

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA**



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRÓBIOTICA  
DE CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus sp.* AISLADOS  
DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE TACNA . 2013”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
MÉDICO CIRUJANO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. MILTON ALADINO RUBÍN DE CELIS VIDAL**

**TACNA – PERÚ**

**2015**

## ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
1.1 FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA	8
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	9
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.4 JUSTIFICACIÓN	10
1.5 DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS	10
CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA	12
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	12
2.2 MARCO TEÓRICO	16
CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES	25
3.1 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	25
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	28
4.1 DISEÑO	28
4.2 AMBITO DE ESTUDIO Y MUESTRA	28
4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	29
4.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	30
4.5 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.	30
4.6 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS	39
CAPÍTULO 5: RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	79

## RESUMEN

**Introducción:** Una diversidad de patologías requieren alternativas de manejo cada vez más biológicas es así que el estudio de los probióticos surge como una alternativa para resolverlas. **Objetivo:** Aislar cepas nativas de *Lactobacillus sp.* de productos lácteos tradicionales de Tacna que manifiesten capacidad probiótica. **Material y Métodos:** Estudio experimental, prospectivo, longitudinal, analítico. El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y el bioterio de la Universidad Privada de Tacna y la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna. Se recolectaron un total 18 muestras de queso artesanal provenientes de las zonas ganaderas del distrito de Tacna. Se realizó el aislamiento e identificación de cepas de *Lactobacillus sp.* Se utilizaron para los ensayos in vivo, 15 ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* de 9 semanas de vida, divididas en 3 grupos: control positivo, al que se administró una cepa reconocida de *Lactobacillus casei*, grupo experimental, que se administró la cepa de la especie de *Lactobacillus sp* seleccionada en las fases previas y grupo control negativo, al que se administró solamente agua potable. Todos los grupos tuvieron dietas hiperlipémicas. **Resultados:** La cepa 15a es la que más se acerca a las características óptimas de necesarias para ser considerada en la siguiente fase del estudio. Respecto al estudio experimental en ratas, durante las primeras 5 observaciones del peso de las especímenes de estudio, existió diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control negativo y los otros grupos. En la sexta y séptima observación ya no existen diferencias entre los tres grupos. El comportamiento, como la respuesta a los estímulos y las características macroscópicas de las heces de todos los individuos fueron normales. Respecto al hemograma el hematocrito y recuento de leucocitos mostraron diferencias significativas sólo durante la

medición al primer día. Los niveles de colesterol total tampoco mostraron diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas al primer día y al último día. **Conclusiones:** Se logró aislar 5 cepas con características del género *Lactobacillus* a partir de quesos confeccionados de manera tradicional en Tacna, siendo la cepa 15 a la que reunió mejores características microbiológicas probióticas de estudio, esta cepa fue tipificada molecularmente y filogenéticamente dentro de la especie *Lactobacillus reuteri* con más de 99% de seguridad. La cepa estudiada preliminarmente cumple la mayoría de condiciones para ser considerada con capacidad potencialmente probiótica.

## ABSTRACT

**Background:** A variety of pathologies require alternatives of increasingly biological management, so that the study of probiotics is an alternative will solve them. **Objective:** To isolate native strains of *Lactobacillus sp.* from traditional dairy products of Tacna to manifest probiotic capacity. **Material and Methods:** Experimental, prospective, longitudinal, analytical study. The study was realized in microbiology laboratory of the Private University of Tacna and Jorge Basadre Grohmann University of Tacna. 18 samples of artisan cheese were collected of several place of Tacna. Isolation and identification of strains of *Lactobacillus sp* performed. We were used for in vivo testing, 15 albin rats (*Rattus norvegicus*) of 9 weeks old, divided into 3 groups: a positive control, with a known strain of *Lactobacillus casei*, a experimental group was administered a strain of *Lactobacillus sp* selected in the previous phases and a negative control group, which was administered drinking water only. All groups had hyperlipemic diets. **Results:** 15a strain is the closest optimal characteristics necessary to be considered in the next phase of the study. Regarding the experimental study in rats, during the first 5 weight observations of specimens, we found statistically significant differences between the negative control group and the other groups. In the sixth and seventh observation there is no longer differences between the three groups. The behavior, response to stimuli and the macroscopic characteristics of feces of all individuals were normal. Regarding to hematocrit and leukocyte count showed differences when measuring only the first day. Total cholesterol levels also showed no significant differences between the two measurements made on the first day and the last day. **Conclusions:** It was possible to isolate 5 strains with characteristics of the genus *Lactobacillus* from cheeses made traditionally in Tacna, with a strain 15a which brought together top microbiological characteristics of study, this strain was typified molecularly and phylogenetically within the species *Lactobacillus reuteri* more than 99% certainty. The strain studied preliminarily meets most conditions to be considered potentially probiotic capacity.

## INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas. Elie Metchnikoff que recibió el premio Nobel en 1908 afirmó que “la dependencia de los microorganismos intestinales, con respecto a los alimentos, hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microorganismos nocivos por microbios útiles” Desde entonces se ha resaltado e investigado muchas de las propiedades de estos microorganismos, siendo los efectos benéficos en el aparato digestivo los más investigados. Como consecuencia de la creciente preocupación de la sociedad por una alimentación más saludable, se han introducido en el mercado una gran cantidad de alimentos y suplementos a los que se les atribuyen efectos “bio” que les confieren un gran atractivo comercial; no obstante, en éstos no siempre se especifica cuáles son realmente los compuestos bioactivos que contienen, ni se definen con claridad los efectos beneficiosos que pueden ejercer sobre la salud.

En Tacna la cuarta causa de morbilidad en la población en general son las infecciones intestinales. Todas estas patologías requieren alternativas de manejo cada vez más biológicas que permitan un uso razonado de antibióticos, es así que el estudio de los probióticos surge como una alternativa para solucionarlas, además de su utilidad en otras patologías respiratorias, inmunológicas e incluso dermatológicas. En la actualidad no existen muchos estudios en la región de Tacna que documenten efectos probióticos de cepas nativas de *Lactobacillus* en Tacna. De lo anteriormente expuesto podemos plantear el siguiente problema: **¿Cuál es la capacidad probiótica de cepas nativas de *Lactobacillus* aislados de productos lácteos de Tacna?** Para resolver dicha incógnita buscaremos aislar cepas nativas de *Lactobacillus sp.* que manifiesten capacidad probiótica en un animal de experimentación como es *Rattus norvegicus*. El estudio contribuirá en el conocimiento de la utilidad de cepas nativas de *Lactobacillus sp* de Tacna como potenciales productos probiótico y los efectos que produciría en seres vivos.

Se trata de un campo muy dinámico desde el punto de vista científico y comercial, además la información sentará las bases para un consecutivo escalamiento buscando su aplicación en un futuro en la dieta de seres humanos y contribuir en la mejora de sus condiciones de vida.

## CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA

Como consecuencia de la creciente preocupación de la sociedad por una alimentación más saludable, se han introducido en el mercado una gran cantidad de alimentos y suplementos a los que se les atribuyen efectos bio que les confieren un gran atractivo comercial; no obstante, en éstos no siempre se especifica cuáles son realmente los compuestos bioactivos que contienen, ni se definen con claridad los efectos beneficiosos que pueden ejercer sobre la salud.<sup>1</sup>

En Tacna la cuarta causa de morbilidad en la población en general son las infecciones intestinales (50.10 x1000 hab.) y las enfermedades del esófago, del estómago, duodenales y del colon que ocupan el sexto lugar (31.56 x1000 hab.). Las enfermedades infecciosas intestinales ocupan la primera causa de mortalidad a nivel preescolar (1- 4años) y la tercera causa de morbilidad infantil.<sup>2</sup> Además la obesidad y la hiperalimentación es la segunda causa de morbilidad infantil con un 507.01 x1000 hab. Todas estas patologías requieren alternativas de manejo cada vez más biológicas que permitan un uso racionado de antibióticos, es así que el estudio de los probióticos surge como una alternativa para solucionarlas.

