Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas
"Celina Araujo de Pérez"

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS EN LECHE Y HECES DE *Canis lupus familiaris* LACTANTES.

Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciada en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

**Autora:** Mariana A. Zapata Q.
V-20.200.249
**Tutor:** MSc. José M. Jiménez
**Cotutor:** Dra. Elaysa Salas

Mérida, Junio de 2017

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## DEDICATORIA

A mis padres,  familiares y amigos por el apoyo y motivación que me han brindado a lo largo de mi vida y mi carrera profesional.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## AGRADECIMIENTOS

A los profesores Jóse Manuel Jiménez y Elaysa Salas por encaminarme a lo largo de mi trabajo de grado y por enseñarme todo lo necesario y más sobre la microbiología y especificamente de los probióticos.

A la Directiva de la Clínica Veterinaria Mascota Planet C.A. por la colaboración prestada en la recolección de las muestras para este ensayo, en especial al Médico Veterinario Luis Paniagua por su apoyo, interés y receptividad en todo momento.

A las profesoras Kiralba Sanchéz y Cándida Diáz por aportar sus conocimientos en la parte experimental de este estudio.

www.bdigital.ula.ve

Al personal de los distintos labotarios de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis que aportaron conocimientos y apoyo para elaborar esta investigación.

A todas las personas y animales que participaron en este estudio .



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE CONTENIDO


| | Página |
|---|---|
| **ÍNDICE DE FIGURAS** | vii |
| **ÍNDICE DE GRAFICAS** | viii |
| **ÍNDICE DE TABLAS** | x |
| **RESUMEN** | xi |
| **INTRODUCCIÓN** | 1 |
| **CAPITULO I. EL PROBLEMA** | 3 |
| **Planteamiento del problema** | 3 |
| **Justificación de la investigación** | 4 |
| **Objetivos de la investigación** | 5 |
| *Objetivo general* | 5 |
| *Objetivos específicos* | 5 |
| **Alcances y limitaciones de la investigación** | 6 |
| *Alcances de la investigación* | 6 |
| *Limitaciones de la investigación* | 7 |
| **CAPITULO II. MARCO TEORICO** | 8 |
| **Trabajos previos** | 8 |
| **Antecedentes históricos** | 13 |
| **Bases teóricas** | 14 |
| *Las bacterias ácido lácticas* | 14 |
| *Clasificación de las bacterias ácido lácticas* | 15 |
| *Características Nutricionales* | 15 |
| *Características Ecológicas* | 16 |
| *Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL* | 16 |
| *Probióticos* | 16 |
| *Prebióticos* | 17 |
| *Características de los probióticos* | 17 |
| *Mecanismo de acción de los probióticos* | 18 |
| *Sistema digestivo de los perros* | 18 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El hígado 20
Páncreas 21
*Microbiota habitual de los distintos tramos Gastrointestinales* 22
*Composición de la leche* 23
**Definición Operacional de Términos** 24
**Operacionalización del Evento** 26
**Sistema de hipótesis** 29
**CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO** 30
**Tipo de investigación** 30
**Diseño de la investigación** 30
**Población y muestra** 31
*Unidad de investigación* 31
*Selección del tamaño de muestra* 31
**Sistema de variables** 32
**Aspectos Bioéticos** 32
**Instrumento de Recolección de datos** 32
**Procedimiento de la investigación** 33
*Procesamiento microbiológico de las muestras* 33
*Pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL* 33
*Evaluación de la capacidad probiótica in Vitro de las cepas de BAL* 34
*Curva de Crecimiento bacteriano de las cepas aisladas* 34
*Resistencia a la acidez gástrica* 35
*Determinación de la tolerancia a las sales biliares* 36
*Actividad antagónica sobre microorganismos patógenos* 36
*Conservación* 37
*Nomenclatura de las cepas en estudio* 37
*Pruebas bioquímicas de identificación* 37
**Diseño de análisis** 38
**CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION** 39



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*Resultados* 39
Pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL 39
Evaluación del crecimiento de las cepas en medio MRS 40
Evaluación de la capacidad probiótica in Vitro de las cepas de BAL 46
Resistencia a la acidez gástrica 46
Resistencia a sales biliares 51
Actividad antagónica preliminar de BAL sobre microorganismos patógenos 55
Identificación de las cepas 57
*Discusión* 60
**CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** 64
*Conclusiones* 64
*Recomendaciones* 66
**REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS** 68
*Anexos* 74
Anexo A. Medio de Cultivo Man Rogosa Sharpe 75
Anexo B. Galerías API 50 CHL 76
Anexo C. Consentimiento informado 80
Anexo D. Ficha clínica 84

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE FIGURAS


| FIGURA | Página |
|---|---|
| 1. Representación esquemática del trato gastrointestinal del perro | 19 |
| 2. Representación esquemática del intestino del perro | 20 |
| 3. Representación esquemática del hígado del perro | 21 |
| 4. Páncreas de un perro (vista dorsal) | 22 |
| 5. Prueba de Antagonismo | 57 |
| 1. Pruebas bioquímicas fenotípicas utilizando el Sistema API 50 CHL Medium | 59 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE GRAFICAS


| GRAFICA | | Página |
|---|---|---|
| **1.** | Crecimiento de la cepa ZL1C1 en MRS | 41 |
| **2.** | Crecimiento de la cepa ZL2C (col.1) en MRS | 41 |
| **3.** | Crecimiento de la cepa ZL2C (col.2) en MRS | 42 |
| **4.** | Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS | 42 |
| **5.** | Crecimiento de la cepa ZL3C1 (col.1) en MRS | 43 |
| **6.** | Crecimiento de la cepa ZL3C1 (col.2) en MRS | 43 |
| **7.** | Crecimiento de la cepa ZL4C1 en MRS | 44 |
| **8.** | Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS | 44 |
| **9.** | Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS | 45 |
| **10.** | Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS | 45 |
| **11.** | Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 4 | 46 |
| **12.** | Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 2 | 47 |
| **13.** | Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 2 | 48 |
| **14.** | Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 4 | 49 |
| **15.** | Crecimiento de la cepa ZL1C1 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones | 51 |
| **16.** | Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones | 52 |
| **17.** | Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones | 52 |
| **18.** | Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones | 53 |
| **19.** | Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS como control y MRS | 54 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE TABLAS


| TABLA | | Página |
|---|---|---|
| **1.** | Datos Analíticos y fisiológicos sobre las diferentes clases de leches | 24 |
| **2.** | Operacionalización del Evento de identificación de las BAL en la leches y las heces de *Canis lupus familiaris* lactantes | 26 |
| **3.** | Operacionalización del Evento de Capacidad probiótica de las BAL aisladas de *Canis lupus familiaris* | 27 |
| **4.** | Pruebas preliminares para la identificación fenotípica | 39 |
| | **4a**. *BAL provenientes de leche de canino. Coloración de Gram y Catalasa.* | |
| | **4b.** *BAL provenientes de heces de caninos lactantes. Coloración de Gram y Catalasa.* | |
| **5.** | Números de Generación de las cepas sometidas a Ácido Gástrico a pH 2 y pH 4 | 50 |
| **6.** | Tiempos de Generación de las cepas sometidas a Ácido Gástrico a pH 2 y pH 4 | 50 |
| **7.** | Velocidades especificas de crecimiento de las cepas sometidas a Ácido Gástrico a pH 2 y pH 4 | 50 |
| **8.** | Números de Generación de las cepas sometidas a Sales biliares | 54 |
| **9.** | Tiempos de Generación de las cepas sometidas a Sales biliares | 55 |
| **10.** | Velocidades especificas de crecimiento de las cepas sometidas a Sales biliares | 55 |
| **11.** | Actividad antagónica preliminar de cuatro cepas de BAL estudiadas frente a microorganismos patógenos | 55 |
| **12.** | Perfil bioquímico de la cepa ZL1C1 | 57 |
| **13.** | Perfil bioquímico de la cepa ZL2C (col.3) | 58 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas
"Celina Araujo de Pérez"

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS EN LECHE Y HECES DE *Canis lupus familiaris* LACTANTES

**Autora:** Mariana A. Zapata Q.

**Tutor:** MSc. José M. Jiménez

**Cotutor:** Dra. Elaysa Salas

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la presencia de bacterias acido lácticas con características probióticas en la leche materna y las heces de *Canis lupus familiaris*. **Materiales y métodos:** Se incluyeron muestras de leche y heces de 10 caninos hembras y sus crías para el aislamiento de BAL en medio de cultivo MRS. Posteriormente, se hizo la prepación de un inóculo idoneo para realizar las pruebas de resistencia a sales biliares y ácido gástrico y antagonismo bacteriano. Luego de obtener colonias con características probióticas se realizó la identificación utilizando pruebas bioquímicas contenidas en las Galerías API CHL 50 Medium. **Resultados:** El plan de análisis permitió seleccionar de acuerdo a los objetivos del trabajo se seleccionaron dos aislados de *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*) identificados como Z1 y Z2, los cuales mostraron las siguientes características: cocobacilos y bacilos Gram positivos, catalasa negativa; resistentes a sales biliares y acido gástrico. En la prueba de antagonismo, se pudo evidenciar que las BAL seleccionadas inhibieron estos patógenos: *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Streptococcus mutans.* Las pruebas bioquímicas fueron compatibles con el género *Lactobacillus.* **Conclusiones:** Los dos aislados identificados mostraron características probióticas, siendo una alternativa para sustituir las terapias con antibióticos y para la estimulación del sistema inmune de los caninos adultos y los caninos destetos. Sin embargo, se requieren mas estudios para evaluar su efecto probiótico *in vivo.*

**Palabras Claves**: Bacterias ácido lácticas, caninos lactantes, probióticos.



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# INTRODUCCIÓN

En los individuos sanos puede considerarse que las poblaciones microbianas y las células de los tejidos forman un ecosistema cuyos componentes bióticos están equilibrados. Sin embargo, influencias diversas, exógenas o endógenas, pueden alterar el equilibrio microbiano y una determinada microbiota habitual puede convertirse bruscamente en nociva para el hospedador. Además, se le suma el hecho del uso excesivo de antimicrobianos. Ese hecho trae como consecuencia que la microbiota habitual y los patógenos que se encuentran dentro de un organismo se vuelvan resistentes, y en consecuencia que sea difícil su control.

En los caninos ocurre lo mismo debido a que también se encuentran expuestos a microorganismos patógenos, como todos los mamíferos. Hoy en día, los caninos son los animales de compañía mas comunes para el humano. Muchas veces el dueño, al tratar de curar una enfermedad infecciosa, abusa de los antimicrobianos en sus mascotas o les hacen consumir los antimicrobianos sin prescripción médica, provocando resistencia bacteriana.

www.bdigital.ula.ve

Es importante saber que antes de aplicar cualquier antimicrobiano, el organismo tiene mecanismos de defensa, proporcionados por la microbiota habitual, la cual es adquirida a lo largo de la vida como los microorganismos probióticos. Las bacterias ácido lácticas son transmitidas a los mamíferos cuando éstos pasan por el canal vaginal de la madre y a través de la lactancia materna.

En este estudio se busca determinar si la leche de caninos es una fuente de bacterias ácido lácticas para sus crías y evaluar el potencial probiótico mediante su aislamiento.

A continuación se presentan las diferentes secciones de la investigación la cual está constituida por 5 Capítulos, en los cuales se



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

encuentra la siguiente información: En el Capítulo I se contextualiza el problema, se establecen los objetivos del estudio y se justifica la investigación. El Capítulo II contiene trabajos previos sobre la investigación, antecedentes de la investigación, fundamentación teórica y la operacionalización del evento. En el Capítulo III se presenta el tipo de la investigación, el diseño de la investigación y los procedimientos a seguir. En el Capítulo IV se describen, interpretan y analizan los resultados. En el Capítulo V se encuentran las conclusiones y recomendaciones. Finalmente se detallan todas las referencias bibliohemerográficas.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPÍTULO I

# EL PROBLEMA

## Planteamiento del Problema

Múltiples estudios han resaltado la importancia de la lactancia. La leche materna no sólo contiene los nutrientes requeridos para el desarrollo de los bebés sino que también los protege de enfermedades infecciosas. Parece ser que esa función de la lactancia es válida tanto para humanos y animales mamíferos, incluyendo los caninos. El efecto protector de la leche canina se debe a la acción combinada de una variedad de factores protectores presentes en el calostro y la leche, tales como inmunoglobulinas, células inmunocompetentes, ácidos lácticos antimicrobianos, entre otros (Martín et al, 2009)

www.bdigital.ula.ve

Varios investigadores han llevado estudios con el fin de investigar las bacterias ácido lácticas presentes en distintos animales, logrando caracterizar bacterias ácido lácticas probióticas en el intestino grueso de cerdos adultos como posible alternativa al uso de antibióticos (Jurado y col. 2009); a partir del contenido cecal de cerdos (García y col 2011); aislar e identificar, por técnicas moleculares, cepas bacterianas presentes en el intestino de cuyes (*Cavia porcellus*)(Porturas 2011); a partir del tracto intestinal de diferentes animales de granja (Ávila y col 2010). Investigaciones dirigidas a la obtención de bacterias identificadas pertenecientes a géneros



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pertenecientes a las BAL con potencialidades para su uso en la elaboración de preparados probióticos como futura posible alternativa al uso de antibióticos y resultados promisorias en la alimentación animal.

Como se observa la mayoría de las investigaciones se han desarrollado en animales destinados al consumo humano, siendo realmente escasos los estudios en animales de compañía como los caninos, en la bibliografía consultada solo se logró ubicar el trabajo de investigación de Perelmuter y colaboradores (2008), quienes aislaron e identificaron *Lactobacillus* spp a partir de heces de un perro sano y caracterizar su potencial como probióticos con el fin de evaluar su posible uso como probióticos para perros.

Actualmente, en nuestro país no existen preparados de microorganismos probióticos autóctonos para animales, que se le puedan suministrar en casos de enfermedad, inmunodeficiencias y resistencia bacteriana, como se aplica para humanos. La resolución de este problema evitaría el uso indiscriminado de antibióticos para los caninos, mejora de la salud de los mismos y por ende menos riesgo de contagio de enfermedades zoonoticas para sus dueños.

www.bdigital.ula.ve

Esto ha llevado al planteamiento de las siguientes preguntas: ¿Tiene la leche canina microorganismos con características probióticas? ¿Están estos microorganismos con características de probiótico presentes en las heces de *Canis lupus familiaris*? Se buscó obtener las respuestas a estas interrogantes por medio del aislamiento de bacterias ácido lácticas, a partir de *Canis lupus familiaris* en el Municipio Libertador del Estado Mérida durante el período de Noviembre y Diciembre de 2015 y primer trimestre de 2016.

## Justificación de la investigación

Cada día los humanos manifiestan mayor preocupación por sus animales de compañía y su bienestar físico, pues el convivir con ellos los



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

hace a los humanos más propensos a padecer algunas enfermedades contagiosas que transmiten los animales y viceversa. De allí la gran importancia que reviste esta investigación ya que, al comprobar la presencia de BAL probióticas en los caninos y sus posibles potencialidades como probioticos, podría ser el punto de partida para el desarrollo de alimentos funcionales y productos farmacéuticos que sirvan como alternativa al uso indiscriminado de los antibióticos, para sustituir los antibióticos en casos de infecciones y la suplementación en la alimentación diaria a fin de mantener su microbiota habitual con la consecuente mejora de la calidad de vida del animal y en el caso de animales con deterioro grave de salud o animales de refugio, el uso de las BAL podría ayudar a mejorar su salud y su sistema inmunológico y prolongando su expectativa de vida. Todo esto traería beneficios tanto para la salud los caninos como para el ser humano.

Asimismo, es importante resaltar que los hallazgos de este estudio son un gran aporte para la comunidad científica, veterinaria y profesionales del Bioanálisis en Venezuela, ya que no se han estudiado en profundidad los probióticos en estos animales, sus beneficios, ni su posible uso en los mismos.

www.bdigital.ula.ve

## Objetivos de la investigación

### *Objetivo General*

Determinar la presencia de bacterias acido lácticas con características probióticas en la leche materna y las heces de *Canis lupus familiaris*.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Objetivos Específicos*

- Analizar la presencia de bacterias acido lácticas mediante la recolección y procesamiento de muestras de leche materna y heces de *Canis lupus familiaris*.
- Caracterizar fenotípica y bioquímicamente de los aislados obtenidos.
- Determinar las posibles características probióticas a través de las pruebas *in vitro* de resistencia a acido gástrico, sales biliares y antagonismos contra bacterias patógenas de interés clínico.

