).



Anexo 9 Figura 23: a) y b) evaluación microbiológica del inoculo lácteo, verificación y recuento de cepas BAL viables. c) producto terminado para la administración oral en lechones.