En la actualidad no existen muchos estudios en la región que documenten los efectos de los probióticos sobre todo en enfermedades

---

<sup>1</sup> Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo Acta Pediátrica Española, 2013;9(61)

<sup>2</sup> Dirección Ejecutiva de Epidemiología. Análisis de situación de salud. Región de Salud Tacna. 2011.



gastrointestinales. A su vez se desconoce el potencial de las cepas nativas de *Lactobacillus* en Tacna, que a pesar de ya haber algunos aislamientos de cepas propias de Tacna, éstas no han podido ser probado de manera experimental, mucho menos en seres vivos, en lo que respecta a su utilidad probiótica, benéfica y su potencial como un producto farmacológico y alimentario de utilidad médica.<sup>3</sup>

En el mercado local y nacional existen muchos productos rotulados como probióticos que no están bien definidos ni probados como tales debido a carencia de estudios locales que demuestren sus ventajas o desventajas.<sup>4</sup>

## **1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA**

Delo anteriormente expuesto podemos plantear el siguiente problema:  
**¿Cuál es la capacidad probiótica de cepas nativas de *Lactobacillus* aislados de productos lácteos de Tacna?**

## **1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Determinar la capacidad probiotica de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna.

---

<sup>3</sup>Viloche J, Tito C. Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. Revista Ciencia y Desarrollo. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 2009:61-66

<sup>4</sup> Organización mundial de gastroenterología. Guías prácticas: Probióticos y prebióticos. Mayo 2008.

### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Aislar cepas del género *Lactobacillus sp.* a partir de productos lácteos elaborados en la Región Tacna.
- ✓ Tipificar las especies de *Lactobacillus sp* aisladas de los productos lácteos.
- ✓ Evaluar la capacidad probiotica de cepas de *Lactobacillus sp* de productos lácteos elaborados en la Región Tacna en base a ensayos laboratoriales .

### 1.4. JUSTIFICACIÓN

El estudio contribuyó en el conocimiento de la utilidad de cepas nativas de *Lactobacillus sp* de Tacna como potenciales productos probiótico y los efectos que produciría en seres vivos. Se trata de un campo muy dinámico desde el punto de vista científico y comercial, resulta necesario por tanto actualizar y contrastar periódicamente la información científica, los avances en las regulaciones aplicables a estos productos y la información. Además la información sentó las bases para un consecutivo escalamiento buscando su aplicación en un futuro en la dieta de seres humanos y su contribución en la mejora de sus condiciones de vida.

### 1.5. DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS

- **Agar M.R.S. (Man Rogosa Sharped):** Agar que sirve para el enriquecimiento, el cultivo y el aislamiento de todas las especies de *Lactobacillus*.
- ***Rattus norvegicus*:** Es una especie de roedor miomorfo de la familia Muridae. Es una de las ratas más conocidas y comunes. Es común su uso en condición albina como animal de experimentación.

- **Cepa:** Es una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.
- **Cepa nativa:** Toda cepa microbiana aislada directamente de un ambiente con condiciones naturales o en la que hayan pasado más de tres generaciones de duplicación bacteriana.
- **Probióticos:** Microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud al huésped.
- **Microbiota:** También conocida como microflora. Es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.

## CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Sulemankhil y colaboradores (2012) en Canadá demostraron que *Lactobacillus reuteri* tuvo potencial como un probiótico mediante la reducción de la interleuquina-8. Además, esta cepa se evaluó, tanto in vitro como in vivo, por determinar su seguridad para el consumo humano. Se alimentó con dosis orales repetidas por 28-días en un estudio en condiciones normales de ratas Sprague-Dawley para demostrar la seguridad de la cepa in vivo. La administración oral de la cepa no produjo cambios en el estado general y no hubo cambios clínicamente significativos en los marcadores bioquímicos y hematológicos de la seguridad en relación con los animales de control tratados con vehículo. Esta evaluación global de seguridad de *L. reuteri* apoya la seguridad de la cepa para su uso como un probiótico.<sup>5</sup>

Amorochó (2011) en España, ha aislado 131 bacterias Lácticas(BAL) de leche de oveja. Posteriormente, se ha evaluado la resistencia frente a las condiciones gastrointestinales. Los resultados muestran que las propiedades probióticas se pueden atribuir a una cepa y no es posible generalizarlo a una especie o género. Algunas de las cepas lácticas de oveja y de la CECT(Colección española de Cultivos Tipo) resultaron de especial interés porque en condiciones in vitro. Demostraron características probióticas que deberían ser confirmadas en posteriores estudios in vivo.<sup>6</sup>

---

<sup>5</sup>Sulemankhil I, Parent M, Jones ML, Feng Z, Labbé A, Prakash S. Caracterización y selección segura in vitro y in vivo de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30253 para aplicación como probiótico. Can J Microbiol. 2012 Jun;58(6):776-87.

<sup>6</sup>Amorochó CM. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra.[Tesis doctoral en Biotecnología]. Universidad politécnica de Valencia.2011

Randazzo y colaboradores(2010) realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar la eficacia protectora de 2 probióticos frente a la invasión de la mucosa intestinal por *Trichinella spiralis*. Se compararon: *Lactobacillus casei* y leche fermentada obtenida en gránulos de kéfir. Los resultados demuestran que ambos probióticos, administrados oralmente, producen un efecto antagónico sobre la penetración del parásito en la mucosa intestinal del hospedador, siendo ambos igualmente efectivos.<sup>7</sup>

Uskova y colaboradores (2010) en Rusia, trabajaron con Ratas macho Wistar las que mantuvieron durante 2 semanas con una ración semisintética con 0,4% de rutina, un glucósido flavonoide, y con la misma ración de alimentación con 0,4% rutina y *Lactobacillus casei* en suspensión en solución salina fisiológica a una dosis de  $2 \times 10^9$  UFC/ml por Kg de peso de la rata. La adición de *Lactobacillus casei* potenció la actividad biológica de la rutina. El probiótico produce un fuerte aumento de la capacidad de rutina para suprimir la actividad pro carcinogénico de  $\beta$ -glucuronidasa bacteriana.<sup>8</sup>

Rodriguez (2009) en España, buscó aislar cepas de *Lactobacillus* que manifiesten capacidad probiótica e inmunomoduladora. Eligió muestras de heces. Luego de caracterizarlas laboratorialmente y molecularmente, se evaluó los posibles efectos sobre el bienestar y también evaluar la translocación de las bacterias administradas por vía oral a los ganglios linfáticos en los animales de laboratorio. Concluyendo que sólo dos de las trescientas treinta y cinco cepas aisladas fueron seleccionadas como posibles probióticos que correspondieron a la especie *Lactobacillus plantarum* que cumplen todas las exigencias establecidas en las *Guidelines*

---

<sup>7</sup> Randazzo V, Costamagna S Comparación del efecto de la administración oral de dos probióticos en ratones infestados con *Trichinella spiralis*. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. (2010); 69 (1): 60-65

<sup>8</sup>Uskova M, Kravchenko L, Avrenjeva L, Tutelyan V. Efecto de *Lactobacillus casei* 114001 probiótico sobre la bioactividad de la rutina. Bull Exp. Biol. Med. 2010; 149 (5):578-82.