## Alcances y Limitaciones de la Investigación

www.bdigital.ula.ve

### *Alcances*

Los alcances de una investigación están relacionados con la profundidad del conocimiento que se quiere obtener. Al respecto, Hernández-Sampieri, Fernández y Batista (2010) refirieron que la profundidad de una investigación representa un continuum de conocimiento. En tal sentido, el conocimiento que se alcance con este estudio será finalmente el análisis por medio del aislamiento de bacterias ácido lácticas, a partir de *Canis lupus familiaris* utilizando como criterio de análisis las características que deben cumplir las BAL para considerarse como probióticas, para su uso en caninos en el Municipio Libertador del Estado Mérida



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## *Limitaciones*

Hernández – Sampieri y cols. (2010) señalaron que las limitaciones de una investigación pueden ser técnicas, teóricas y de recursos económicos. Dentro de las limitaciones de esta investigación podríamos citar la poca información existente acerca de los probióticos en animales de compañía, el proceso complejo para obtener las muestras de leche debido a la susceptibilidad del animal en esas condiciones de lactancia y la poca cantidad de muestra y las limitaciones de medios de cultivo y reactivos que cada día afecta más a los laboratorios de nuestra universidad.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPÍTULO II

# MARCO TEÓRICO

## Trabajos Previos

Los artículos que a continuación se reseñan tratan sobre el aislamiento de los microorganismos con potencial probiótico, unos en animales de granja y otros en animales de compañía.

www.bdigital.ula.ve

En primer lugar, se describe el estudio de Jurado y colaboradores (2009), quienes lograron caracterizar BAL probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos adultos como posible alternativa al uso de antibióticos. En esta investigación se incluyeron muestras del intestino grueso de 20 cerdos adultos, para el aislamiento de bacterias lácticas. La caracterización de los parámetros bioquímicos-fisiológicos de las BAL contempló la evaluación del pH del fermento, determinación de ácidos orgánicos y detección de isómeros de ácido láctico. Los procedimientos microbiológicos evaluaron la capacidad de inhibición del crecimiento de patógenos y la actividad antagónica del probiótico vs. antibiótico con su interacción competitiva. Se utilizaron pruebas para la identificación de las bacterias ácido lácticas, las cuales se complementaron con la producción de gas, actividad de catalasa y viabilidad a diferentes concentraciones de sales biliares y temperaturas. Este plan de análisis permitió seleccionar dos aislados que se identificaron como: *L. plantarum* 1 H1 y *L. plantarum* 1 H2, los cuales tienen propiedades



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

probióticas. Esa propiedad les confiere la capacidad de inhibir los enteropatógenos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *C. perfringens.* Los dos aislados reunieron las características para su uso potencial como probióticos. Su uso es ideal como complemento de terapias con antibióticos y en la elaboración de inóculos para aplicación en raciones alimenticias de lechones destetos.

Por otro lado, Ávila y colaboradores en 2010 aislaron y caracterizaron 14 cepas bacterianas del tracto intestinal de diferentes animales de granja con el fin de seleccionar las cepas con potencial probiótico. Las cepas seleccionadas fueron sometidas a pruebas bioquímicas y además se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas de resistencia al ácido y a las sales de bilis, crecimiento a temperaturas extremas y perfil de fermentación de carbohidratos. De un total de 14 cepas aisladas de distintos animales de granja, cuatro (PT7, C3, T3, P26) presentaron características para ser evaluadas en su potencial probiótico y fueron identificadas como *Lactobacillus.* En cuanto a las pruebas de capacidad probiótica, éstas mostraron en su mayoría tolerancia a las condiciones ácidas, temperatura y concentración de sales propias del género, siendo las cepas C3 y PT7 las que presentaron un mejor comportamiento. Las cepas que estuvieron bajo estudio fueron diferenciables en cuanto al tipo de carbohidrato que fermentaron. Los resultados indicaron que las cepas seleccionadas resultan promisorias como probióticos destinados a la alimentación animal.

www.bdigital.ula.ve

De modo similar, García y colaboradores en 2011 llevaron a cabo una investigación, cuyo objetivo fue aislar e identificar Lactobacilos con potencialidades para su uso en la elaboración de preparados probióticos, a partir del contenido cecal de cerdos. Los investigadores trabajaron con dos cerdos seleccionados al azar, de una granja porcina. Los animales consumieron una dieta básica de maíz/soya. Se sacrificaron por desangramiento de la vena yugular, se extrajo el tracto gastrointestinal y el ciego se aisló y trasladó íntegro en una bolsa de plástico aséptica. El



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

contenido cecal posteriormente se sembró en agar MRS para Lactobacilos a 37 °C durante 48-72 horas. Luego se seleccionaron las colonias, se purificaron y por último se verificó con la reacción de Gram y se les aplicó la técnica de catalasa para saber si eran Grampositivos y catalasa negativa. Después se realizó una PCR para conocer específicamente qué especie de Lactobacilos eran. García y colaboradores obtuvieron como resultado que el 44% de los Lactobacilos aislados eran grampositivos y catalasa negativa. Específicamente, se encontró *L. casei,* el cual es una bacteria ideal para aplicarse como probióticos. A partir de sus experimentos, los investigadores concluyeron que las cepas estudiadas son potenciales probióticos, pero que, a pesar de eso, sería ideal caracterizar y evaluar para comprobar la respuesta biológica de los animales.

Asimismo, en el año 2011 Porturas realizó una investigación que tuvo como objeto aislar e identificar, por técnicas moleculares, cepas bacterianas pertenecientes a géneros con potencial aplicación probiótica presentes en el intestino de cuyes (*Cavia porcellus*), como futura posible alternativa al uso de antibióticos. En este estudio se utilizaron 13 cuyes, diez de ellos neonatos de 2 a 6 días de edad y tres adultos de 2 meses de edad. A cada uno de estos animales se les extrajo el intestino y se tomaron muestras, raspando la mucosa intestinal. Esas mucosas se sembraron en diferentes medios de cultivo sólido con la finalidad de lograr aislar colonias. Se identificaron las 27 cepas más representativas por medio de la amplificación, secuenciamiento y análisis bioinformático del gen 16S RNAr. Luego las secuencias de DNA fueron comparadas con tres diferentes bases de datos. A partir de sus pruebas, Araujo concluyó que el 85,18% de las bacterias identificadas pertenecieron a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus, Streptococcus* y *Bacillus* con probable potencial probiótico.

Igualmente, en otra investigación se realizó la caracterización mediante pruebas *in vitro* a 72 cepas de BAL aisladas de leche procedente de ubres de vacas criollas venezolanas y seleccionar aquellas que pueden ser empleadas



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

como probióticas en la alimentación en humanos y en la dieta animal. A todas las cepas se les determinó su estabilidad de crecimiento a diferentes pH, temperatura y tolerancia a altas concentraciones de cloruro de sodio. De ellas se seleccionaron 14 cepas que presentaron las mejores características como candidatos a probióticas por sus resultados a las pruebas de hidrofobicidad frente a solventes orgánicos (xileno y hexadecano), tiempo de autoagregación y la prueba de antagonismo microbiano; ante *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus e*l 63,6% de las cepas inhibieron el crecimiento, ante *S. typhimurium* el 75,7% y frente a *Pseudomonas aeruginosa* el 72,7 %. Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que las cepas seleccionadas poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probiótico: resistencia a pH ácido, actividad antimicrobiana, buenas propiedades hidrofóbicas y autoagregantes, relacionadas con su capacidad de adhesión al epitelio intestinal. Además, los autores determinaron que existen variaciones entre las BAL evaluadas, con relación a la adhesión a superficies celulares por la técnica realizada, por lo que se debería complementar con estudios en cultivos celulares *in vivo* (Sánchez y Tromps, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Perelmuter y colaboradores (2008) realizaron un estudio en el cual se logró aislar e identificar *Lactobacillus* spp a partir de heces de un canino sano y caracterizar su potencial como probióticos con el fin de evaluar su posible uso como probióticos para caninos. Las heces se homogeneizaron en solución buffer fosfato salino (PBS), se sembraron en correctamente diluido en el medio MRS agar para posteriormente hacer una evaluación de pH, tolerancia a las sales biliares, la producción de sustancias antimicrobianas, la formación de biopelículas en superficies de vidrio y poliestireno, capacidad de agregación y la adhesión a mucosa intestinal del canino. Los aislados que sobrevivieron a diferentes condiciones de pH y sales biliares, inhibieron el crecimiento *in vitro* de *E. coli* y *C. perfringens*, y se adhirieron al vidrio y mucosa intestinal. Las propiedades mostradas por estas cepas pueden



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

indicar que podían colonizar y persistir en el tracto gastrointestinal e inducir efectos beneficiosos para los caninos, los cuales pueden ser herramientas útiles para desarrollar probióticos para mejorar la salud de los animales y reducir el riesgo de trastornos gastrointestinales.

Como complemento, Pallin (2012) condujo una investigación que tuvo como objeto averiguar si los recuentos de bacterias en el intestino de los perros difieren de los intestinos de los lobos, con el foco en los lactobacilos y además de analizar la presencia de *L. reuteri* y caracterización de tales cepas en los lobos y los perros para encontrar un posible candidato probiótico. Utilizó muestras de heces de cinco perros y contenido intestinal de cuatro lobos, se analizaron y se aislaron mediante cultivo en sustrato selectivo Rogosa lactobacilos. Se observaron las enumeraciones bacterianas y las colonias con diferencias morfológicas, se caracterizaron mediante PCR y electroforesis en gel, identificando las bacterias como *L. reuteri*. Adicional a eso se le realizaron pruebas de tolerancia de bilis, capacidad de unión a la mucosa intestinal de los perros y lobos y la susceptibilidad a los antibióticos. El autor concluyó que, entre el total de las cepas analizadas, tres cepas parecen tener el mejor potencial de acuerdo con los métodos utilizados en lobos y perros.

www.bdigital.ula.ve

Antes en 2009, Martín y colaboradores habían realizado un estudio para determinar la presencia de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en nueve caninos hembras. Se realizaron aislados a partir de la leche con el medio MRS-Cys agar. Posteriormente, se le realizaron diferentes pruebas de identificación a los microorganismos aislados y se determinó que eran bacilos Grampositivos y catalasa negativa, identificándose en cuatro especies de *Lactobacillus* (*L. reuteri, L. fermentum, L. murinus y L. animalis*); en algunos aislados se encontró *Weissella viridescens*. Luego se realizó una amplificación de ADN de las bacterias encontradas, revelando 28 perfiles genéticos diferentes. La capacidad probiótica se evalúo con diferentes ensayos como, resistencia a las condiciones del tracto digestivo, producción



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de componentes antimicrobianos, adherencia a la mucosa intestinal, entre otras. Algunas especies de *Lactobacillus* mostraron potencial para futuros probióticos en caninos.

## Antecedentes Históricos

A través de la historia, el nombre ha aprendido diferentes formas de utilizar las bacterias lácticas. Tradicionalmente las ha empleado para elaborar algunos productos alimenticios fermentados, heredando por generaciones la tecnología de la fermentación. En 1857, las bacterias lácticas fueron descubiertas por Louis Pasteur. Luego, en 1878, Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida. Más tarde, en 1889, Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium* y el *L. acidophilus* fue descubierto por Moro en 1900 (Kéfir, 2013).

www.bdigital.ula.ve

> Ilya Ilyich Metjnikov (se le conoce como Elie Metchnikoff) logró poner de manifiesto que personas que consumían habitualmente yogurt mostraban una mayor longevidad con respecto a las que no solían hacerlo. La explicación de Metchnikoff frente a este hecho fue que en el yogurt se hallan presentes microorganismos acidófilos los cuales, al colonizar el tracto gastrointestinal, desplazan a los microorganismos patógenos existentes, responsables de los trastornos o enfermedades (Piera, 2009).

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell. A diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped (Organización Mundial de Gastroenterología, 2008).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Bases Teóricas

### *Las bacterias ácido lácticas*

Las BAL son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general, las BAL son bacilos o cocobacilos Grampositivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes (Ramírez et al, 2011). A pesar de su metabolismo anaeróbico, son anaerobios tolerantes y, en los medios de cultivos sólidos, forman colonias en presencia de aire (Parra, 2010), oxidasa, catalasa y bencidina negativas y no reducen el nitrato a nitrito. Carecen de actividad respiratoria porque les falta una enzima (citocromo oxidasa), contiene un grupo hemina que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones (Parra, 2010). Producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácido 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 (Ramírez et al,2011). La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también de las condiciones ambientales (Parra, 2010).

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Clasificación de las bacterias ácido lácticas*

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos adicionales como acetato, etanol, $CO_2$, formiato o succinato (heterofermentativas) (Parra, 2010), 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 siguientes géneros: *Aerococcus, Alloinococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus y Weisella*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus, Bifidobacterium, Pediococcus, Streptococcus y Leuconostoc* (Ramírez et al, 2011).

www.bdigital.ula.ve

### *Características Nutricionales*

Las BAL son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Mora y García, 2007)

La mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) y varios aminoácidos (Parra, 2010).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Características Ecológicas*

Los hábitats de las BAL son muy variados, pudiéndoseles encontrar en microbiota habitual de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos fermentados y ricos en azúcares, leche y derivados, cárnicos y mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, tracto nasofaríngeo, gastrointestinal y vagina (Mora y García, 2007).

### *Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL*

Las BAL son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos. La mayor parte de estos compuestos no están caracterizados ni en cuanto a su naturaleza bioquímica ni en cuanto a su mecanismo de acción. Con frecuencia, incluso los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico que es inhibidor de esporas de bacterias y es antimicrobiano o derivados del metabolismo del oxígeno como el $H_2O_2$ (Mora y García, 2007).

www.bdigital.ula.ve

### *Probióticos*

Los probióticos son microorganismos vivos que, al consumirse en cantidades adecuadas, producen beneficios para la salud animal y del hombre (Mas y Mascó, 2014). También se pueden definir como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico para el tracto intestinal



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

del hospedero, sin perturbar las funciones fisiológicas normales (Bazay, 2010).

### *Prebióticos*

Es importante diferenciar el término probiótico de prebiótico y su relación entre ellos. Los prebióticos son ingredientes alimenticios que se fermentan selectivamente por la microbiota beneficiosa intestinal (probióticos) y modifican su composición y actividad metabólica, contribuyendo a mejorar la salud del hospedero (García et al, 2012).

### *Características de los probióticos*

www.bdigital.ula.ve

Según Mas y Mascó (2014), los probióticos tiene las siguientes características:

- Pueden ser bacterias u otros microorganismos, que puedan resistir el paso por el trato digestivo y llegar vivos al colon.
- Los efectos de los probióticos dependen de la especie, de la cepa y de las cantidades en las que se consuman.
- No deben ser tóxicos ni patógenos.
- Tienen capacidad de adhesión a células epiteliales.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Mecanismo de acción de los probióticos*

Se ha conocido que los probióticos realizan tareas como las siguientes:

- Producen ácidos grasos de cadena corta: para disminuir el pH, ya que el pH< 4: no es tolerado por determinados microorganismos (Rodríguez, 2009).
- Efectúan cambios en la actividad enzimática (Rodríguez, 2009).
- Tienen un efecto competitivo con otros microorganismos patógenos (inhibiendo el crecimiento o competición por nutrientes), lo cual reduce diarreas infecciosas (Rodríguez, 2009).
- Producen sustancias antimicrobianas: ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Rodríguez, 2009).
- Reducen la intolerancia a la lactosa por la actividad lactasa que aportan las BAL (Aranceta y Gil, 2009).
- Estimulan el sistema inmune, incrementando la actividad fagocítica y la producción de inmunoglobulinas (Aranceta y Gil, 2009).

www.bdigital.ula.ve

### *Sistema digestivo de los perros*

Este aparato comienza en la apertura de la boca y termina en el ano como puede verse en la Figura 1. Se desarrolla en el embrión a partir de un simple tubo; por esta razón, se le conoce también como tubo digestivo. Además en este aparato se incluyen las glándulas anexas, entre ellas las glándulas



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

salivales, el hígado y el páncreas, las cuales vierten sus secreciones en el tubo digestivo. (König y Liebich, 2005).