*for the Evaluation of Probiotics in Food* por lo que podemos considerarlas como probióticos de aplicación biotecnológica.<sup>9</sup>

Chan y colaboradores(2008) utilizaron *Lactobacillus acidophilus*, aislado del kimchi comida tradicional coreana, para investigar su idoneidad como dietético probiótico. Además investigaron los efectos de *L. acidophilus* sobre el desarrollo de cambios citológicos precancerosas inducidos químicamente en el colon de ratas. El consumo de *L. acidophilus* también disminuyó la proporción de criptas aberrantes. Por lo tanto, *L. acidophilus* mostró una potente actividad probiótica como inhibidor de síntomas inducidos por DMH en ratas vivas. El estudios in vivo indicó que *L. acidophilus* de kimchi puede ser adecuado como un probiótico para el uso humano.<sup>10</sup>

Dock-Nascimento y colaboradores (2007) elaboraron un estudio cuyo objetivo era investigar los efectos de la adición de bacterias probióticas hidrolizadas para la alimentación en la recuperación de las células caliciformes durante renutrición en un modelo animal de la desnutrición. De este trabajo se pudo concluir que, *Lactobacillus helveticus* añadido a la dieta de renutrición mejora la recuperación de la atrofia de la mucosas inducido por la malnutrición especialmente el rápido restablecimiento de las células caliciformes en la mucosa colónica de la población desnutrida.<sup>11</sup>

---

<sup>9</sup> Rodríguez M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e Inmunomoduladora.[Tesis Doctoral en Genética y Microbiología]. Barcelona:Universitat Autònoma de Barcelona. 2009

<sup>10</sup> Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJ, Chee KM. Efecto de *Lactobacillus acidophilus* KFR1342 en el desarrollo de tumores precancerosos inducidos químicamente en el colon de rata. J MedMicrobiol. 2012 Mar;61(Pt 3):361-8.

<sup>11</sup> Dock-Nascimento, Diana Borges .Restablecimiento rápido de las células caliciformes del colon inducida por la dieta hidrolizada que contiene probióticos en la malnutrición experimental. ActaBras Cir. 22 (Supl. 1): 72-76, 2007.

En el Perú, Lazo y colaboradores (2007) determinaron el efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en la prevención de gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones de la especie *Mus musculus*. En el grupo control todos los ratones presentaron gastritis moderada. Por lo que se concluyó que la administración de *Lactobacillus acidophilus* en dosis de 15 mg/kg de peso, ejerce efectos de protección sobre la mucosa gástrica, en la gastritis erosiva por administración de indometacina y en dosis de 30 mg/kg de peso, ejerce efectos tóxicos sobre la mucosa gástrica, promoviendo la presentación de una gastritis erosiva grave<sup>12</sup>

En Tacna, Viloche y colaboradores (2009), aislaron microorganismos del género *Lactobacillus sp.* a partir de productos fermentados como el yogurt, el queso y la leche. Los *Lactobacillus sp.* son muy exigentes respecto al medio nutritivo que se utilizó para aislarlos en laboratorio, crecieron en forma anaerobia hasta microaerófila, por lo que se incubó bajo condiciones anaerobias, en una atmósfera con dióxido de carbono, usando una cámara anaeróbica. El resultado del crecimiento de las colonias fue: colonias pequeñas, cremosas casi transparentes de aproximadamente de 1 mm de diámetro y en cuanto a la coloración de las células de *Lactobacillus* Gram positivas. Se destacó la ausencia de la actividad de la catalasa, llegándose a identificar las especies de *L.casei*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*.<sup>3</sup>

---

<sup>12</sup>Lazo N, Maco M, Matos Z, Maguiña Y. Efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones. CIMEL 2007 Vol. 12, N.º 2

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Microorganismo en el hombre

La microbiota se va adquiriendo de manera posterior al nacimiento. En una primera fase, las cepas aerobias y anaerobias facultativas, colonizan el tubo digestivo, entre ellas las de *Lactobacillus* y *Escherichia coli* y se va instaurando, en consecuencia, un microsistema. La proporción entre los géneros de microorganismos que integran la microbiota gastrointestinal, varía considerablemente a lo largo del tracto digestivo. En el intestino delgado, el rango es del orden que oscila entre  $10^4$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/mL a  $10^{6-7}$  UFC/mL.<sup>9</sup>

### 2.2.2. Bacterias Ácido Lácticas(BAL)

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; ellas son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados.<sup>13</sup>

El grupo de las BAL está formado por los siguiente géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

---

<sup>13</sup> Parra R. Bacterias Acido lácticas :Papel funcional en los alimentos. [tesis doctoral] Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de investigación en Química y Tecnología de los Alimentos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; 2010.



*Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Son Gram-positivas, no esporuladas, con forma cocoide o bacilar.

Las BAL mediante la fosforilación de los carbohidratos obtienen la energía metabólica formando como principal metabolito ácido láctico. Su actividad proteolítica le permite obtener aminoácidos a partir de proteínas.<sup>14</sup>

#### 4.4.3.2. **Género *Lactobacillus***

El género que nos interesa estudiar pertenece a la familia *Lactobacillaceae*. Existen actualmente 96 especies y 16 subespecies. Son bacilos largos y finos, algunos curvados o cortos y morfología cocobacilar corniforme, es habitual la formación de cadenas. No es común la movilidad, aunque algunos presentan flagelos peritricos.

Crece en la superficie de medios sólidos en condiciones de anaerobiosis o con tensiones de oxígeno bajas y un 5-10% de CO<sub>2</sub>, en rangos de temperatura comprendidos entre 2-53°C, pH óptimo entre 5.5-6.2, la velocidad de crecimiento a menudo se reduce en pH neutro y alcalino. Tienen metabolismo fermentativo, son sacarolíticos y su característica principal es fermentar azúcares con producción de ácido láctico. Son homofermentadores cuando originan ácido láctico y heterofermentadores al producir ácido láctico, ácido

---

<sup>14</sup> Rodríguez-Carvajal M.A, Sánchez J, Campelo A, Martínez B, Rodríguez A, Gil Serrano A. Estructura de un exopolisacárido de elevado peso molecular aislado de *Lactobacillus pentosus* LPS26. Carbohydrate Research, 2008; 343:3066–3070.

acético, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), etanol, ácido fórmico o succínico.<sup>15</sup>

Se encuentran en productos lácteos, cereales, carnes, pescados, agua de consumo, aguas residuales, cerveza, vino, frutas, zumos de frutas, encurtidos y chucrut. Forman parte de la flora de la boca, el tracto intestinal, el aparato reproductor femenino y de muchos animales.

En la Cuadro 02 del Anexo 1, se detallan las diferentes especies de *Lactobacillus* aisladas en casos atípicos, otras empleadas en alimentos, presentes en humanos y las que producen heteropolisacáridos. Las características propias de *Lactobacillus* se muestran en el Cuadro 01 del Anexo 01. Además se presenta un listado con las principales especies en el Cuadro 02 del mismo anexo.

### **2.2.3. Probióticos**

#### **2.2.4.1. Concepto**

Son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas. Los efectos beneficiosos deben demostrarse en animales y humanos.<sup>16</sup>

---

<sup>15</sup>Pot B, Tsakalidou E. Taxonomía y metabolism de *Lactobacillus*. *Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic*. 2ª ed. Norfolk: Caister Academic Press;2009

<sup>16</sup>Azañs-Braesco V, Bresson J, Guamer L, Corthier G. 2010.No todas las bacterias ácido lácticas son probióticas pero algunas lo son. *British Journal of Nutrition*; 2010: 103, p. 1079–1081

Predominan como probióticos las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las cepas probióticas pueden ser autóctonas o alóctonas,<sup>17</sup> cada una tiene características particulares y con diferente potencial beneficioso para la salud.<sup>18</sup>

#### 2.2.4.2. Propiedades de los Probióticos

a) *Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos:*<sup>19</sup>:

- Formar parte de la microbiota del intestino humano.
- No ser ni patógeno ni toxigénico.
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno.
- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota nativa ya existente.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas.