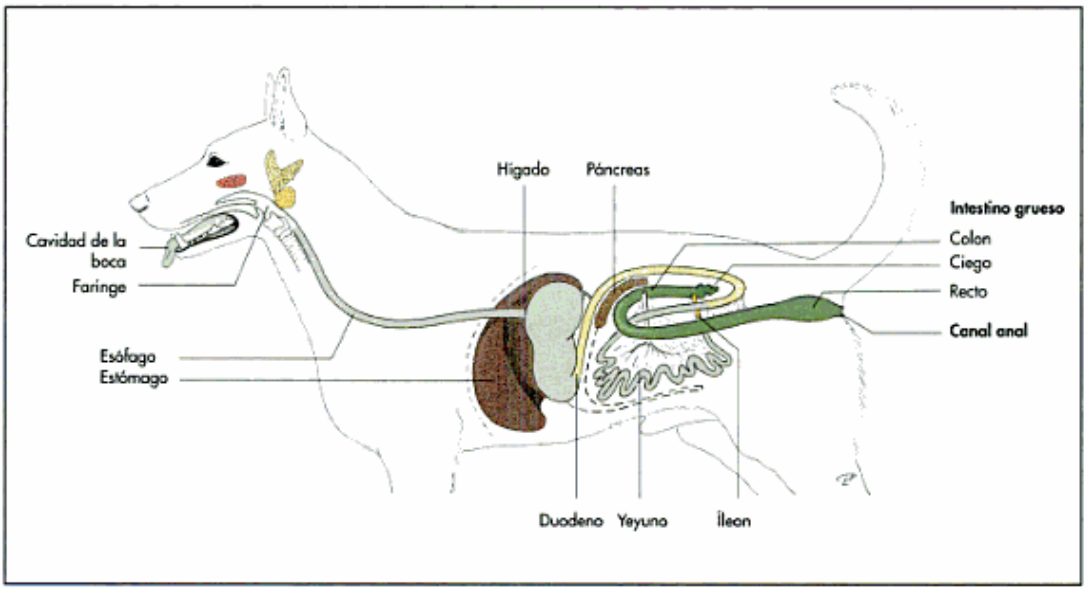



Figura. 1. **Representación esquemática del trato gastrointestinal del perro** (König y Liebich, 2005).

www.bdigital.ula.ve

**Intestino**

En el intestino delgado se produce la digestión y reabsorción de los alimentos. Se subdivide en duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno es largo y en él discurre el conducto colector del hígado y el conducto biliar o colédoco. El yeyuno posee unas asas que están situadas sobre la pared profunda del omento mayor. Y el íleon es el segmento final del intestino delgado que es relativamente corto. El intestino grueso se subdivide en ciego y colon (Ascendente, transverso y descendente) como se muestra en la Figura 2 (König y Liebich, 2005).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

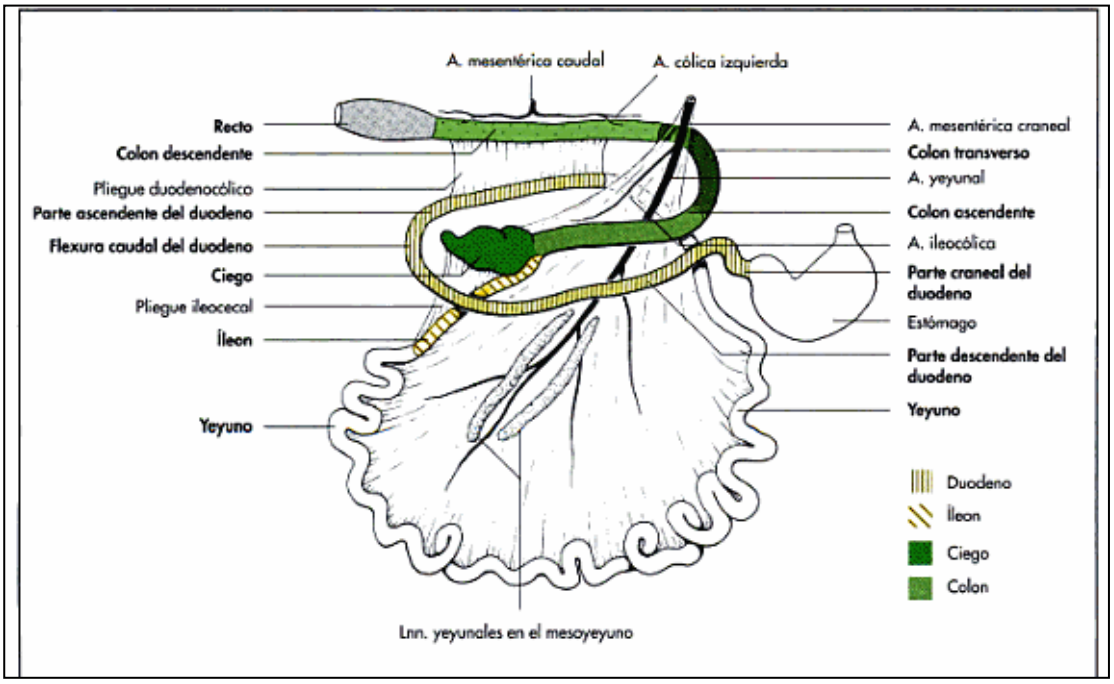



Figura.2. **Representación esquemática del intestino del perro** (König y Liebich, 2005).

www.bdigital.ula.ve

También es importante estudiar las glándulas anexas (hígado y páncreas) anatómicamente y las secreciones que vierten en el tubo digestivo ya que estas secreciones influyen en la digestión de los caninos y van a influir en las bacterias ácido lácticas.

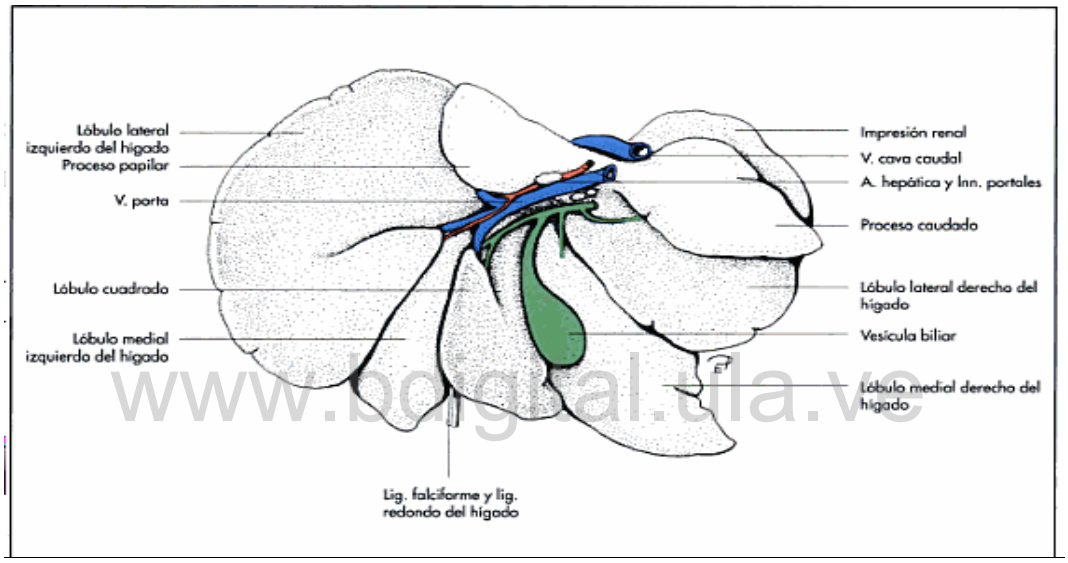
**Hígado**

Está situado en la porción intratorácica de la cavidad abdominal, inmediatamente dentro del diafragma. El hígado aporta del 2 al 3 % del peso corporal del canino. Es la glándula más grande del cuerpo, la cual posee múltiples estructuras, como se observa en la Figura 5. Entre sus numerosas funciones, están el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, eliminación de sustancias nocivas para el cuerpo y la producción de bilis. Esta última es la función más importante para este estudio (König y Liebich,



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

2005). Los ácidos biliares se encargan de la emulsión de las grasas en el intestino. El color de éstos es el producto del catabolismo de la hemoglobina. La bilis se acumula en la vesícula biliar, donde se espesa y, según las necesidades del animal, es liberada al duodeno. La vesícula biliar está situada en la cara visceral del hígado y tiene una capacidad de 15 mililitros aproximadamente. Excreta la bilis a través del conducto cístico y del colédoco (König y Liebich, 2005).



www.bdigital.ula.ve

Figura 3. **Representación esquemática del hígado del perro** (cara visceral) (König y Liebich, 2005).

**Páncreas**

Este órgano presenta una forma de “U”, cuyo lóbulo izquierdo es más corto y se encuentra en el origen del omento mayor, en la pared dorsal del abdomen; mientras que el lóbulo derecho se encuentra en la parte descendente del duodeno (Ver Figura 6). Los caninos poseen un conducto pancreático pequeño (el cual en ocasiones puede faltar) y un conducto pancreático accesorio. El conducto pancreático desemboca junto con el conducto colédoco en el duodeno en la papila mayor y el conducto pancreático accesorio desemboca en la papila menor del duodeno. En el



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tejido del páncreas exocrino están incluidos los islotes pancráticos, los cuales se encargan de la producción de hormonas (insulina, glucagón y somastostatina) (König y Liebich, 2005).




www.bdigital.ula.ve

Figura 4. **Páncreas de un perro** (vista dorsal) (König y Liebich, 2005).

### *Microbiota habitual de los distintos tramos gastrointestinales*

Un estudio reciente realizado por García-Mazcorro y Minamoto en 2013 mostró que los microorganismos que conforman la microbiota habitual de los perros son tan complejos como los del hombre y también mostró los géneros más predominantes del tubo gastrointestinal del perro. Estos son: *Helycobacter* spp*, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Fusobacterium.* Siendo *Helicobacter* el mas predominante en estomago y *Firmicutes* en intestinos.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Composición de la leche*

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Tiene una composición compleja, es blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad (Alais, 1985). La leche contiene los nutrientes esenciales en las proporciones adecuadas para brindar sustento a los mamíferos jóvenes en las primeras etapas de su vida y constituye una buena fuente de carbohidratos (lactosa), grasas (Triglicéridos) y proteínas (Caseínas, albúminas y globulinas), así como vitaminas, minerales (sales), nucleótidos, lecitinas y enzimas como se muestra en el Cuadro 1 (Intermediate Technology Development Group, 1998). En la época del nacimiento, la madre segrega el calostro, líquido que se diferencia principalmente de la leche en sus partes proteicas y salina.

www.bdigital.ula.ve

La leche se altera fácilmente por el calor y microorganismos que pueden proliferar en ella como las bacterias acido lácticas (Alais, 1985).

Las leches de los mamíferos poseen una composición semejante entre ellas, pero varían la cantidad de los nutrientes. En el caso de los carnívoros, como los caninos, estos producen leches albuminosas (mayor cantidad de albúmina) (Alais, 1985). En la Tabla 1 se compara diferentes tipos de leches provenientes de diferentes mamíferos incluyendo a los perros:



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | Composición por 100 g | | | | | | | Tiempo para doblar el peso de nacimiento | Duración hab. de gestación | Peso del cerebro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Materias nitrogenadas | | | | | |
| | Extracto seco (total) | M.G. | Lactosa | Sales | Totales | Proporción de | | | | |
| | | | | | | Caseína % | N.P.N. (*) % | Días | Días | |
| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) |
| **Leche humana** | 11,7 | 3,5 | 6,5 | 0,2 | 1,5 | 28 | 17 | 170 | 270 | 1200 g |
| **Equidos** | | | | | | | | | | |
| Yegua | 10 | 1,5 | 5,9 | 0,4 | 2,2 | 50 | – | 40 | 340 | 650 |
| Burra | 10 | 1,5 | 6,2 | 0,5 | 1,8 | 45 | – | | 360 | 360 |
| **Rumiantes** | | | | | | | | | | |
| Vaca | 12,5 | 3,5 | 4,7 | 0,8 | 3,5 | 78 | 5 | 35 | 285 | 500 |
| Cabra | 13,6 | 4,3 | 4,5 | 0,8 | 4 | 75 | 7 | 22 | 155 | 130 |
| Oveja | 19,1 | 7,5 | 4,5 | 1,1 | 6 | 77 | 5 | 20 | 150 | |
| Búfala | 17,8 | 7,5 | 4,7 | 0,8 | 4,8 | 80 | – | | | |
| Reno | 31,9 | 17,5 | 2,5 | 1,5 | 10,4 | 80 | – | | 230 | |
| **Suidos** | | | | | | | | | | |
| Cerda | 18,3 | 6 | 5,4 | 0,9 | 6 | 50 | 8 | 13 | 115 | 160 |
| **Carnívoros y Roedores** | | | | | | | | | | |
| Gata | 20 | 5 | 5 | 1 | 9 | 33 | – | | 60 | 25 |
| Perra | 24,2 | 10 | 3 | 1,2 | 10 | 50 | – | 9 | 63 | |
| Coneja | 29,3 | 12 | 1,8 | 2 | 13,5 | 70 | – | 6 | 35 | 10 |
| **Cetáceos** | | | | | | | | | | |
| Marsopa | 59,9 | 46 | 1,3 | 0,6 | 12 | 55 | – | | | |
| Ballena | 46,3 | 35 | 0,8 | 0,5 | 10 | – | – | | | |

(*) N.P.N: materiales nitrogenados no proteicos

**Tabla 1. Datos Analíticos y fisiológicos sobre las diferentes clases de leches** (Alais, 1985).

www.bdigital.ula.ve

## Definición Operacional de Términos

En vista de que algunos términos usados en el estudio pueden ser entendidos de diferente manera a la que se pretende, se ha decidido especificar el significado de ciertas expresiones que fueron empleadas.

### *Aislamiento*

Consiste en separar de una población heterogénea, al microorganismo que se requiere estudiar para obtenerlo en estado puro (Ramírez et al, 2006).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Amplificación de ADN*

Procedimiento para poder tener varias copias de una región específica de ADN (Genoma, 2009).

### *Cepas*

Colonia microbiana procedente de un solo germen, obtenido de un organismo vivo y multiplicado por pases sucesivos en diferentes medios de cultivo (García, 2011).

### *Catalasa*

Enzima que producen los microorganismos que descompone el peróxido de hidrogeno ($H_2O_2$) en oxígeno y agua (Ramírez et al, 2006).

www.bdigital.ula.ve

### *Microbiota Habitual*

Microorganismos que habitualmente encontramos sobre las superficies corporales o en el interior del organismo (Montiel, 1997).

### *PCR*

Tecnología de biología molecular llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, en ingles) (Genoma, 2009).

### *Resistencia bacteriana*



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Es la resistencia de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Los microorganismos resistentes pueden soportar ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos. La resistencia bacteriana es un fenómeno natural que ocurre cuando hay un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. El uso inapropiado de medicamentos antimicrobianos acelera ese fenómeno natural. Las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2013).

## Operacionalización de las Variables

Las variables de estudio y por lo tanto el evento, así como el criterio de análisis están representados por conceptos abstractos. Estos conceptos deben transformase en empíricos para que puedan medirse. Este proceso de transformación es denominado operacionalización, y el fin es identificar los indicadores que muestren la presencia del evento de estudio (Ver tablas 2 y 3) (Palella y Martins, 2010).

www.bdigital.ula.ve

**Tabla 2. Operacionalización del Evento de Identificación de las BAL en la leche y las heces de *Canis lupus familiaris* lactantes.**

| 1. Evento de Estudio | 2.Definición Conceptual ¿Qué es? | 3.Definición operacional ¿Cómo se mide? |
|---|---|---|
| Identificación de las BAL en la leche y las heces de *Canis lupus* | Las BAL son un grupo de microorganismos representadas por | La identificación de las BAL se puede realizar a través del uso de |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | | |
|---|---|---|
| *familiaris* lactantes. | varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común (Ramírez et al, 2011). Pueden encontrase como microbiota habitual de en diferentes zonas anatómicas en los mamíferos (Mora y García, 2007). | medios de cultivo específicos para estas bacterias como el MRS y las pruebas preliminares como el Gram y la Prueba de Catalasa, y las Galerías API 50 CHL Medium (Martin y col, 2009). |
| **4. Dimensiones** | | **5. Indicador** |
| • BAL presentes<br>• BAL ausentes | | • Colonias características de estos microorganismos en el medio de cultivo MRS.<br>• Cocobacilos o Bacilos Gram positivos.<br>• Prueba de Catalasa negativa.<br>• Fermentación de los carbohidratos presentes en las Galerías API 50 CHL Medium. |

www.bdigital.ula.ve

Zapata, Jiménez y Salas, 2017

**Tabla 3. Operacionalización del Evento de Capacidad probióticas de las BAL aisladas de *Canis lupus familiaris lactantes.***

| 1.Evento de Estudio | 2. Definición Conceptual ¿Qué es? | 3. Definición operacional ¿Cómo se |
|---|---|---|



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | | mide? |
|---|---|---|
| Capacidad probióticas de las BAL aisladas de *Canis lupus familiaris lactantes.* | Los probióticos son microorganismos vivos que, al consumirse en cantidades adecuadas, producen beneficios para la salud animal (Mas y Mascó, 2014). | La capacidad probióticas de las BAL se puede medir por medio de las Pruebas de resistencia al tracto gastrointestinal y Antagonismo bacteriano (Martin y col, 2009). |

| 4. Dimensiones | 5. Indicador |
|---|---|
| • Capacidad probiótica presente<br>• Capacidad probática ausente | • Resistencia al acido gástrico en diferentes pH (2, 3 y 4 ).<br>• Resistencia a las Sales Biliares en distintas concentraciones (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%)<br>• Inhibición de microorganismos patógenos en la prueba de antagonismo bacteriano. |

Zapata, Jiménez y Salas, 2017

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Sistema de hipótesis

### *Hipótesis Nula*

No existen bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en la leche y en las heces de *Canis lupus familiaris* lactantes.

### *Hipótesis Afirmativa*

Existen bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en la leche y en las heces de *Canis lupus familiaris* lactantes.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPÍTULO III

# MARCO METODOLÓGICO

## Tipo de investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Específicamente, pueden ser exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva y evaluativa. En tal sentido, esta investigación es de tipo analítica, ya que se detecto la presencia de BAL probioticas en la leche y las heces de *Canis lupus familiaris* lactantes en función de las pruebas para tal fin .

www.bdigital.ula.ve

## Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación se refiere a las diferentes estrategias que utiliza el investigador para responder la pregunta de investigación (Palella y Martins, 2010). Adicionalmente, Hurtado (2010) refirió que el diseño tiene relación con el dónde y el cuándo se recopilará la información necesaria, así como, la amplitud de la misma, con el fin de responder la interrogante



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

planteada en el enunciado holopráxico. Al respecto, esta investigación se guío por un diseño de campo, transversal y multieventual.

## Población y Muestra

### *Unidad de investigación*

La investigación se llevo a cabo en la Clínica Veterinaria Mascota Planet CA ubicada en el Municipio Libertador de la Ciudad de Mérida, Estado Mérida. Se recolectaron muestras de leche materna y heces de doce (12) caninas y sus crías seleccionados al azar, con previo consentimiento de los participantes y de la directiva de la clínica.

www.bdigital.ula.ve

### *Selección del Tamaño de la Muestra*

Para este estudio se utilizo una población de 12 caninos hembras y sus respectivas crías lactantes que asistieron a la Clinica Veterinaria Mascota Planet CA, los cuales cumplieron con los siguientes requisitos:

- Caninos hembras adultos, con buena condición corporal, tratadas en clínicas veterinarias, sin importar su raza, edad y número de crías, sin tratamiento con antibióticos y/o desparasitantes y con todas las vacunas vigentes.
- Caninos lactantes sanos, alimentados solo con leche materna y sin tratamiento con antibióticos y/o desparasitantes y con todas las vacunas vigentes.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Sistemas de Variables

Las variables de una investigación son características presentes en la unidad de investigación y se pueden medir (Pérez, 2005). Específicamente, se consideran en algunos casos 3 categorías diferentes: dependiente, independiente e interviniente. Sin embargo, en esta investigación las variables no están sistematizadas ya que es de tipo analítica.

## Aspectos Bioéticos

Antes de iniciar con la parte experimental del estudio se procedió a la aplicación de un consentimiento informado de forma escrita, basado en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, el cual se presento al dueño del canino que califico para el estudio. Este formulario fue firmado por el dueño del canino consintiendo su participación en el estudio, una vez se le explicó el propósito de la investigación, los riesgos, molestias, y beneficios que implicarían. Y garantizando que los documentos que identifican al dueño del canino y al canino serán confidenciales (Anexo C).

www.bdigital.ula.ve

## Instrumento de Recolección de Datos

Para la obtención de las muestras de las caninas adultas se siguió el siguiente protocolo: se realizo la antisepsia de los pezones y el área cercana a los mismos con alcohol isopropílico al 70%. Posteriormente se aplicaron masajes suaves con guantes estériles y ligera presión para estimular la



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

secreción natural de la leche. Se recolecto aproximadamente 1 mL en tubos de ensayo con caldo MRS (Moreno R y col, 2011).

Para la obtención de las muestras de heces de los caninos lactantes se procedió de la siguiente manera: se extrajo la muestra de heces con un hisopo estéril del orificio anal del animal y se coloco en tubos de ensayo con 3 mL de caldo MRS (Cortez y col, 2014).

## Procedimientos de la investigación

### *Procesamiento microbiológico de las muestras*

www.bdigital.ula.ve

Las muestras fueron trasladadas bajo refrigeración al Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde fueron colocadas en incubación a 37 °C por 48 horas para luego subcultivar en placas de Agar MRS (Man Rugosa Sharpe Anexo A) a 37° C por 48 horas en microaerobiosis (Moreno R y col, 2011).

### *Pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL*

Se seleccionaron al azar a partir de las placas de agar MRS, colonias con características propias de las bacterias acido lácticas, tales como: colonias



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pequeñas, convexas, lisas, con bordes definidos, opacas y sin pigmentos; se realizaron las siguientes pruebas (Kandler, y Weiss, 1986):

- Coloración de Gram.
- Catalasa.

Las cepas identificadas como bacilos o cocobacilos fueron sembradas en placas de petri pequeñas con agar MRS e incubadas a 37ºC en microaerobiosis durante 48 horas, con el fin de lograr un mayor aislamiento bacteriano y para su posterior conservación (Kandler, y Weiss, 1986).

### *Pruebas in vitro de capacidad probiótica*

Las pruebas *in vitro* de capacidad probiótica se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos "Prof. Cándida Díaz"; del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve

### Curva de Crecimiento bacteriano de las cepas aisladas

Con la finalidad de obtener un patrón de comparación para las pruebas probióticas, se determinó la curva de crecimiento en condiciones normales de cada una de las cepas. A partir de un cultivo de 48 horas en caldo MRS, se inocularon 20 µL en tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo MRS y se incubaron en baño de agua a 35 +/- 2 °C. Se realizaron medidas de densidad óptica a 560nm durante las primeras 6 horas, luego a las 12, y por ultimo a las 24 horas. Los resultados obtenidos fueron transformados a UFC/ml, se calculó la tasa de crecimiento celular para el análisis estadístico hallando el



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

número de generaciones, tiempo de generación y la velocidad específica de crecimiento haciendo uso de las siguientes fórmulas:

$$n = \frac{t - t_0}{g}$$

En donde:

n= número de generaciones
t= tiempo final
$t_0$= tiempo inicial
g= tiempo de generación

$$g = \frac{\ln (N - N0)}{t - t_0}$$

En donde:

g= tiempo de generación
N= número de microorganismos final
$N_0$= número de microorganismos inicial
t= tiempo final
$t_0$= tiempo inicial

www.bdigital.ula.ve

$$\mu = \frac{\ln (N/N0)}{t - t_0}$$

En donde:

μ= velocidad especifica de crecimiento
N= número de microorganismos final
$N_0$= número de microorganismos inicial
t= tiempo final
$t_0$= tiempo inicial

**Resistencia a la acidez gástrica.**

Para la evaluación de la resistencia a pH ácido, se tomaron 20 µl de una suspensión celular del lactobacilo a probar ajustada al patrón 1 Mac Farland y se inocularon en 3 mL caldo MRS ajustado con HCL haciendo uso de un pHmetro a pH 2,0; 3,0 y 4,0. Se utilizó caldo MRS pH 6,5 como control(Cueto-Vigil et al, 2010).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Determinación de la tolerancia a las sales biliares**

Para la evaluación de la tolerancia a las sales biliares, Se inocularon 20 µL de suspensión celular en 3 mL de caldo MRS enriquecido con sales biliares al 0.1 %; 0.15%; 0.3 % y 0.5 % (pH: 7,0) y 3 mL de caldo MRS como control (Cueto et al, 2010).

Posteriormente a los dos procedimientos descritos anteriormente los tubos obtenidos fueron incubados en un baño de agua a 37 +/- 2 ºC por 24 horas. Se procedió a medir la densidad óptica (DO) a una absorbancia de 560nm a la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 15 y 24 horas. Los resultados obtenidos fueron tratados de la misma forma que los obtenidos en la curva de crecimiento en condiciones normales. Las cepas que mostraron poca o ninguna reducción de las medidas de absorbancia o fueron capaces de aumentar dichas medidas se consideraron como posibles bacterias probióticas (Suskovic et al 1997; Lan-szu et al 1999; Okada et al 2010, y Spencer et al, 2001).

www.bdigital.ula.ve

**Actividad antagónica sobre microorganismos patógenos**

Las cepas objeto de estudio fueron incubadas en caldo MRS por 48 horas a 37 °C. Luego, se realizó una suspensión celular de cada cepa equivalente al Patrón 1 McFarland, se tomaron 20 µL, se dispensaron en un tubo con 9 mL de Agar MRS fundido y temperado a 45 °C, se mezcló hasta homogenizar y se sirvieron en placas de petri. Se dejó solidificar el agar y se incubó durante 48 horas a 37 °C en microaerobiosis, posteriormente se colocaron 9 µL de una suspensión celular equivalente al Patrón 0,5 McFarland obtenida a partir de cada cepa patógena a evaluar, y se permitió que se absorbiera. Las placas obtenidas se incubaron durante 48 horas a 37



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

°C en aerobiosis por último se realizó la lectura de los resultados, observando la presencia o ausencia de crecimiento de la cepa patógena (Aparicio, 2016).

### *Conservación*

Las cepas aisladas fueron codificadas e inoculadas en tubos con 3mL de caldo MRS e incubadas a 37ºC por 48 horas en microaerobiosis. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 4000rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante quedando el sedimento bacteriano, del cual se tomaron 100µL y se colocaron en microtubos con 100 µL de glicerina liquida estéril y se congelaron (Salas, 2004).

www.bdigital.ula.ve

### *Pruebas bioquímicas de identificación*

La identificación bioquímica hasta especie se realizo mediante el Sistema API 50 CHL (BioMérieux), siguiendo la metodología descrita en los insertos suministrados por el proveedor, utilizando el programa API LAB plus versión 3.2 (Moreno y col, 2011). (Anexo B).

### *Nomenclatura de las cepas en estudio*

A las cepas aisladas de las caninas se les coloco una “Z” como inicial en sus nombres para la personalización de las mismas, luego una “A” que se



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

refiere a canino adulto y por ultimo el número de la camada a la que corresponde.

Las cepas aisladas de los caninos lactantes se les coloco una “Z” como inicial en sus nombres para la personalización de las mismas, luego una “L” que se refiere a canino lactante, número de la camada seguido de la letra “C” y el número de cachorro de la camada (en el caso que se tomaran dos o más lactantes).

## Diseño de Análisis

Los datos que se recolectaron del procesamiento microbiológico y la evaluación de la capacidad probiotica *in Vitro* de las cepas estudiadas fueron representados mediante técnicas estadística descriptiva por medio de tablas y gráficos.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Resultados*

En el presente capitulo se muestran los resultados obtenidos de las pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL, pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL, evaluación del crecimiento de las cepas en medio MRS, resistencia a sales biliares, identificación de las cepas, actividad antagónica preliminar de BAL sobre microorganismos patógenos por medio de tablas y figuras.

www.bdigital.ula.ve

**Tabla 4a. Pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL provenientes de leche de canino. Coloración de Gram y Catalasa**

| Cepa | Gram | Catalasa |
|---|---|---|
| **ZA1** | No se encontró BAL | |
| **ZA2** | No se encontró BAL | |
| **ZA3** | No se encontró BAL | |
| **ZA4** | No se encontró BAL | |
| **ZA5** | No se encontró BAL | |
| **ZA6** | No se encontró BAL | |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Tabla 4b. Pruebas preliminares para la identificación fenotípica de las BAL provenientes de heces de caninos lactantes. Coloración de Gram y Catalasa.**

| Cepa | Gram | Catalasa |
|---|---|---|
| **ZL1C1** | Cocobacilos Gram Positivos. | Negativo |
| **ZL2C1 (col.1)** | Bacilos Gram Positivos, rectos y grandes. | Negativo |
| **ZL2C1 (col.2)** | Bacilos Gram Positivos, rectos. | Negativo |
| **ZL2C1 (col.3)** | Bacilos Gram Positivos, rectos, largo y delgados. | Negativo |
| **ZL3C1** | Bacilos Gram Positivos, cortos | Negativo |
| **ZL3C2** | No se encontró BAL | |
| **ZL4C1 (col.1)** | Bacilos Gram Positivos, largos | Negativo |
| **ZL4C1 (col.2)** | Cocos Gram Positivos (Aspecto y morfología no concluyente) | Negativo |
| **ZL4C2** | Cocobacilos Gram Positivos | Negativo |
| **ZL5C (col.1)** | Cocos Gram Positivos (Aspecto y morfología no concluyente) | Negativo |
| **ZL5C (col.2)** | Cocos Gram Positivos (Aspecto y morfología no concluyente) | Negativo |
| **ZL6C1** | Cocobacilos Gram Positivos | Negativo |
| **ZL6C2** | Cocobacilos Gram Positivos | Negativo |

www.bdigital.ula.ve

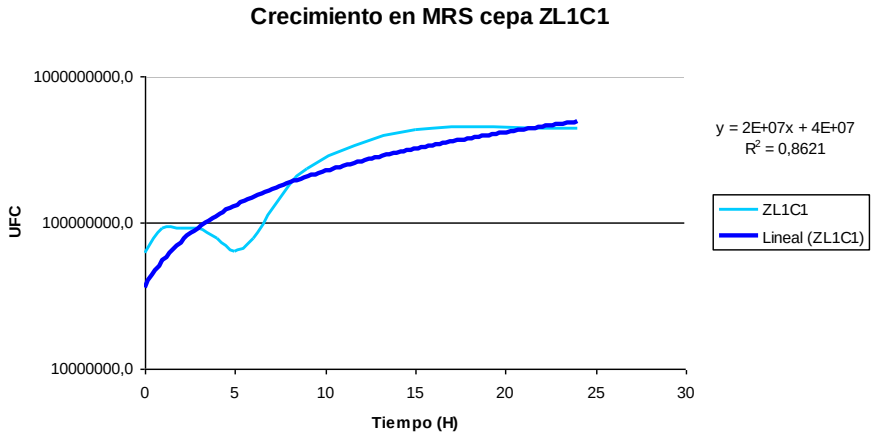
**Curvas de crecimiento de las cepas de BAL en medio MRS en condiciones normales.**

A continuación, se muestran los resultados de las curvas de crecimiento normal para cada cepa evaluada, por medio de gráficos de dispersión. Cabe



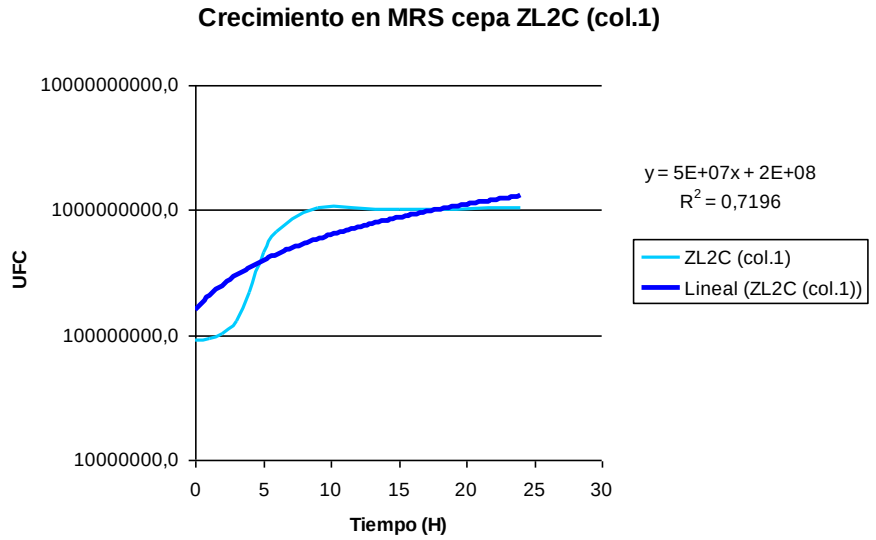
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

destacar que las cepas ZL5C (col.1) y ZL5C (col.2) no lograron ser evaluadas en esta prueba y en las siguientes, ya que no lograron ser reactivadas con medio de cultivo MRS.