---

<sup>17</sup> Quigley, E, 2010. Prebióticos y probióticos; modificando y mimetizando la microbiota. *Pharmacol Res.* 2010 Mar;61(3):213-8

<sup>18</sup> Warren I, Lee E, Marin H, 2007. Probióticos para la prevención y tratamiento de infecciones nosocomiales. *CHEST.* 2007;132(1):286-294

<sup>19</sup> Amorochó C, Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra, [tesis doctoral] Valencia: Editorial Universitat Politècnica de València; 2011

### ***b) Seguridad de los probióticos***

Para garantizar la seguridad de las cepas se recomiendan las siguientes pruebas de caracterización.<sup>19</sup>

- Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles.
- Actividades metabólicas perjudiciales.
- Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.
- Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica.
- Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.
- Determinar la dosis y la duración de la terapia.<sup>18</sup>
- Realización de pruebas aleatorias, ensayos en diferentes centros, doble ciego, controlado con placebo y con un apropiado diseño estadístico.

### ***c) Estudios in vivo utilizando animales y humanos***

Con el propósito de demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos modelos animales donde entran en acción mayor número de variables como la matriz del alimento, el procesamiento de la cepa probiótica y la interacción con la microbiota intestinal del hospedador.<sup>17</sup> Se está trabajando en identificar los mecanismos de acción de los probióticos y como estos pueden llegar a afectar los diferentes alimentos en los que se introducen.<sup>20</sup>

---

<sup>20</sup>Allgeyer L, Miller M, Lee S. Vehículos de unión para las bebidas de yogur con prebióticos y probióticos. Journal of Food Science.2010; 75(4):212-S219

### 2.2.4.3. Efectos beneficiosos de los probióticos

Entre los beneficios estudiados se encuentran:

- Efectos nutricionales: Incrementa la biodisponibilidad de proteínas, aminoácidos y péptidos por su acción proteolítica. Atenuación de la intolerancia a la lactosa y mejora de la digestibilidad.
- Efectos sobre el sistema inmunológico: Actúan como adyuvantes de respuestas inmunes específicas por intervención de linfocitos T4, aumentan los mecanismos defensivos no específicos contra infecciones o tumores por fenómenos fagocitarios e incrementan los niveles de  $\gamma$ -interferón.<sup>19</sup>
- Mantenimiento de la microbiota intestinal normal: Interactúan con la microbiota intestinal y con los receptores de la pared intestinal produciendo variedad de efectos en el hospedador.<sup>21</sup> Sin embargo, se desconoce el papel metabólico e inmunológico de la microbiota del tracto gastrointestinal y si estos cambios son primarios o secundarios.
- Prevención del cáncer: La flora endógena y el sistema inmune cumplen una función

---

<sup>21</sup>Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado M, Vesterlund S. Interacción de los probióticos y los patógenos - Beneficios para la salud humana? Current Opinion in Biotechnology.2010;( 21):157-167.

importante en la modulación de la carcinogénesis.<sup>22</sup>

- Reducción de infecciones respiratorias: Existe una tendencia a disminuir las infecciones respiratorias.
- Reducción del colesterol: Se sugiere que ciertas cepas ácido lácticas pueden asimilar la molécula del colesterol impidiendo su reabsorción, produciendo metabolitos que afectan los niveles de grasa en la sangre.<sup>19</sup>
- Salud gástrica: Las bacterias probióticas especialmente cepas de *Lactobacillus* tienen habilidad para influir en la colonización y actividad de *Helicobacter pylori*.<sup>19</sup>
- Coadyuvante de antibióticos: El consumo indiscriminado de antibióticos en humanos y animales para tratar infecciones de origen microbiano afecta a patógenos y demás microorganismos naturales del huésped.

#### 2.2.4. *Rattus norvegicus*

##### 2.2.4.1. Información taxonómica

- ❖ Reino: ANIMALIA
  - Phylum: CHORDATA
    - Clase: MAMMALIA
      - Orden: RODENTIA
        - Familia: MURIDAE
- ❖ Nombre científico: *Rattus norvegicus*

---

<sup>22</sup>Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P, Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos fermentados con antiproliferación de las células de cáncer de colon *Biotechnol Lett* 2009;(31):571-576.

- Nombre común: Brown rat, Norweigan rat, Rata café, rata noruega.

#### **2.2.4.2. Descripción de la especie**

La rata noruega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. Las hembras tienen 12 mamas.<sup>23</sup>

##### **Medidas**

- ❖ **Longitud total:** 20 a 480 mm.
- ❖ **Peso:** 200 a 500 g.

#### **2.2.4.3. Distribución**

##### **A) Original**

Originalmente, probablemente se distribuía al Norte de China.

##### **B) Actual**

En zonas urbanas, donde haya disponibilidad de alimentos, con una adaptación buena.

#### **2.2.4.4. Hábitos alimenticios**

Omnívora, comiendo desde materia vegetal, hasta animal y en particular semillas, granos, nueces, vegetales y frutas, aunque también comen insectos y otros invertebrados.

---

<sup>23</sup>Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. *Rattus norvegicus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. 2008

Esta especie come todo lo que el ser humano y más, incluyendo papel, cera de abejas, jabón, etc. La principal limitante es la presencia de agua.

#### **2.2.4.5. Longevidad**

Hasta 3 años.

#### **2.2.4.6. Parámetros hematológicos**

Los valores normales hematológicos y bioquímicos de la especie *Rattus norvegicus* serán presentados más adelante en las Tablas 15 y 16 del Anexo 02.



### **3. CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES**

#### **3.1.HIPOTESIS**

Ha: Las cepas de *Lactobacillus sp* aisladas de productos lácteos de Tacna poseen capacidad probiótica.

Ho: Las cepas nativas de *Lactobacillus sp* aisladas de productos lácteos de Tacna no poseen capacidad probiótica.

### 3.2. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

Variables	Indicadores	Categorías/Índices	Escala de medición
1. Características biológicas de <i>Lactobacillus sp.</i>	1.1 Actividad hemolítica	α-hemólisis o hemólisis incompleta.  β-hemólisis o hemólisis verdadera  γ-hemólisis	Nominal
	1.2. Resistencia a pH ácido	Resistencia a pH entre 2 a 4  Resistencia a pH mayor a 4	Intervalares
	1.3. Resistencia a sales biliares	Crecimiento a 0.3 % de sales biliares  Crecimiento a 0.5 % de sales biliares  Crecimiento a 1 % de sales biliares  Ausencia de crecimiento	Nominal
	1.5 Actividad antibacteriana	Inhibición del crecimiento de cepa de <i>E.coli</i> .  No inhibición del crecimiento de cepa de <i>E.Coli</i> .	Nominal
Respuesta clínica de <i>Rattus norvegicus</i>	Peso	Incremento significativo del peso del grupo experimental  Disminución Incremento significativo del peso del grupo experimental  Cambios no significativos del peso del grupo experimental	Intervalar
	Comportamiento	Normal  Pelo dañado y/o secreción ocular  Postura anormal  Automutilación y/o expresión de dolorosa.	Nominal
	Respuesta al estímulo	Normal Agresivo Comatoso	Nominal

	Aspecto macroscópico de las heces	Normal Alterado	Nominal
	Hemograma completo	Alteración significativa del hemograma grupo experimental Cambios no significativos del hemograma grupo experimental	Nominal
	Dosaje de colesterol Total	Alteración significativa del colesterol total grupo experimental Cambios no significativos del colesterol total grupo experimental	Nominal

## 4. CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### 4.1.DISEÑO

Estudio experimental, prospectivo, longitudinal, analítico.<sup>24</sup>

Es **experimental** porque fue una intervención controlada por el investigador, con el interés de evaluar el efecto que produce una intervención (cepa de *Lactobacillus sp*) sobre un grupo de sujetos en el estudio (animales de experimentación *Rattus norvegicus*).