Grafica 1. **Crecimiento de la cepa ZL1C1 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

www.bdigital.ula.ve

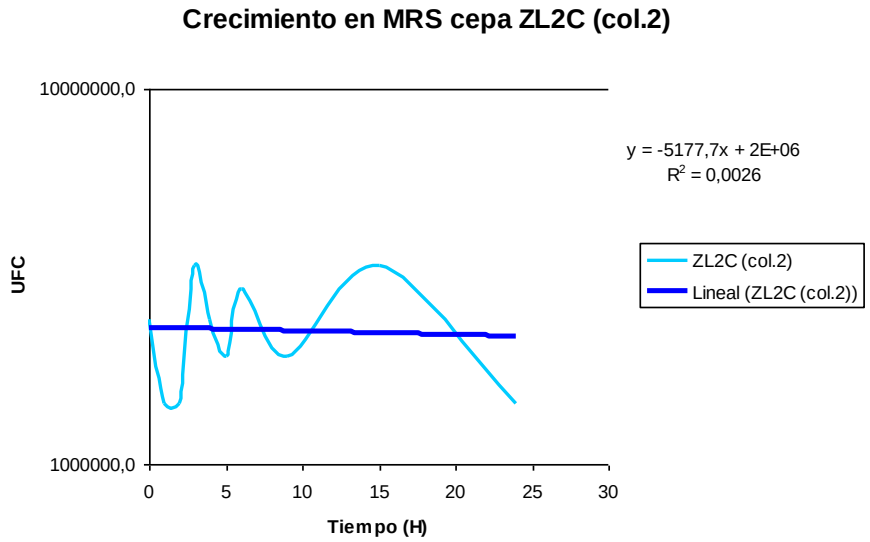



Grafica 2. **Crecimiento de la cepa ZL2C (col.1) en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se



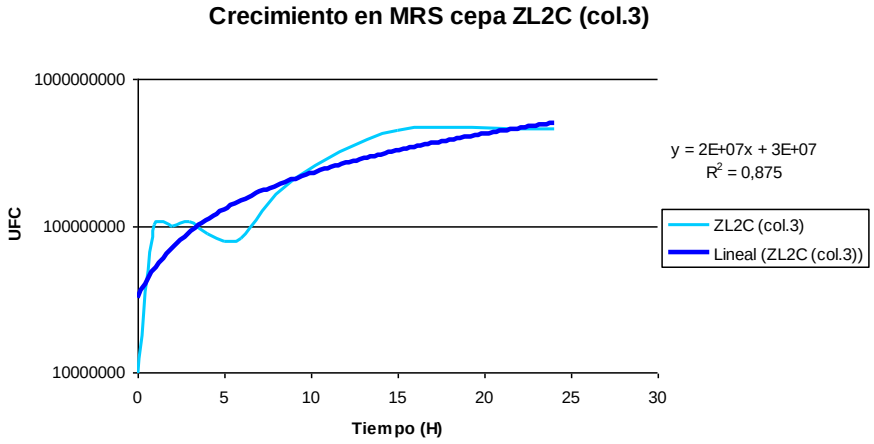
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.




Grafica 3. **Crecimiento de la cepa ZL2C (col.2) en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

www.bdigital.ula.ve

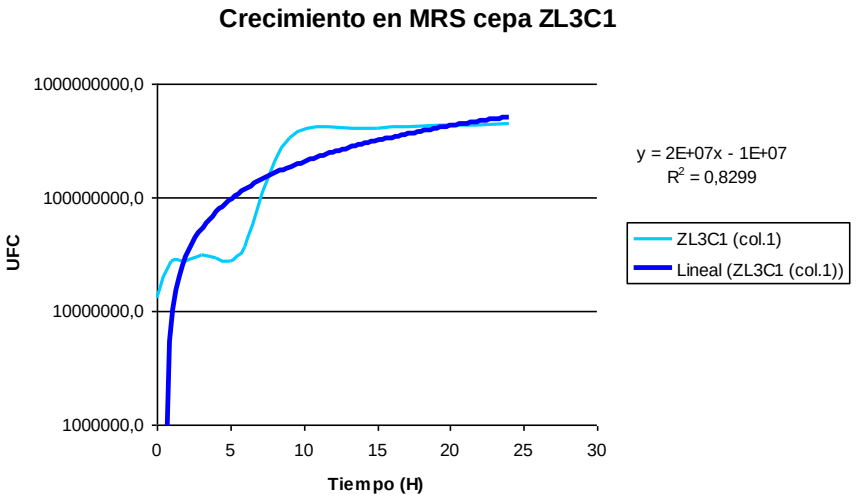



Grafica 4. **Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se



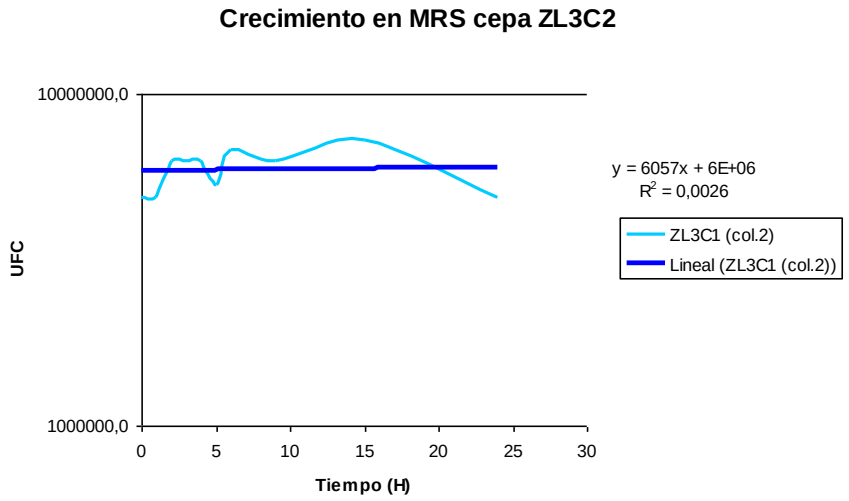
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.




Grafica 5. **Crecimiento de la cepa ZL3C1 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

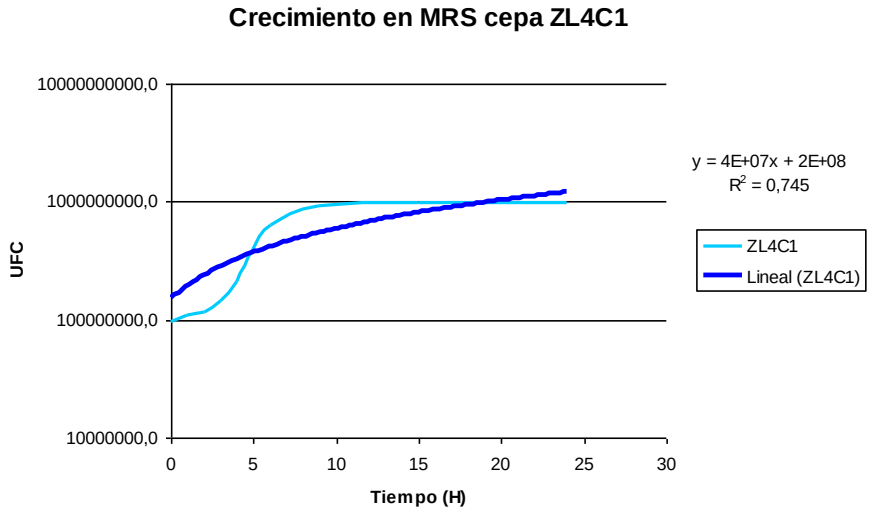
www.bdigital.ula.ve




Grafica 6. **Crecimiento de la cepa ZL3C2 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

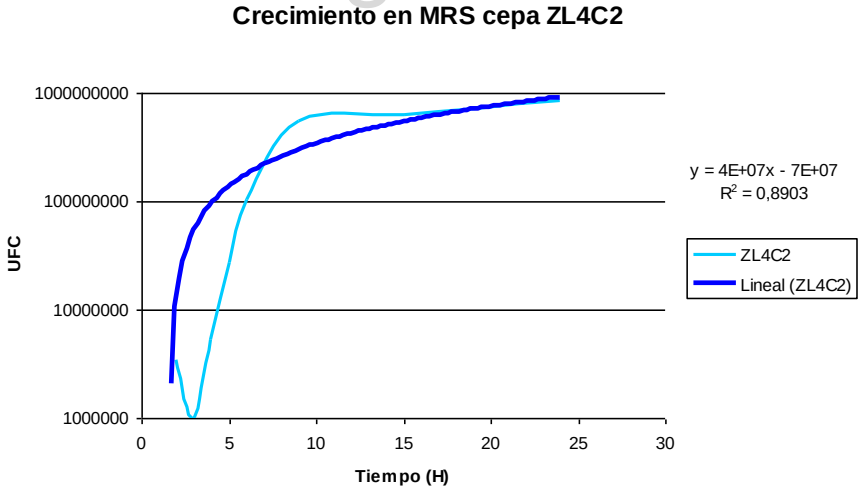


Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




Grafica 7. **Crecimiento de la cepa ZL4C1 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

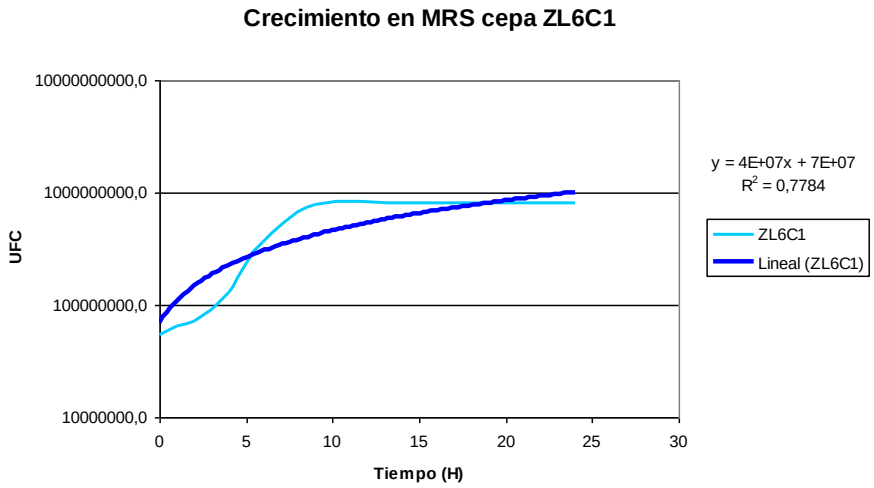
www.bdigital.ula.ve




Grafica 8. **Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

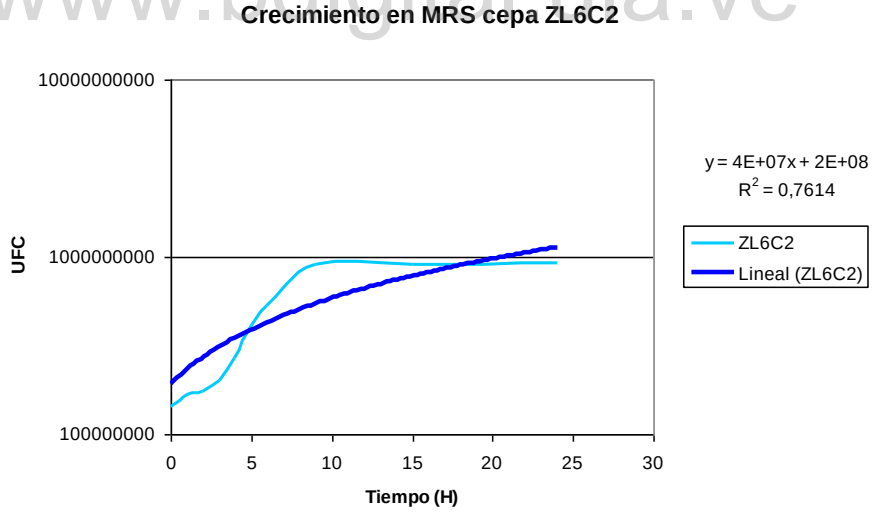


Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




Grafica 9. **Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.

www.bdigital.ula.ve




Grafica 10. **Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano.



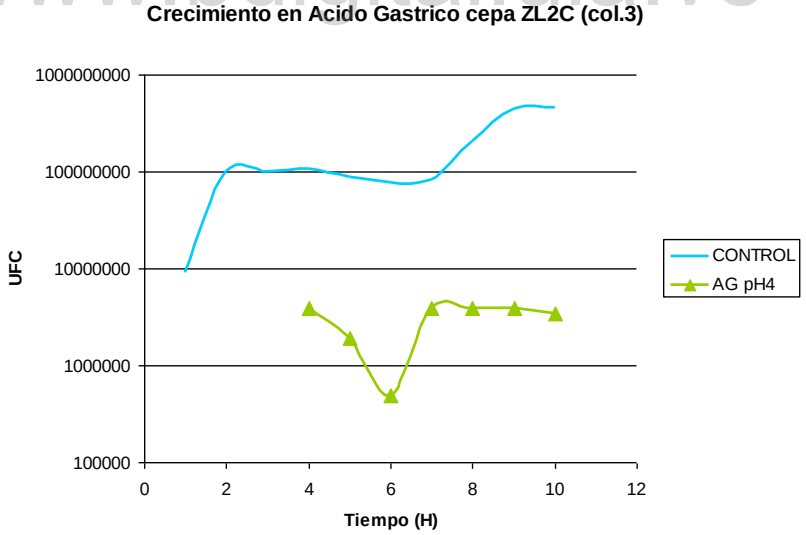
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de las cepas de BAL.**

**Resistencia a la acidez gástrica**

Para esta prueba se seleccionaron cuatro cepas (ZL2C (col.3), ZL4C2, ZL6C1 y ZL6C2) y las cepas que no lograron crecer en las condiciones de acidez en el medio de cultivo MRS ajustados a distintos pH no fueron evaluadas y estas son: ZL1C1, ZL2C1 (col.1), ZL2C1 (col.2), ZL3C1, ZL3C2, ZL4C1 (col.1) y ZL4C1 (col.2). . A continuación se muestran por medio de gráficos el crecimiento MRS (Control) y en MRS suplementado con ácido gástrico para comparar ambos resultados.

www.bdigital.ula.ve

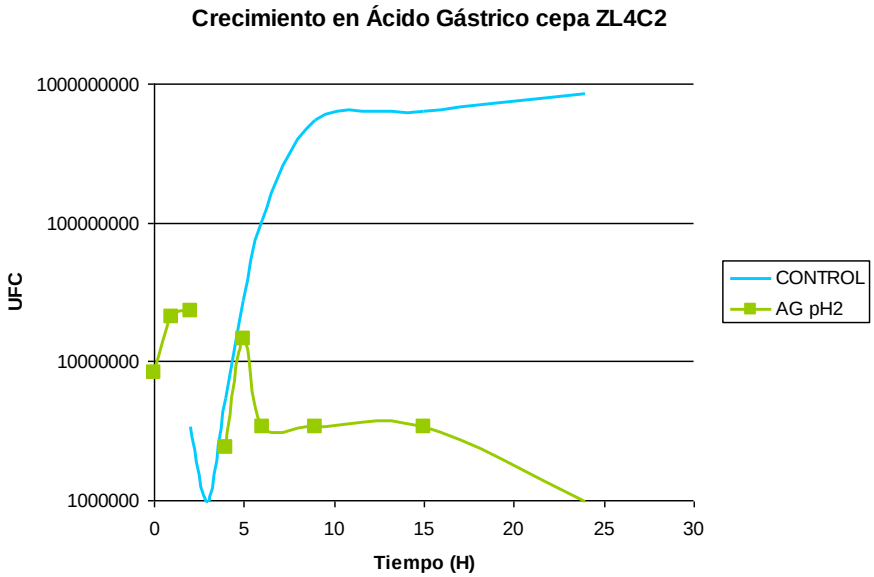



Grafica 11. **Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 4**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