Es **prospectivo** porque los datos necesarios para el estudio fueron recogidos a propósito de la investigación. Por lo que posee control del sesgo de medición.

Es **longitudinal** ya que las variables de estudio fueron medidas en dos o más ocasiones.

Finalmente es **analítico** porque el análisis estadístico bivariado planteó y puso a prueba una hipótesis en su nivel más básico para establecer asociación entre dos o más variables.

### 4.2.AMBITO DE ESTUDIO

Los estudios de laboratorio y experimentales se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y el bioterio de la Universidad Privada de Tacna y la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

---

<sup>24</sup> Supo J. Seminarios de investigación científica. 2011

#### **4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

Se recolectaron un total 18 muestras de queso artesanal provenientes de las zonas ganaderas del distrito de Tacna (Tarata, Ticaco y Candarave). A partir de las mismas se realizó el aislamiento e identificación de cepas de *Lactobacillus sp.* que fueron empleadas para su evaluación in vitro y in vivo respecto a su potencial probiótico.

A su vez se utilizaron para los ensayos in vivo, 15 ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* de 9 semanas de vida.

##### **4.3.1. Criterios de Inclusión:**

Fueron incluidas en el estudio todas las cepas de *Lactobacillus sp.*, bacilos Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos, que provengan de muestras de productos lácteos artesanales elaborados en el distrito de Tacna y hayan sido las más representativas de su género. A su vez tiene que haber demostrado su inocuidad en el estudio de actividad hemolítica; sean resistentes a un pH entre 2 y 4; y resistentes a las sales biliares en una concentración de 0.3%

Por otro lado las ratas albinas de experimentación fueron de la especie *Rattus norvegicus*, de alrededor de 9 semanas de vida, pertenecientes a similares camadas, sin ninguna alteración morfológica, de conducta, y hábitos nutricionales normales.

#### **4.3.2. Criterios de Exclusión:**

Fueron excluidas del estudio todas las cepas que no reunieran los requisitos anteriormente señalados para las cepas de *Lactobacillus sp.* o que durante el transcurso de la investigación haya sufrido algún tipo de deterioro en su crecimiento o haya sido contaminados los cultivos puros.

Por otro lado las ratas albinas de experimentación que no sean de la especie *Rattus norvegicus*, ni tengan 9 semanas de vida, o presenten alteraciones morfológicas, de conducta, e inadecuados hábitos nutricionales fueron excluidas del estudio antes de iniciar la fase *in vivo*.

#### **4.4. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

##### **4.4.1. Muestreo de cepas.**

La fuente de obtención de bacterias de *Lactobacillus* fue a partir productos lácteos tradicionales elaborados en el distrito de Tacna: muestras de queso artesanal con un mínimo de dos semanas de elaboración de los distritos de Tarata, Candarave y Ticaco.

Una porción representativa de dos gramos de la muestra diluidos en Tween 80 se sembraron en placas Petri (por la técnica de agotamiento y estriado) con medios de cultivo de Agar MRS para *Lactobacillus*. Los cultivos se incubaron en estufa a una temperatura de 37°C durante 24 horas en anaerobiosis con un ambiente de CO<sub>2</sub>.(anexo 4)

#### **4.4.2. Aislamiento e identificación**

Se aislaron las colonias con características propias de las bacterias lácticas (*Lactobacillus*).

A estas colonias aisladas se les realizó una coloración diferencial de Gram y una identificación bioquímica con el reactivo de peróxido de hidrogeno para verificar la producción de la enzima catalasa u otra enzima capaz de degradar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Al mismo tiempo se sometieron a las pruebas de crecimiento y desarrollo de estos microorganismos a las temperaturas de 15 °C y 45 °C y a los medios de cultivo con concentraciones de NaCl de 4 %. Se sometieron a pruebas de fermentación de carbohidratos para completar su diferenciación bioquímica y se envió la cepa más característica para su tipificación molecular.

Las bacterias de *Lactobacillus* identificadas se almacenaron en un cepario (en tubos de ensayo conteniendo agar nutritivo) debidamente rotuladas, que luego de su crecimiento en los mencionados tubos de vidrio se llevaron a refrigerar a 4°C.(anexo 4)

#### **4.4.3. Evaluación de capacidad probiótica**

##### **4.4.3.1. Evaluación de propiedades biológicas**

###### **4.4.3.1.1. Actividad hemolítica**

Las cepas seleccionadas se sembraron en estría en una placa de Agar Sangre que contenía un 5% de sangre de cordero, junto a una cepas de *Escherichia coli* de un cultivo

axénico previamente crecido en un medio general a manera de control. La placa se mantuvo en estufa durante 24-48 horas a la temperatura y a las condiciones de incubación de la cepa en estudio. La lectura e interpretación de los mismos se detalla en el Anexo 03 y anexo 05

Se seleccionaron las colonias que son  $\gamma$ -hemolíticas ya que poseen menos posibilidades de presentar factores de virulencia que puedan representar problemas en el individuo al que se administre el posible probiótico.

#### **4.4.3.1.2. Resistencia a PH acido**

Se preparon alícuotas de caldo MRS que se ajustaron mediante pHmetro a diferentes valores de pH: 3, 4 y 6.

Se inocularon las cepas en estudio y se incubaron durante 24-48 horas a la temperatura y a las condiciones de incubación de la cepa en estudio. Anexo 5

#### **4.4.3.1.3. Resistencia a sales biliares**

Se evaluaron tres concentraciones de sales biliares (0,3% p/v; 0,5% p/v y 1% p/v) ajustadas a pH 3. Para esto se prepararon alícuotas de 100mL de caldo MRS a las que se añadieron 0,3 g; 0,5 g o 1 g de sales biliares de



origen bovino. El pH se determinó con el pHmetro y se ajustó añadiendo HCl 1M.

Se inocularon las cepas en estudio y se incubaron durante 24-48 horas a la temperatura y a las condiciones de incubación de la cepa en estudio. Anexo 5

#### **4.4.3.1.4. Actividad antibacteriana**

Se aplicó el protocolo de Campbell citado por Rodríguez <sup>9</sup> :

Las cepas a ensayar se sembraron por incorporación en las placas de medio de cultivo específico.

Tras la incubación durante 24 horas, se procedió a realizar el ensayo.(anexo 6)

Se realizaron cultivos de los *Lactobacillus* en placas de MRS y se incubaron en las condiciones adecuadas de respiración de la bacteria. Se realizaron cultivos de las cepa patógena de *Escherichia coli* frente a las que se ensayó la actividad inhibidora en placas de TSA por siembra por incorporación y se incubaron en las condiciones adecuadas de respiración de aerobiosis.