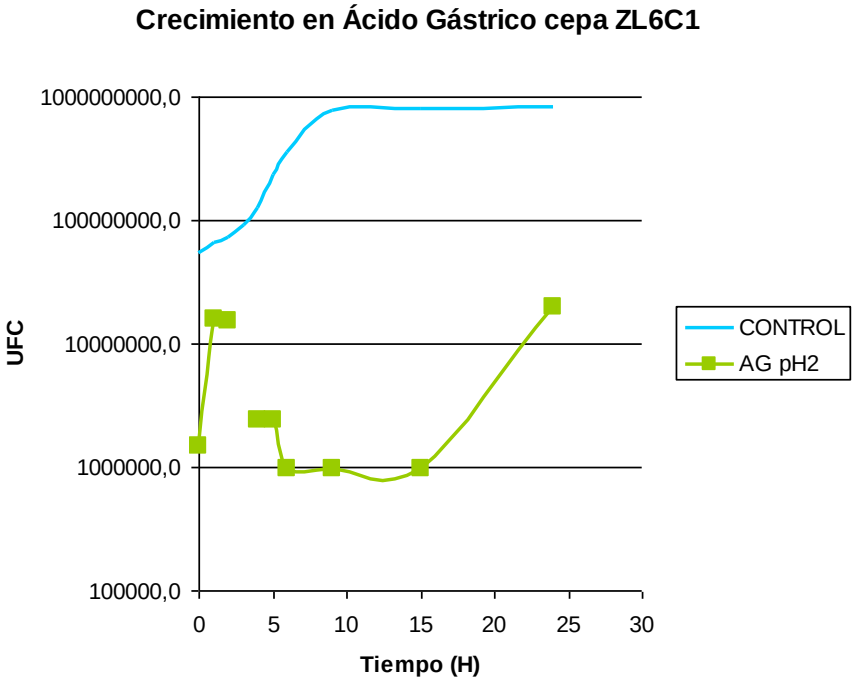



Grafica 12. **Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 2**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

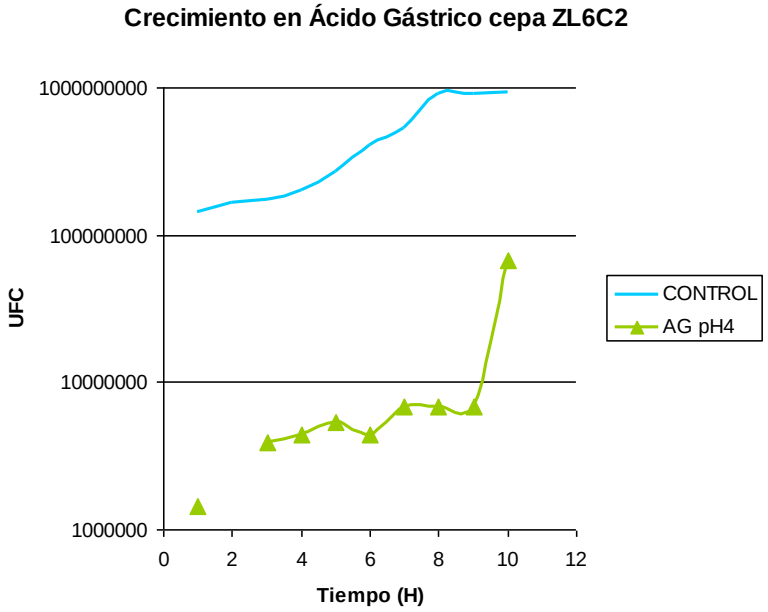



Grafica 13. **Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 2**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




Grafica 14. **Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS como control y MRS suplementado con acido gástrico a pH 4**, en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

www.bdigital.ula.ve

Con los datos anteriores, se calculó la tasa de crecimiento celular para el análisis estadístico hallando el número de generaciones, tiempo de generación y la velocidad específica de crecimiento. Asimismo, por medio de las tablas expuestas a continuación se realizaron las comparaciones entre las cepas estudiadas que dieron mejores resultados:



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Número de Generaciones.**

**Tabla 5**. **Números de Generación de las cepas sometidas a ácido gástrico** a pH 2 y pH4

| Cepa | Control (MRS) | AG pH 2 | AG pH 4 |
|---|---|---|---|
| ZL6C1 | n=0,79 | n=4,83 | ---- |
| ZL6C2 | n=0,45 | ---- | n=4,51 |

**Tiempo de Generación**

**Tabla 6**. **Tiempos de Generación de las cepas sometidas a ácido gástrico** a pH 2 y pH4

www.bdigital.ula.ve

| Cepa | Control (MRS) | AG pH 2 | AG pH 4 |
|---|---|---|---|
| ZL6C1 | g=5,02 | g=1,86 | ---- |
| ZL6C2 | g=6,58 | ---- | g=1,99 |

**Velocidad de específica de crecimiento**

**Tabla 7. Velocidades especificas de crecimiento de las cepas sometidas a ácido gástrico** a pH 2 y pH4

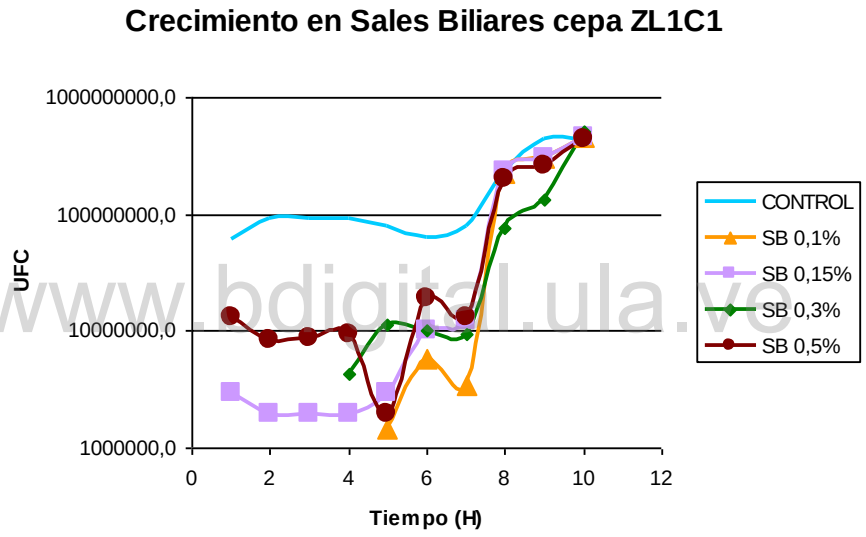
| Cepa | Control (MRS) | AG pH 2 | AG pH 4 |
|---|---|---|---|
| ZL6C1 | $\mu$=0,29 $h^{-1}$ | $\mu$=0,33 $h^{-1}$ | ---- |
| ZL6C2 | $\mu$=0,17 $h^{-1}$ | ---- | $\mu$=0,25 $h^{-1}$ |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Resistencia a sales biliares**

Para esta prueba fueron seleccionadas cinco cepas (ZL1C1, ZL2C (col.3), ZL4C2, ZL6C1 y ZL6C2). Las cepas que no lograron crecer en las distintas concentraciones de sales biliares en el medio de cultivo MRS no fueron evaluadas y estas son: ZL2C1 (col.1), ZL2C1 (col.2), ZL3C1, ZL3C2, ZL4C1 (col.1) y ZL4C1 (col.2).

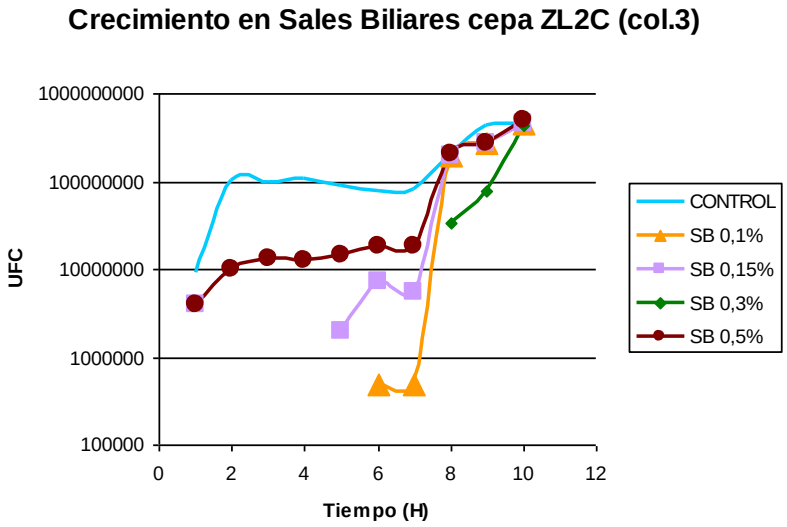



www.bdigital.ula.ve

Grafica 15. **Crecimiento de la cepa ZL1C1 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones** (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%), en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

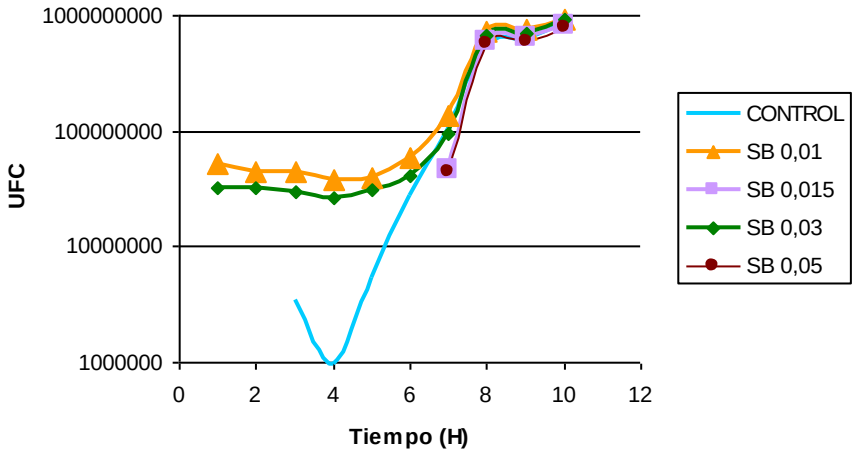


Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




Grafica 16. **Crecimiento de la cepa ZL2C (col.3) en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones** (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%), en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

www.bdigital.ula.ve

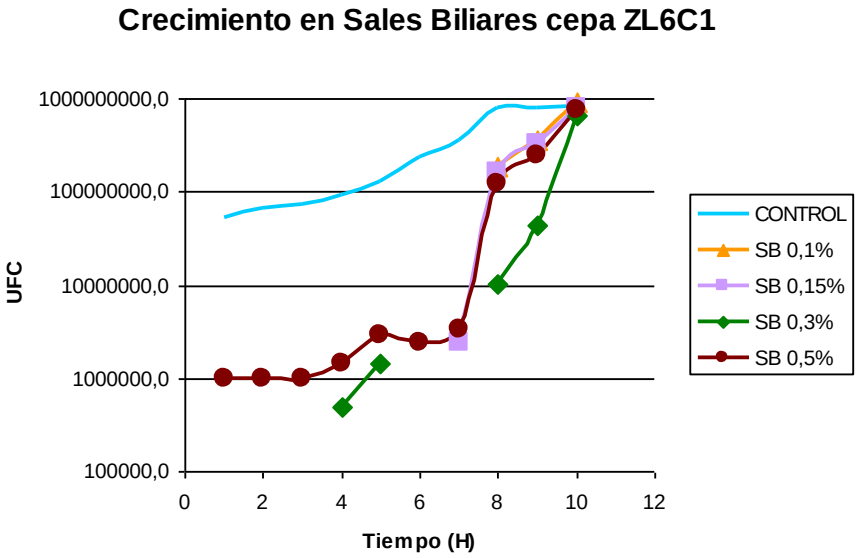



Grafica 17. **Crecimiento de la cepa ZL4C2 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones** (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%), en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias



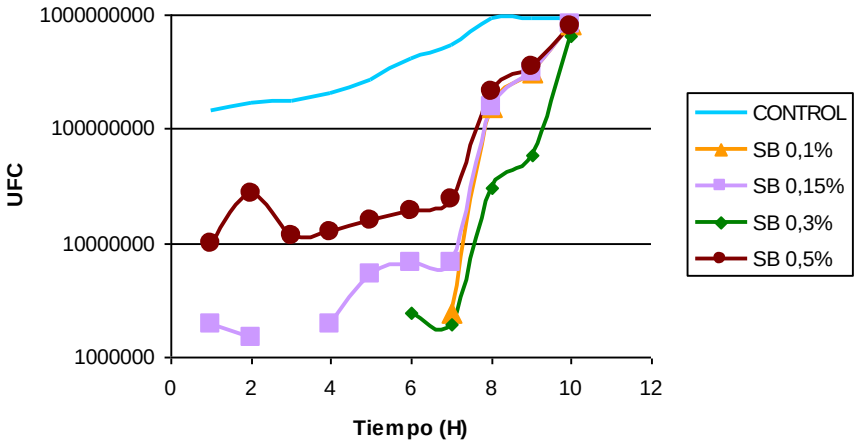
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

(UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.




Grafica 18. **Crecimiento de la cepa ZL6C1 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones** (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%), en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

www.bdigital.ula.ve






Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Grafica 19. **Crecimiento de la cepa ZL6C2 en MRS como control y MRS suplementado con Sales Biliares a distintas concentraciones** (0,1%; 0,15%; 0,30%; 0,5%), en el mismo se muestran las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar a groso modo las distintas fases en el ciclo de crecimiento bacteriano y sus alteraciones.

A continuación, se muestran las tablas comparativas de Tasa de crecimiento celular, de las cepas estudiadas y que arrojaron mejores resultados.

**Número de Generaciones**

**Tabla 8. Números de Generación de las cepas sometidas a Sales biliares**.

www.bdigital.ula.ve

| Cepa | Control (MRS) | SB 0,1% | SB 0,15% | SB 0,3% | SB 0,5% |
|---|---|---|---|---|---|
| ZLC1 | n=0,47 | n=0,46 | n=0,46 | n=0,49 | n=0,47 |
| ZL1C(col.3) | n=0,48 | n=0,47 | n=0,47 | n=2,04 | n=0,47 |
| ZL4C2 | n=0,45 | n=0,44 | n=0,44 | n=0,44 | n=0,44 |
| ZL6C1 | n=0,79 | n=1,89 | n=0,47 | n=2,08 | n=0,48 |
| ZL6C2 | n=0,45 | n=0,47 | n=0,47 | n=0,52 | n=0,47 |

**Tiempo de Generación**

**Tabla 9. Tiempos de Generación de las cepas sometidas a Sales biliares.**

| Cepa | Control | SB 0,1% | SB 0,15% | SB 0,3% | SB 0,5% |
|---|---|---|---|---|---|



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | (MRS) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ZLC1 | g=6,27 | g=6,40 | g=6,40 | g=6,00 | g=6,34 |
| ZL1C(col.3) | g=6,21 | g=6,37 | g=6,35 | g=2,93 | g=6,34 |
| ZL4C2 | g=6,63 | g=6,73 | g=6,71 | g=6,72 | g=6,69 |
| ZL6C1 | g=5,02 | g=3,16 | g=6,28 | g=2,88 | g=6,19 |
| ZL6C2 | g=6,58 | g=6,28 | g=6,27 | g=5,72 | g=6,34 |

**Velocidad de específica de crecimiento**

**Tabla 10. Velocidades especificas de crecimiento de las cepas sometidas a Sales biliares.**

| Cepa | Control (MRS) | SB 0,1% | SB 0,15% | SB 0,3% | SB 0,5% |
|---|---|---|---|---|---|
| ZLC1 | $\mu$=0,35 $h^{-1}$ | $\mu$=1,40 $h^{-1}$ | $\mu$=0,98 $h^{-1}$ | $\mu$=0,70 $h^{-1}$ | $\mu$=0,90 $h^{-1}$ |
| ZL1C(col.3) | $\mu$=0,30 $h^{-1}$ | $\mu$=2,00 $h^{-1}$ | $\mu$=1,20 $h^{-1}$ | $\mu$=0,14 $h^{-1}$ | $\mu$=0,79 $h^{-1}$ |
| ZL4C2 | $\mu$=0,55 $h^{-1}$ | $\mu$=0,55 $h^{-1}$ | $\mu$=0,85 $h^{-1}$ | $\mu$=0,64 $h^{-1}$ | $\mu$=0,85 $h^{-1}$ |
| ZL6C1 | $\mu$=0,29 $h^{-1}$ | $\mu$=0,10 $h^{-1}$ | $\mu$=1,39 $h^{-1}$ | $\mu$=0,24 $h^{-1}$ | $\mu$=1,18 $h^{-1}$ |
| ZL6C2 | $\mu$=0,17 $h^{-1}$ | $\mu$=1,39 $h^{-1}$ | $\mu$=1,04 $h^{-1}$ | $\mu$=0,41 $h^{-1}$ | $\mu$=0,72 $h^{-1}$ |

www.bdigital.ula.ve

**Actividad antagónica preliminar de BAL sobre microorganismos patógenos**

**Tabla 11. Actividad antagónica preliminar** de cuatro cepas de BAL estudiadas frente a microorganismos patógenos

| | Cepas Patógenas |
|---|---|



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| Cepas Estudio | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| ZL1C1 (a) | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - |
| ZL1C1 (b) | - | + | - | ** | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | * |
| ZL2C(col .3) (a) | - | + | - | * | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | * |
| ZL2C(col .3) (b) | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| ZL4C2 (a) | + | | + | * | + | | + | | + | | + | | + | | + | |
| ZL4C2 (b) | + | | + | | + | | + | | + | | + | | + | | + | |
| ZL6C1 (a) | + | | + | | + | | + | | + | | + | | + | | + | |
| ZL6C1 (b) | + | | + | * | + | | + | | + | | + | | + | | + | |

www.bdigital.ula.ve

Leyenda

- **+** : Crecimiento
- **-** : No hubo crecimiento
- ***** : Crecimiento disminuido
- ****** :Colonias pequeñas en toda la placa
- **1** : *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- **2**: *Enterococcus fecalis* (ATCC 29212)
- **3**: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- **4**: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- **5**: *Escherichia coli* productora de BLEE (ATCC 35218)
- **6**: *Salmonella* sp.
- **7**: *Lactobacillus acidophylus* (ATCC 610)
- **8**: *Streptococcus mutans* (ATCC 656)