A partir del crecimiento de cada una de las cepas sobre las que se ensayaron la actividad inhibidora, se sembraron por diseminación

mediante asa de Drigaslky placas con una concentración de 0,5 McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Paralelamente, de cada cepa ácido láctica se obtuvieron discos de 8 mm de diámetro cortándolos directamente con un sacabocados estéril de un cultivo en masa de 24 horas en agar MRS. Se les depositaron equidistantemente sobre las placas de medio de cultivo sembradas con *Escherichia coli*. frente a las que se realizará el ensayo.

Preparadas las placas, se incubaron durante 24 horas en las condiciones adecuadas de crecimiento para *E.coli*.

Se observaron los halos de inhibición alrededor de los discos, ya que se produjeron compuestos que inhiben el crecimiento de las cepas a ensayar. Las zonas de inhibición se midieron en milímetros (mm). La actividad inhibitoria se calculó por la medida del valor de inhibición (VI), calculado como:

$$VI = (I-DC) / 2$$

Para una correcta interpretación de la fórmula, se tuvo en cuenta que:

DC = Diámetro del disco de cultivo (mm).

I = Diámetro de inhibición (mm).

Controles positivo se considero un disco de antibiótico conteniendo ciprofloxacino (5 microgramos).

#### 4.4.3.2. Evaluación de la respuesta de *Rattus norvegicus*

Se acondicionó el ambiente para la crianza de las ratas en el Bioterio de la Universidad Privada de Tacna según las especificaciones mínimas de temperatura, y humedad y aireación y adaptando las recomendaciones de la Guía para el cuidado uso de animales de laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos y el Instituto Nacional de Salud del Perú.<sup>25, 26</sup>

Las ratas fueron ambientadas dos semanas antes del inicio de la fase experimental en jaulas individuales. Siendo alimentadas con agua *Ad libitum* (expresión del latín que significa literalmente «a placer, a voluntad» y quiere decir «como guste» o beber a libre voluntad por parte del animal de experimentación) y alimentación hiperlipídica de conejos. La dieta hiperlipídica estuvo compuesta por una mezcla desecada de cerebro vacuno cocido y alimentación balanceada de conejos en la proporción 9:1. (anexo 7 )

##### 4.4.3.2.1. Inoculación fase experimental:

Esta fase duró 14 días con controles diarios según se especifica más abajo.

Las cepas en estudio se administraron a la concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml en yogurt preparado que corresponde al tubo de 0.5 de la Escala de Mac Farland.

---

<sup>25</sup> Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos. Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación. 8ª ed. Prensa de la Academia Nacional. Washington. 2010.

<sup>26</sup> Instituto Nacional de Salud. Guía de manejo y cuidado de manejo y cuidado de animales de laboratorio. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Lima. 2008

Las ratas se distribuyeron en tres grupos:

**Grupo control positivo**, al que se administró una cepa reconocida de *Lactobacillus casei* . Estuvo constituido por 5 animales y la proporción macho: hembra será 3:2. La administración de la cepa se realizó un preparado tipo yogurt elaborado por el investigador por los 15 días que duró el estudio, estando a disposición de las ratas en botellas bebedero *Ad libitum*.

**Lote problema**, lote al que se administró la cepa de la especie de *Lactobacillus sp* seleccionada en las fases previas. Estuvo constituido por 5 animales y la proporción macho: hembra será 2:3. La administración de la cepa se realizó un preparado tipo yogurt elaborado por el investigador durante 15 días que duró el estudio, estando a disposición de las ratas en botellas bebedero *Ad libitum*.

**Lote control negativo**, lote al que se administró solamente agua potable. Estuvo constituido por 5 animales y la proporción macho: hembra será 3:2. La administración de las cepas se realizó por los 15 días que duró el estudio estando a disposición de las ratas en botellas bebedero *Ad libitum*.

Todos los animales continuaron con su alimentación hiperlipídica *ad libitum*.

#### **4.4.3.2.2. Peso**

Cada 24 horas, se pesó cada una de las ratas antes de su alimentación. Dichos mediciones fueron consignados en una ficha de evaluación. (Anexo 08)

#### **4.4.3.2.3. Comportamiento**

Cada 24 horas, se evaluó la conducta de las ratas, media hora antes de su alimentación, cuidando no someterlas a estrés durante el proceso. Los resultados fueron consignando los datos en una ficha de evaluación. (Anexo 08)

#### **4.4.3.2.4. Respuesta al estímulo**

Cada 24 horas, posterior a la evaluación del comportamiento se dio tres toques con una vara metálica sobre uno de los lados de la jaula del animal y se apreció su reacción. A su vez se evaluó la respuesta que tenga frente a las maniobras de pesado. Se consignó los resultados de esta apreciación en una ficha de evaluación. (Anexo 08)

#### **4.4.3.2.5. Hemograma completo**

Se extrajo sangre mediante capilares heparinizados con técnica aséptica de la vena lateral de la cola según la técnica de Kolmer.<sup>26</sup> Además se procedió a realizar extendidos en láminas cubreobjetos de la sangre periférica para realizar hemogramas completos. Y se comparará con los valores normales del protocolo. (Anexo 02).

#### **4.4.3.2.6. Dosaje de colesterol Total.**

Se midió en 2 momentos la concentración en sangre del colesterol mediante métodos enzimáticos y colorimétricos de sangre periférica extraída de la vena lateral de la cola como se detalla a continuación: Una medida basal un día antes de iniciar experimentación y finalmente a los 15 días de la misma fase para evaluar el efecto en el control del colesterol total ejercido por la cepa de *Lactobacillus* empleada.

## **5. PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS.**

. Se realizó el estudio estadístico de los resultados con el software SPSS v 22 (USA). La diferencia de medias entre los grupos de estudio fue evaluado por el Análisis de Variancia con comparación de promedios y post Hoc con el Test de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

## 5. CAPÍTULO 5: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

**Tabla 01 : Preliminar de características microbiológicas de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013**

Cepa	Origen	Condiciones de Respiración	Tiempo de crecimiento	Morfología en Agar MRS	Morfología Tinción Gram	Catalasa	Agar TSI(*)
3a	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/a + -
12a	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -
12b	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -
15a	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -
15b	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -

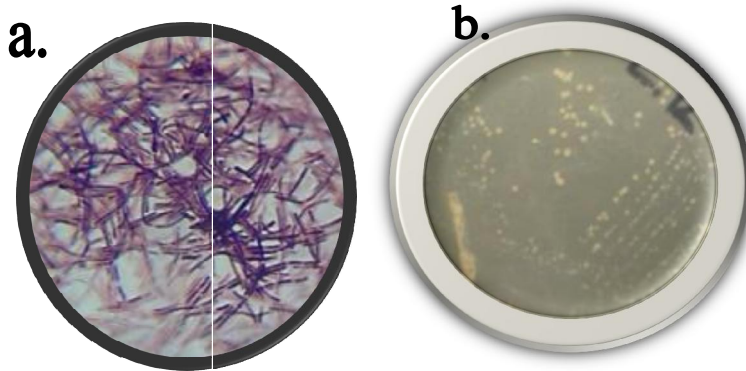
(\*) Agar TSI: Agar Triple Azucar+ Fierro.  
a/a + - : Reacción ácida en pico de cultivo/ Reacción ácida en fondo de cultivo. Producción de gas. No produce sulfuro de hidrogeno.  
a/k - - : Reacción ácida en pico de cultivo/ Reacción alcalina en fondo de cultivo.No produce de gas. No produce sulfuro de hidrogeno.

Fuente:Ficha de Recolección de datos.