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

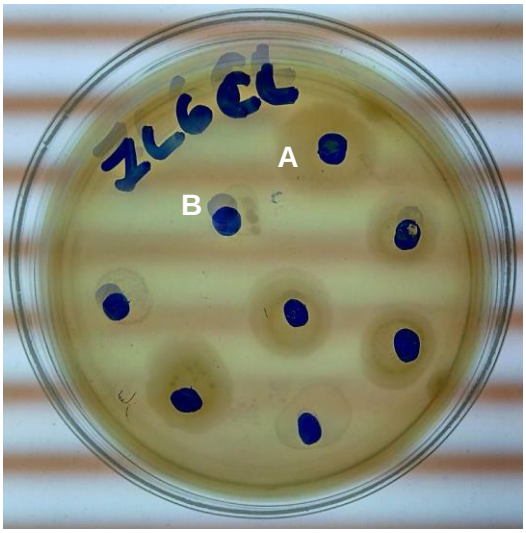



Figura 4. **Prueba de Antagonismo**. A) Halos de crecimiento bacteriano. B) Inhibición del crecimiento de cepa patógena (no hay halo de crecimiento).

www.bdigital.ula.ve

**Identificación de las cepas**

Por medio del Sistema API 50 CHL Médium y API Web, se realizó la identificación bioquímica de las cepas con más propiedades probióticas preliminares y se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 12. Perfil bioquímico de la cepa ZL1C1**

| Tubo 0 | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | Tubo 6 | Tubo 7 | Tubo 8 | Tubo 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | ? | - | - | ? | + | - | - | ? | - |
| Tubo 10 | Tubo 11 | Tubo 12 | Tubo 13 | Tubo 14 | Tubo 15 | Tubo 16 | Tubo 17 | Tubo 18 | Tubo 19 |
| + | + | + | + | + | ? | - | ? | + | + |
| Tubo 20 | Tubo 21 | Tubo 22 | Tubo 23 | Tubo 24 | Tubo 25 | Tubo 26 | Tubo 27 | Tubo 28 | Tubo 29 |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ? | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tubo 30 | Tubo 31 | Tubo 32 | Tubo 33 | Tubo 34 | Tubo 35 | Tubo 36 | Tubo 37 | Tubo 38 | Tubo 39 |
| + | + | ? | - | + | ? | ? | - | ? | + |
| Tubo 40 | Tubo 41 | Tubo 42 | Tubo 43 | Tubo 44 | Tubo 45 | Tubo 46 | Tubo 47 | Tubo 48 | Tubo 49 |
| - | - | + | - | - | ? | ? | + | - | - |

**Taxón significativo**: *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*)

**Pruebas en contra**: MDG 85% MEL 9% TUR 82%

**Tabla 13**. **Perfil bioquímico de la cepa ZL2C (col.3)**

| Tubo 0 | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | Tubo 6 | Tubo 7 | Tubo 8 | Tubo 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | + | - | - | + | + | - | - | ? | - |
| Tubo 10 | Tubo 11 | Tubo 12 | Tubo 13 | Tubo 14 | Tubo 15 | Tubo 16 | Tubo 17 | Tubo 18 | Tubo 19 |
| + | + | + | + | + | ? | - | ? | + | + |
| Tubo 20 | Tubo 21 | Tubo 22 | Tubo 23 | Tubo 24 | Tubo 25 | Tubo 26 | Tubo 27 | Tubo 28 | Tubo 29 |
| ? | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tubo 30 | Tubo 31 | Tubo 32 | Tubo 33 | Tubo 34 | Tubo 35 | Tubo 36 | Tubo 37 | Tubo 38 | Tubo 39 |
| + | + | + | - | + | ? | ? | - | ? | + |
| Tubo 40 | Tubo 41 | Tubo 42 | Tubo 43 | Tubo 44 | Tubo 45 | Tubo 46 | Tubo 47 | Tubo 48 | Tubo 49 |
| - | - | + | - | - | ? | ? | + | - | - |

www.bdigital.ula.ve

**Taxón significativo**: *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*)

**Pruebas en contra**: LARA 8%, MDG 85% MEL 9% TUR 82%

**Taxón siguiente**: *Lactobacillus plantarum* 1



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Pruebas en contra**: GLY 1%, SBE 2%, TAG 7%




www.bdigital.ula.ve

Figura 5. **Pruebas bioquímicas fenotípicas** utilizando el Sistema API 50 CHL Medium.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## *Discusión*

### Identificación fenotípica de las BAL

En la presente investigación se obtuvieron cepas de BAL con características similares a las descritas en la bibliografía, son bacilos y cocobacilos Gram positivos y catalasa negativa con buen crecimiento en el medio MRS y Tripticasa soya a las 24 y 48 horas de incubación, en especial las cepas ZL1C1, ZL2C (co.3) y ZL6C1. Resultados similares tuvieron Avila y col, 2011 aislaron y caracterizaron de muestras de diferentes animales (1 de terneros, 7 de pollos, 4 de cerdos y 2 de patos), 14 colonias de morfología bacilar, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas y de crecimiento, tales como producción de ácido láctico, Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas y no presentaron esporas, además de mostrar un buen crecimiento en placas de agar MRS a 24 horas de incubación. Las cepas seleccionadas presentaron. La prueba de catalasa de las cepas fueron negativas, característica general del género *Lactobacillus*, y concuerda con Martín y colaboradores (2009), quienes describen que las bacterias lácticas carecen de la enzima.

www.bdigital.ula.ve

Por su parte, Perelmuter y colaboradores en 2008 y Avila y colaboradores (2010) en sus estudios demostraron que las cepas que aislaron pertenecen al género *Lactobacillus* spp. De igual manera, en este estudio se demostró que las cepas ZL1C1 y ZL2C (col.3) pertenecen al mismo género *Lactobacillus.* Martín y colaboradores (2009) identificaron Lactobacilos en caninos lactantes pertenecientes a distintas especies (*L. reuteri, L. fermentum, L. murinus y L. animalis*) a diferencia de este estudio las dos cepas identificadas pertenecen a la especie *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*). Para diferenciarlas, se nombraron



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

como *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*) Z1 y *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*) Z2.

Las cepas estudiadas presentaron como característica especial un comportamiento bioquímico igual al fermentar el azúcar D-melbiosa, no fermentaron Metil-αD-glucopiranosida y D-turanosa y se diferenciaron en la fermentación de Glicerol, L-arabionosa y D-trealosa, ya que ZL2C (col.3) presentó una fermentación positiva y ZL1C1 fue dudosa. A diferencia de las cepas de *Lactobacillus plantarum* 1 identificadas por Jurado y colaboradores (2009) las cuales mostraron que tenían la capacidad de fermentar 2-cetogluconato potásico y D-sorbitol.

Finalmente, en el estudio de García y colaboradores en 2011 y en el de Porturas en mismo año se emplearon métodos para aislar bacterias de los géneros con potencial aplicación probiótica, las cuales incluyen extracción del intestino de los animales estudiados para la toma de muestra, y las determinaciones se hicieron por técnicas moleculares, siendo más agresivos que los utilizados en este estudio, en el cual todas la pruebas empleadas fueron *in vitro* tanto para la identificación como para las pruebas probióticas.

www.bdigital.ula.ve

**Evaluación de la capacidad probiótica in Vitro de las cepas de BAL**

Según Jurado y colaboradores (2009) las pruebas de viabilidad a diferentes concentraciones de pH son de gran importancia para saber si las bacterias presentan una viabilidad alta a pH bajo, como es el caso del que se presenta en el estómago del lechón, donde puede alcanzar valores hasta de pH 2,0. Además, los investigadores pudieron observar que, en la prueba de pH a 3,5, las viabilidades en el tiempo T0, T1 y T2 de *L. plantarum* 1 H2 y *L. plantarum* 1 H1, los resultados fueron similares los nuestros con los caninos excepto con una pequeña variación en el tiempo T2, indicando, que si el



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

lechón consume el alimento, hasta las tres horas, las bacterias lácticas del inóculo mantienen una viabilidad alta (mayor a 3,0 x 108 UFC/ml). En nuestro caso, sólo la cepa ZL6C1 logró crecer a pH 2 y la ZL6C2 creció a pH 4, ambas viables a partir de la cuarta hora con un crecimiento disminuido y a partir de la sexta hora mantuvieron una viabilidad similar. Además, de estas cepas se lograron calcular las tasas de crecimiento celular, en las que se puede observar números de generación, tiempo de generación y velocidad especifica de crecimiento que demuestra nuevamente su viabilidad y que se podrían tomar en cuenta parar preparar inóculos para el consumo de los caninos.

Por otro lado, en nuestro estudio, el crecimiento de las cepas probióticas seleccionadas se vio afectado significativamente por los niveles de pH. Las cepas C3 y P26 presentaron un crecimiento superior con respecto a las cepas PT7 y T3 para todos los niveles de pH evaluados. La cepa P26 mostró menor tolerancia al pH ácido de todas las cepas evaluadas (Ávila y col, 2011). Las cepas de nuestra investigación tuvieron un comportamiento similar, ya que de cuatro cepas estudiadas, sólo dos (ZL6C1 y ZL6C2) tuvieron crecimiento bajo en los distintos niveles de pH y las cepa ZL4C2 fue la que menos toleró la acidez gástrica.

www.bdigital.ula.ve

Las cinco cepas a las que se les realizó la prueba de resistencia a sales biliares resistieron todas las concentraciones de sales biliares, incluso las más altas, demostrando patrones similares al control en MRS sin suplementar, mostrando relación con los resultados de Pallin (2012) en los cuales muestra que la mayoría de sus cepas crecieron en las distintas concentraciones de sales biliares. Las cepas que no lograron crecer en las distintas concentraciones de sales biliares en el medio de cultivo MRS no fueron evaluadas (ZL2C1 (col.1), ZL2C1 (col.2), ZL3C1, ZL3C2, ZL4C1 (col.1) y ZL4C1 (col.2)).

Perelmuter y colaboradores (2008), hicieron referencia a la cepa con mayor crecimiento en sales biliares, la cual, para este caso, fue la ZL4C2 en



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

casi todas las concentraciones abundantemente, excepto en 0,5% de sal biliar en donde su crecimiento se vio disminuido.

En nuestro estudio, las todas cepas crecieron en grandes cantidades a la concentración de 0,5% de sales biliares, con lo cual se puede inferir que sales biliares favorecen su crecimiento desde la sexta hora. Ese crecimiento se debe a que poseen enzimas hidrolasas para las sales biliares, lo que permite que puedan ser utilizadas en su metabolismo. Esto concuerda nuevamente con el estudio de Perelmuter y colaboradores (2008) ya que las cepas que utilizaron se adaptaron a partir de la cuarta hora a una concentración de 1% de sales biliares.

La mayoría de las cepas evaluadas por Sánchez y Tromps (2014) exhibieron actividad antagónica contra la totalidad de los patógenos estudiados. El 63,6% de las cepas seleccionadas inhibieron a *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus,* el 75,7% a *Salmonella typhimurium* y el 72,7% a *Pseudomonas aeruginosa.* Los halos de inhibición fueron variables en cada grupo de las bacterias evaluadas. En este estudio, la cepa ZL1C1 inhibió a todas las cepas patógenas utilizadas en la prueba de antagonismo bacteriano a las 24 horas, dado que no se observó halo de crecimiento.

www.bdigital.ula.ve

*Salmonella sp., Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Escherichia coli* productora de BLEE solo fueron inhibidas por la cepa ZL1C1 a las 24 horas; y a las 48 horas, solo a *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Streptococcus mutans.* Es importante resaltar la inhibición de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* dado que concuerdan las cepas patógenas utilizadas con los estudios en Caninos de Sánchez y Tromps (2014) y Martín y colaboradores (2009), por las afecciones que causan en los caninos.

La cepa ZL2C (col.3) inhibió a *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas, resaltando la inhibición de *Enterococcus fecalis* que también fue inhibida por las cepas de Martín y colaboradores en 2009.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### *Conclusiones*

- Se aislaron BAL con propiedades probióticas del tracto gastrointestinal de caninos lactantes, alimentados solo con leche materna. Este resultado confirma parcialmente la hipótesis de la investigación, ya que no se logró aislar de la leche materna.

www.bdigital.ula.ve

- ZL1C1 y ZL2C (col.3) fueron las cepas con mejor capacidad para inhibir microorganismos patógenos y además de soportar las sales biliares en todas las concentraciones utilizadas. Sin embargo dichas cepas no fueron viables en los distintos pH que se ajusto el medio MRS para la prueba de resistencia a la acidez gastrica.

- *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*) Z1 y *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*) Z2 mostraron un gran perfil de bacterias lácticas con características probióticas, que los hacen interesantes desde el punto de vista del potencial probiótico y candidatas a continuar el proceso de evaluación de las características probióticas sugeridas por la OMS/FAO y constituirse en una alternativa para sustituir las terapias con

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

antibióticos como un método menos agresivo y para la estimulación del sistema inmune de los caninos adultos y los caninos destetos.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## *Recomendaciones*

En vista de los resultados que se han obtenido en este estudio, en esta sección se presenta una serie de recomendaciones para la realización de estudios similares sobre la presencia y uso de probióticos en caninos.

- Se sugiere evaluar otras técnicas de recolección de la muestra de leche materna de caninos que permitan la obtención de una muestra mas representativa que permita determinar la relación clonal entre especies aisladas de caninas adultas y los caninos lactantes.

- Se recomienda repetir pruebas probióticas a los microorganismos con mejor comportamiento, en los que no se obtuvo el resultado esperado (ZL1C1 y ZL6C1).

www.bdigital.ula.ve

- Se debe utilizar otro u otros métodos de conservación para evitar la muerte bacteriana antes de realizar las pruebas.

- Es aconsejable emplear, en la prueba de antagonismo bacteriano, otros microorganismos que afecten el tracto gastrointestinal de los caninos, tales como: *Campylobacter* sp*; Clostridium* sp*.* y *Yersinia* sp*.*

- Se debe evaluar la naturaleza de las sustancias antagónicas que producen las cepas evaluadas para saber su composición.

- Se sugiere realizar las pruebas de crecimiento a 15 y 42 °C, producción de gas a partir de glucosa, motilidad y producción de indol.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Se recomienda efectuar otros ensayos para evaluar la capacidad probiótica in vitro como adherencia a células del intestino de los caninos y resistencia a los antimicrobianos de uso veterinario.

- Es importante confirmar por métodos moleculares la identificación de estas bacterias.

- Se deben realizar pruebas adicionales que permitan probar las propiedades probióticas de estas bacterias en los caninos y los beneficios que pueden ofrecer en los mismos.

- Se recomienda elaborar productos alimenticios y/o farmacéuticos a partir de las bacterias obtenidas en este estudio de uso veterinario para caninos.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS


Alais. C. (1985). **Ciencia de la leche: principios de técnica lechera.** Barcelona, España**:** Editorial Reverte.

Alvarado, C y Díaz C. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. **Revista Facultad de Farmacia**, 51 (1), 8-14.

Aparicio, G. (2016). **Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos. Producción de bacteriocinas.** Trabajo de Grado en Biología no publicado, Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Jaén-España.

Ávila, J.; Ávila, M.; Tovar B.; Brizuela, M.; Perazzo, Y; y Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. **Revista Científica (Maracaibo),** 20 (2), 161-170.

Bazay, G. (2010). Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Sistema de Revisiones en la Investigación Veterinaria de San Marcos,** 1-13. [Revista en línea]. **Recuperado el 10 de Febrero de 2015, de http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_bazay_Saccharomyces_cerevisiae.pdf**

Cortez, R; Aranguren A; González, M; Perazzo Y. y López-Ortega A. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico del género *Lactobacillus* spp a partir de heces de perros (*Canis lupus falmiliaris*) mestizos lactantes. **Gaceta de Ciencias Veterinarias**, 19, 5-10.

Cueto, M; Acuña, Y. y Valenzuela, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias Ácido lácticas aisladas de suero costeño. **Revista Actual Biol**, 32 (93): 129-138.


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

García, M. (2011). Cepa bacteriana. Recuperado el día 15 de Febrero de 2015 de **http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Cepa_bacteriana.**

García, Y; García, Y; Núñez O.; Dihigo, L.; Silva, J.; y Nicoli, J. (2011). Aislamiento e identificación de cepas de *Lactobacillus* de origen porcino con posibilidades de uso en preparados probióticos. **Revista Computadorizada de Producción Porcina**, 18 (2), 111-114.

García, Y; López, M; Bocourt, R; Rodríguez, Z y Savón L. (2012). Los prebióticos en la alimentación de animales monogástricos. **Revista Cuban Journal of Agricultural Sciencie**, 46 (3), 231-236.

García-Mazcorro, J, Y Minamoto, Y. (2013). Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. **Revista Archivos de medicina veterinaria**, 45 (2), 111-124.

Genoma, D. (2009). Amplificación del ADN: la PCR. Recuperado el 11 de Febrero de 2015 **de http://blogdelaboratorio.com/amplificacion-del-adn-la-pcr/**

www.bdigital.ula.ve

Gutiérrez, L.; Montoya, O.; y Vélez, J. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. **Revista Producción Más Limpia**, 8 (1), 135-146. Recuperado el 10 de enero de 2015, de **http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Cepa_bacteriana**

Hernández, S., Fernández, C., y Baptista L. (2010). *Metodología de la investigación.* (Quinta edición). México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Hurtado, J. (2010). El "para qué" o los objetivos de la Investigación. En: *El proyecto de investigación: comprensión holística de la metodología y la investigación*. (Sexta Edición). Caracas: Quirón Ediciones.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Intermediate Technology Development Group. (1998). Procesamiento de lácteos. Lima, Perú: Editorial Soluciones Prácticas.

Jurado, H.; Aguirre, D.; y Ramírez, C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. **Revista MVZ Córdoba**, 14, 1723-1735.

Kandler, O., N. Weiss, 1(986). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2), Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234.

Kéfir Bacterias. (2013). **Antecedentes de las bacterias lácticas**. Recuperado el 11 de Octubre de 2014, de **http://www.faggella.com.ar/Bacterias.htm**

König, H. y Liebich, H. (2005). **Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color** (Vol. 2). España: Editorial Médica Panamericana.

Laboratorio bioMérieux, (2007). API 50CLH Medium. Francia. Recuperado el 10 de febrero de 2015, de **http://www.biologiemarine.com/___fiches/APIpdf/API%2050%20CHL%20Medium-_07486_-_G_-_50410.pdf**

Laboratorios Britania. (2010). MSR Agar. Argentina. Recuperado el 10 de febrero de 2015, de **http://www.britanialab.com/productos/404_hoja_tecnica_es.pdf**

Lan-Szu Chou y Bart Weimer. (1999), **Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus* 1**. J Dairy Sci 82,23–31.

Mas, M. y Mascó, J. (2014). **Las maravillas de la flora: Descubre la flora intestinal, un nuevo órgano que ésta revolucionando la comunidad científica mundial**. España: Editorial AMAT.

Montiel, F. (1997). Flora bacteriana habitual. **Revista Boletín Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile**, 26,133-139.

Martín, R; Olivares, M; Pérez, M; Xaus, J; Torre, C; Fernández, L. y Rodríguez, J. (2010). Identification and evaluation of the probiotic

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

potential of *Lactobacilli* isolated from canine milk. The Veterinary Journal, 193–198.

Mora, N. y García, A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de Pregrado sin publicar. **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**. Pachuca de Soto, México.

Moreno, R., Salas, E., Pérez, C. y Jiménez, J. (2011|). Evaluación del potencial probiótico de *Lactobacilos* aislados de heces de lactantes y leche materna*.* **MedULA, Revista de Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes**. 20 (2).

Organización Mundial de la Salud. (2013). Resistencia bacteriana. Recuperado el día 15 de Febrero de 2015 de **http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/**

Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). **The "hygiene hypothesis" for autoimmune and allergic diseases: an Update**. Clinical and Experimental Immunology, 160(1), 1-9.

www.bdigital.ula.ve

Pallin, A. (2012). *Lactobacilli* in the gastrointestinal tract of dog and wolf: isolation, identification and characterization of *L. reuteri.* Second cycle, A2E. Uppsala Suecia: SLU, Dept. of Microbiology. Recuperado el 10 de febrero de 2015, de http://stud.epsilon.slu.se/4713/

Palella, S. y Martins, F. (2010). La metodología o marco metodológico. En: *Metodología de investigación cuantitativa.* (Segunda Edición). Caracas: FEDUPEL.

Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. **Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, 8 (1), 93-105.

Perelmuter, K; Fraga, M.; y Zunino, P. (2008). In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, 104 (6), 1718-1725 [Revista en línea]. Recuperado el 10 de Octubre de 2014, de



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13652672.2007.03702.x/full

Pérez, A. (2005). Marco Metodológico para Diseños de Campo y Proyectos Factibles. En: *Guía metodológica para Anteproyectos de Investigación*. (Segunda Edición). Caracas: FEDUPEL.

Piera, M. (2009). **Alimentos Probióticos**. Recuperado el día 8 de Febrero de 2016 de www.medicina21.com/Articulos/V66-Alimentos_probiticos.html

Porturas, K.(2011). Aislamiento e identificación por técnicas moleculares de aislados bacterianos pertenecientes a géneros con potencial aplicación probiótica en el intestino de cuyes (*Cavia porcellus*); Tesis Pregrado sin publicar. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Ramírez, A; García, E; Longa, A; Sánchez, K; Nieves, M; Velazco, J; Araque, M y Mosqueda, N. (2006). **Manual práctico de bacteriología general**. Mérida, Venezuela: Editorial Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes.

Ramírez, J.; Ulloa, P.; Velázquez, M.; Ulloa, J.; y Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, 2, 1-3.

Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral sin publicar**.** Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Salas, E. (2004). **Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso fresco no pasteurizado elaborado en forma artesanal.** Trabajo de Grado de Maestría en Microbiología en Alimentos no publicado, Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida.

Sánchez, L. y Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. **Revista de Salud Animal**, **36** (2) 124-129.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Spencer, J. y A.L.R. de Spencer. (2001). **Food Microbiology Protocols**. Vol. 14, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, ISBN-13: 9781592590292, Page: 495

Suskovic J., BrKick B., Matosic S. y Maric V. (1997). ***Lactobacillus acidophilus* M92 as potencial probiotic strain**. Milchwissenschaft .52(8).

Vargas, E.; Gómez, C.; Parra, M.; y Romero, M. (2014). Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte). **Revista de Ingeniería**, **20**, 23-33.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Anexos**

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Anexo A. Medio de Cultivo Man Rogosa Sharpe** (Britanialab, 2010)

Medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

**Fundamento.** El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe. Por su formulación, permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. El agar es el agente solidificante. Ver en el Anexo A la formula, instrucciones de preparación del medio, procedimiento de inoculación, incubación e interpretación de los resultados del mismo.

www.bdigital.ula.ve

**Fórmula** (en gramos por litro)

Proteosa peptona Nº3.....10.0
Extracto de carne.....10.0
Extracto de levadura.....5.0
Glucosa.....20.0
Monoleato de sorbitán.....1 ml
Fosfato dipotásico.....2.0
Acetato de sodio.....5.0
Citrato de amonio.....2.0
Sulfato de magnesio.....0.2
Sulfato de manganeso.....0.05
Agar.....13.0
pH final: 6.4 ± 0.2



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Instrucciones**

Suspender 68,25 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante 1 ó 2 minutos para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos. Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles.

**Características del medio**

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

**Procedimiento**

Siembra por inoculación directa del material en estudio, estriando la superficie del medio de cultivo.

www.bdigital.ula.ve

**Incubación**

En atmósfera con 5% de CO2, a 35-37 ºC durante 24-72 horas.

**Interpretación de los resultados**

Observar la morfología y el color de las colonias.

**Anexo B. Galerías API 50 CHL Medium.**

El sistema API 50 CHL Medium, destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos, se presenta listo para su empleo y permite realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CH.

**Principio**

Se pone en suspensión el microorganismo a estudiar en el medio y después se inocula en cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático de identificación. Revisar Anexo B la composición de medio, muestras, modo de empleo, preparación del inoculo, inoculación de la galería, lectura e interpretación

**Composición del medio**

| | |
|---|---|
| API 50 CHL Medium 10 ml | Polipeptona 10 g<br>(origen bovino/porcino)<br>Extracto de levadura 5 g<br>Tween 80 1 ml<br>Fosfato dipotásico 2 g<br>Acetato sódico 5 g<br>Citrato diamónico 2 g<br>Sulfato de magnesio 0,20 g<br>Sulfato de manganeso 0,05 g<br>Púrpura de bromocresol 0,17 g<br>Agua desmineralizada 1000 ml<br>pH : 6,7-7,1 |

www.bdigital.ula.ve

Las cantidades indicadas pueden ajustarse en función de los títulos de las materias primas.

**Muestras** (toma y preparación)

El sistema API 50 CHL Medium no debe ser utilizado directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. En una primera fase, los microorganismos a identificar deben aislarse sobre un medio de cultivo adaptado según las técnicas usuales en bacteriología.

**Modo de empleo**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Selección de las colonias

- Verificar la pureza del cultivo.
- Cultivarla sobre medio MRS con agar 24 H a 30 ºC ó 37 °C en anaerobiosis. La temperatura de incubación varía según el origen de la cepa.
- Verificar su pertenencia a las bacterias lácticas: bacterias Gram (+), catalasa (-), no esporuladas, anaerobias (estrictas o facultativas), cultivables sobre el medio MRS.
- Si se utilizan cepas liofilizadas o congeladas, realizar 2 subcultivos en caldo MRS antes del aislamiento sobre el medio MRS con agar.

**Preparación del inóculo**

- Con el DENSIMAT o Densitómetro ATBTM:
    - Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium como se indica en el párrafo “Precauciones de utilización".
    - Tomar varias colonias idénticas.
    - Realizar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de McFarland en la ampolla de API 50 CHL Medium. Esta suspensión debe utilizarse de inmediato.
- Sin el DENSIMAT o Densitómetro ATB :
    - Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (2 ml) como indica el párrafo "Precauciones de utilización" o utilizar un tubo que contenga agua destilada estéril sin aditivos.
    - Tomar todas las colonias del cultivo con la ayuda de un escobillón.
    - Realizar una suspensión densa (S) en la ampolla.
    - Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (5 ml) como indica el párrafo "Precauciones de utilización”.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Realizar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión S: anotar dicho número de gotas (n).
- Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium como indica el párrafo "Precauciones de utilización" e inocular con 2 veces el número de gotas citadas (o sea 2n). Esta suspensión debe utilizarse de inmediato.

- Homogeneizar.

**Inoculación de la galería**

- Repartir el API 50 CHL Medium así inoculado sólo en los tubos, y recubrir los ensayos con aceite de parafina.
- Incubar a 29 °C **±** 2 °C ó 36 °C **±** 2 °C, en aerobiosis durante 48 horas (± 6 horas).

www.bdigital.ula.ve

**Lectura e interpretación**

Lectura de la galería (Consultar ficha técnica API 50 CH)

- Leer después de 48 horas de incubación.
- En cada tubo se investiga la acidificación producida, la cual se traduce por el cambio de color a AMARILLO del púrpura de bromocresol contenido en el medio.

  En el ensayo de esculina (tubo N° 25) se observa un viraje de color de púrpura a NEGRO.
- Anotar los resultados en la hoja de resultados.

**Interpretación**

El perfil bioquímico así obtenido puede ser identificado a partir de la base de datos, con la ayuda del programa informático de identificación apiwebTM.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Anexo C. Consentimiento Informado**

En el Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas “Celina Araujo de Pérez”, adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela, se está realizando el proyecto de investigación intitulado IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS EN LECHE Y HECES DE *Canis lupus familiaris* LACTANTES, con el objeto de Encontrar especies de Bacterias Ácido Lácticas probióticas presentes en la leche caninos y en las heces de sus crías. En consecuencia se redacta el presente consentimiento informado, el cual será del conocimiento de la o las personas que decidan someter a sus mascotas a la referida investigación, texto que contiene el consentimiento, el cual le será leído pormenorizadamente y, libre de coacción y apremio, será firmado por la persona que consienta someter a su mascota a la investigación.

www.bdigital.ula.ve

Yo,_____titular de la Cédula de Identidad:_____

Nacionalidad,_____, mayor de edad, Estado Civil,_____

Domiciliado en:_____y jurídicamente hábil, en USO pleno de mis facultades mentales, sin que medie coacción ni violencia alguna, y en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que más abajo se indica, mediante la presente declaro:

1.- Haber sido informada de manera objetiva, clara y sencilla, por parte del grupo de Investigadores del Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, coordinados por la Profesora Elaysa J. Salas Osorio, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de Investigación intitulado IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS EN LECHE Y HECES DE *Canis lupus familiaris* LACTANTES.

2.- Tener conocimiento claro de que el objetivo fundamental del trabajo antes señalado es:

Encontrar especies de Bacterias Ácido Lácticas probióticas presentes en la leche canina y en las heces de las crías.

3.- Haber sido informado(a) de que mi participación en el proyecto consiste en donar de manera voluntaria al Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” una muestra de la leche y heces de Caninos.

www.bdigital.ula.ve

4.- Que las muestras de leche y heces que acepto donar, así como la información que suministre al equipo de investigadores será utilizada única y exclusivamente para determinar:

Las especies de especies de Bacterias Ácido Lácticas presentes en la leche canina y en las heces de sus crías.

5.- Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada con mi identidad y de mis mascotas, así como respecto de cualquier información relativa a mí y a la que tengan acceso por concepto de mi participación de mis mascotas en el proyecto antes mencionado.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

6.- Que estoy de acuerdo con el USO, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio, con garantía de resguardo de la identidad personal.

7.-.Que la participación de mis mascotas en dicho estudio no implica riesgo, ni inconveniente alguno para la salud de las mismas.

8.- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte de los integrantes del equipo de investigadores antes mencionado, con quienes me puedo comunicar a través del teléfono 0274-2403516, con la Prof. Elaysa Salas o con el Lic. José Manuel Jiménez.

9.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir, algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

www.bdigital.ula.ve

10.- Que los resultados de las pruebas me serán entregados oportunamente.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento informado, y por cuanto la participación de mis mascotas en este estudio es totalmente voluntaria, acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez”, a realizar el referido estudio en una muestra de leche y heces de caninos que acepto donar a los fines indicados anteriormente.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización, así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi o mis mascotas.

| | |
|---|---|
| Dueño del Paciente participante | Investigador |
| **Nombres:** | **Nombres:** |
| **C.I:** | **C.I:** |
| **Firma:** | **Firma:** |
| Testigo | Testigo |
| **Nombres:** | **Nombres** |
| **C.I:** | **C.I** |
| **Firma** | **Firma** |
| Lugar: | |
| Fecha: | |

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

www.bdigital.ula.ve

Luego de haber explicado detalladamente al paciente la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que, el sujeto que firma como paciente participante este formulario de *Consentimiento Informado* comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez”

Lugar y Fecha:_____



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Anexo D. Ficha Clínica**

| **Fecha** | |
|---|---|

DATOS GENERALES.

| | | |
|---|---|---|
| **Paciente:** | | **Sexo de los lactantes:** |
| **Edad del animal adulto:** | **Edad de los animales lactantes:** | **Raza:** |
| **Tamaño del animal adulto:** | **Teléfonos** | |
| **Correo electrónico** | | |
| **Procedencia** | | |
| **Dirección** | | |
| **Médico Tratante:** | **Centro de Salud:** | |

RESUMEN DE HISTORIA CLÍNICA

_____
_____
_____
_____

ÚLTIMOS TRATAMIENTO FARMACOLÓGICOS QUE RECIBE.

| **Medicamento** | **Posología** |
|---|---|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

www.bdigital.ula.ve

ÚLTIMO TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO.

| | |
|---|---|
| **Indicado para** | |
| **Se realizó Cultivo/Antibiograma** | |
| **Medicamento/Concentración** | |
| **Posología** | |
| **Período de Administración** | |

RECOLECCIÓN DE MUESTRA.

| **Tipo(s) de muestras** | **Código de la muestra** | **Código de la muestra** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| **Responsable** | | **Fecha** | | **Hora** | |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)