La tabla 01 presenta 5 cepas que reunieron las características microbiológicas básicas para ser consideradas como pertenecientes al Genero *Lactobacillus*: Crecimiento en medio selectivo MRS, en condiciones de anaerobiosis, Bacilos Gram negativos, catalasa negativa y fermentación de carbohidratos con producción de acidez. Estas colonias fueron seleccionadas de entre un grupo de 36 cepas aisladas de 18 muestras de quesos artesanales de los distritos tacneños de Tarata, Candarave y Ticaco, entre los meses de agosto a setiembre del 2013. El procedimiento empleado se grafica en el anexo 5. Las características microbiológicas del total de las cepas empleadas se describe en el Anexo 09.



**Foto 01: Características microbiológicas de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013**



- a. Coloración Gram: bacilos Gram positivos alargados en empalizada proveniente de colonia aislada de muestras de productos lácteos de Tacna. (100 x10 aumentos, objetivo de inmersión)
- b. Agar MRS: Crecimiento de Colonia de borde entero liso crema de 1 a 2 mm de diámetro

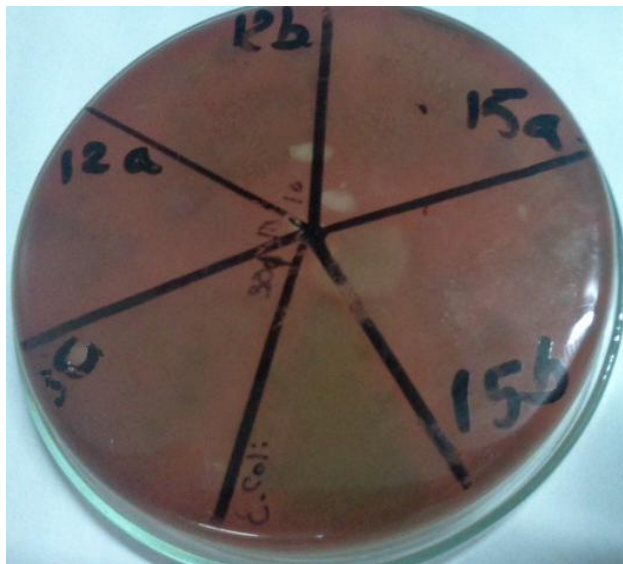
La foto 01 muestra dos tomas. La primera se observa el aspecto típico de los *Lactobacillus* al ser observadas al microscopio óptico con coloración. La segunda muestra el aspecto de presenta al ser cultivado en el medio diferencial MRS.

**Tabla 02 : Tipo de hemólisis de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013**

Cepa	Tipo de hemólisis
3a	Alfa
12a	Gamma
12b	Gamma
15a	Gamma
15b	alfa
Control <i>E. coli</i>	Beta

Fuente: Ficha de recolección de datos.

**Foto 02: Tipo de Hemólisis de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013.**



La tabla 02 y la foto 02 nos muestra el tipo de hemólisis que producen las distintas cepas de lactobacilos y una cepa control de *E. coli* al ser sembradas en Agar Sangre de cordero. Es evidente que las cepas 12 a , 12 b y 15 a presenta una hemólisis tipo gama y las cepas 3ª y 15b hemólisis tipo alfa. El control de *E. coli* presató un evidente halo de hemólisis beta.

**Tabla 03 : Crecimiento a diferentes concentraciones de acidez de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013**

Cepa	pH		
	3	4	6
3a	No	++	++
12a	No	+	++
12b	No	++	++
15a	No	++	++
15b	No	++	++
Cepa Lactobacilos control	No	++	+++

Fuente: Ficha de recolección de datos.

La Tabla 03 nos permite mostrar el crecimiento de las distintas cepas de lactobacilos probadas en caldos de cultivo MRS cuyos pH fueron ajustados a tres niveles. Se aprecia un crecimiento moderado de todas las cepas a pH 4 y 6, lo cual no ocurre a pH 3. Siendo notorio cualitativamente el mayor crecimiento de la cepa de lactobacilo control a pH 6.

**Tabla 04 : Crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013**

Cepa	Sales biliares		
	0.3%	0.5%	1%
3a	No	No	No
12a	No	No	No
12b	+	No	No
15a	+	No	No
15b	NO	No	No
Cepa Lactobacilos control	+	No	No

Fuente: Ficha de recolección de datos

La Tabla 03 nos permite mostrar el crecimiento de las distintas cepas de lactobacilos probadas en caldos de cultivo MRS cuyos pH fueron ajustados a tres niveles. Se aprecia un crecimiento moderado de todas las cepas a pH 4 y 6, lo cual no ocurre a pH 3. Siendo notorio cualitativamente el mayor crecimiento de la cepa de lactobacilo control a pH 6.

**Tabla 05 : Inhibición del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013.**

CEPA DE LACTOBACILLUS	DIÁMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)	VALOR DE INHIBICIÓN (mm) $V I = (I-DC) / 2$	ESTADÍSTICA
3a	6	0	Medía = 1.35 Desv. Típ = 0.82 Varianza = 0.67
12a	<b>10</b>	<b>2</b>	
12b	9	1.5	
15a	<b>10</b>	<b>2</b>	
15b	8.5	1.25	
Lactobacilos control	8	1	
Ciprofloxacino 5mg	30	12	

Fuente: Ficha de recolección de datos

**Foto 03: Halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 27922 utilizando cepas de *Lactobacillus spp* 12a y 15a y el control**



La tabla 05 y la foto 03 nos permite mostrar la capacidad de inhibición que presentaron sobre el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* ATCC 27922 utilizando cepas de lactobacilos junto un control comparativo con un disco antibiótico de Ciprofloxacino. Es evidente que las dos cepas que mostraron mayor valor de inhibición fueron 12 a y la cepa 15 a , con el valor de inhibición de 2, incluso mayor que el obtenido con la cepa de lactobacilos control que obtuvo un valor de inhibición de 1. Pero no pueden superar al valor de inhibición de 12 que se obtuvo con el disco de Ciprofloxacino.

**Tabla 06: Resumen de características microbiológicas de cepa de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna. 2013.**

Cepa	Origen	Condiciones de Respiración	Tiempo de crecimiento	Morfología en Agar MRS	Morfología Tinción Gram	Catalasa	TSI (**)	Hemolisis en Agar Sangre de Oveja	Crecimiento a pH de:			Crecimiento sales biliares de:			Valor de inhibición de Crecimiento de E. coli ATCC 27922
									3	4	6	0.3%	0.5%	1%	
3a	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/a + -	Gamma	No	++	++	No	No	No	0
12a	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -	Gamma	No	+	++	No	No	No	2
12b	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -	Gamma	No	++	++	+	No	No	1.5
15a (*)	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -	Gamma	No	++	++	+	No	No	2
15b	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -	alfa	NO	++	++	NO	No	No	1.25

(\*) Cepa que mejor reúne las características del género *Lactobacillus* seleccionada para su uso en las posteriores fases del estudio

(\*\*) Agar TSI: Agar Triple Azucar+ Fierro.: a/a + - : Reacción ácida en pico de cultivo/ Reacción ácida en fondo de cultivo. Producción de gas. No produce sulfuro de hidrogeno. a/k - -: Reacción ácida en pico de cultivo/ Reacción alcalina en fondo de cultivo.No produce de gas. No produce sulfuro de hidrogeno..

Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 06 nos permite mostrar en una tabla resumen todas las características microbiológicas estudiadas en cada una de las 5 cepas seleccionadas preliminarmente. Se puede observar que la cepa 15 a es la que más se acerca a las características óptimas de necesarias para ser considerada en la siguiente fase del estudio. La cepa 3a durante el proceso de demostración de si capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano sufre contaminación por lo cual es descartada.



**Tabla 07 : Peso, sexo, comportamiento, respuesta al estímulo y características de las heces según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

Grupo	Peso promedio Durante 15 días	Sexo	Comportamiento (Durante 15 días)	Respuesta a estímulo ( 15 días)	Características de las Heces(Durante 15 días)			
					Forma	Color	Consistencia	Olor
Control experimental 1	225.99	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control experimental 2	192.00	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control experimental 3	195.35	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control experimental 4	215.80	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control experimental 5	225.83	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
control positivo 1	263.00	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
control positivo 2	216.56	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
control positivo 3	197.31	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
control positivo 4	212.23	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
control positivo 5	3006.47	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control negativo 1	251.90	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control negativo 2	226.10	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control negativo 3	263.29	Hembra	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control negativo 4	351.81	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris
Control negativo 5	250.26	Macho	Normal	Normal	Normal	Cafe oscura	Consistente	Suigeneris

Fuente: Ficha de recolección de datos.

La tabla 07 muestra el registro de pesos , sexo, comportamiento, respuesta al estímulo y características de las heces de los 15 especímenes de *Rattus norvegicus* distribuidos en tres grupos y alimentados *Ad libitum* en el caso del grupo experimental con una preparación tipo yogurt conteniendo un inóculo de la cepa 15 a; en el caso del grupo control positivo de manera homóloga se administró otra preparación tipo yogurt con la cepa de lactobacilo control y finalmente el grupo control negativo solo recibió agua . Todos los grupos mantuvieron su alimentación hiperlipemica durante toda la fase experimental.

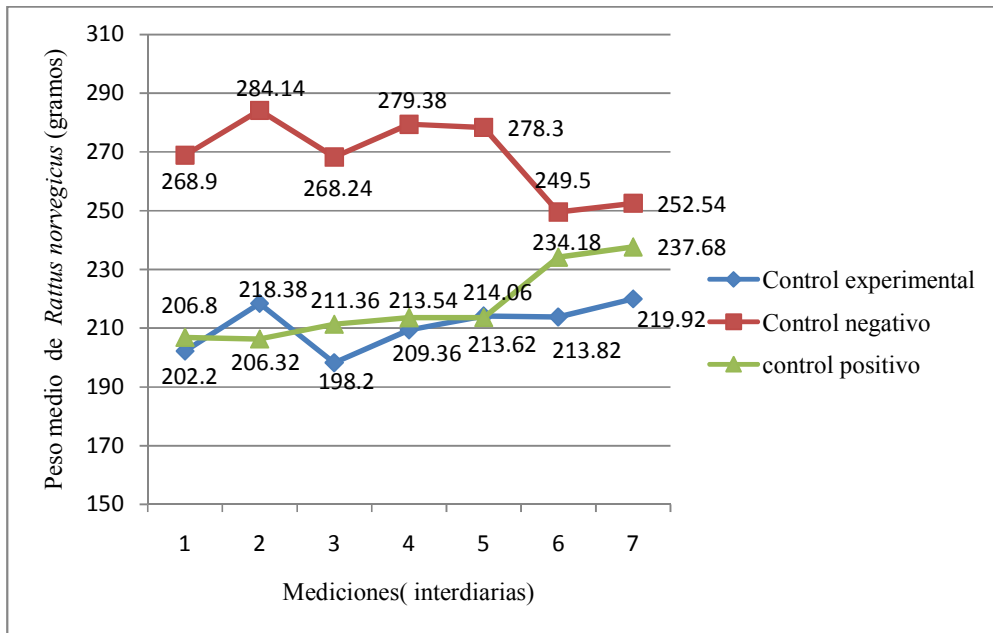
Se puede observar a su vez que la tanto el comportamiento, como la respuesta a los estímulos durante toda la fase experimental se mantuvo normal en todos los individuos De la misma manera las características macroscópicas de las heces de todos los individuos no mostraron cambios anormales.

**Tabla 08 : Media, desviación estándar, e intervalo de confianza de los según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Peso1	Control experimental	202,20 <sup>a</sup>	20,07673	177,2714	227,1286	0,591	<b>0,022 (*)</b>
	control positivo	206,80 <sup>a</sup>	38,97692	158,4038	255,1962		
	C. negativo	268,60	44,19050	213,7303	323,4697		
Peso2	Control experimental	218,38 <sup>a</sup>	32,85212	177,5887	259,1713	0,839	<b>0,005 (*)</b>
	control positivo	206,32 <sup>a</sup>	29,06711	170,2284	242,4116		
	C. negativo	284,14	34,19924	241,6760	326,6040		
Peso3	Control experimental	198,02 <sup>a</sup>	20,91248	172,0537	223,9863	0,546	<b>0,010(*)</b>
	control positivo	211,36 <sup>a</sup>	25,56253	179,6199	243,1001		
	C. negativo	268,24	44,18765	213,3738	323,1062		
Peso4	Control experimental	209,36 <sup>a</sup>	13,26831	192,8852	225,8348	0,230	<b>0,007(*)</b>
	control positivo	213,54 <sup>a</sup>	27,33090	179,6042	247,4758		
	C. negativo	279,38	44,91116	223,6154	335,1446		
Peso5	Control experimental	214,06 <sup>a</sup>	12,92122	198,0162	230,1038	0,129	<b>0,008(*)</b>
	control positivo	213,62 <sup>a</sup>	24,76251	182,8733	244,3667		
	C. negativo	278,30	45,43347	221,8869	334,7131		
Peso6	Control experimental	213,82	16,49354	193,3406	234,2994	0,054	0,602
	control positivo	234,18	28,25052	199,1023	269,2577		
	C. negativo	249,50	89,39863	138,4969	360,5031		
Peso7	Control experimental	219,92	16,86822	198,9753	240,8647	0,115	0,686
	control positivo	237,68	32,74534	197,0213	278,3387		
	C.l negativo	252,54	94,50234	135,1998	369,8802		
<p>a Existe homogeneidad estadísticamente, según Tukey</p> <p>(*) Diferencia significativa entre grupos.</p>							

Fuente: Ficha de recolección de datos.

**Grafico 01 : Evolución de la Medía de los pesos según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**



Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 08 y el gráfico 01 evidencian el comportamiento de la variable peso a lo largo de las 7 mediciones que se realizó. La Tabla 08 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los distintos momentos de medición de los pesos de cada grupo de medición. Con un error estimado de 5 % no se halla diferencias significativas en las varianzas según Levine. Pero el Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo indica que durante las primeras 5 observaciones existió diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control negativo y los otros grupos (control experimental y control negativo) por la prueba de Tukey. En la sexta y séptima observación ya no existen diferencias entre los tres grupos como lo evidencia también la grafica 01.

**Tabla 09 : Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza de las hemoglobinas según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Medía	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOV A
				Límite inferior	Límite superior		
Hemoglobina 1	Control experimental	12,00	1,5811	10,037	13,963	0,604	0,051
	control positivo	10,26	1,6846	8,168	12,352		
	Control negativo	12,92	1,2617	11,353	14,487		
Hemoglobina 2	Control experimental	15,40	1,67332	13,3223	17,4777	0,195	0,266
	control positivo	13,00	2,91548	9,3800	16,6200		
	Control negativo	14,36	1,82975	12,0881	16,6319		
(*) No existe diferencia estadísticamente significativa							

Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 09 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición de la hemoglobina en los grupos de investigación. Con un error estimado de 5 % no se halla diferencias significativas en las varianzas según Levine. De la misma manera el Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo indica no existe diferencias estadísticamente significativa entre los tres grupos a pesar del aparente incremento de la hemoglobina de la primera a la segunda medición.

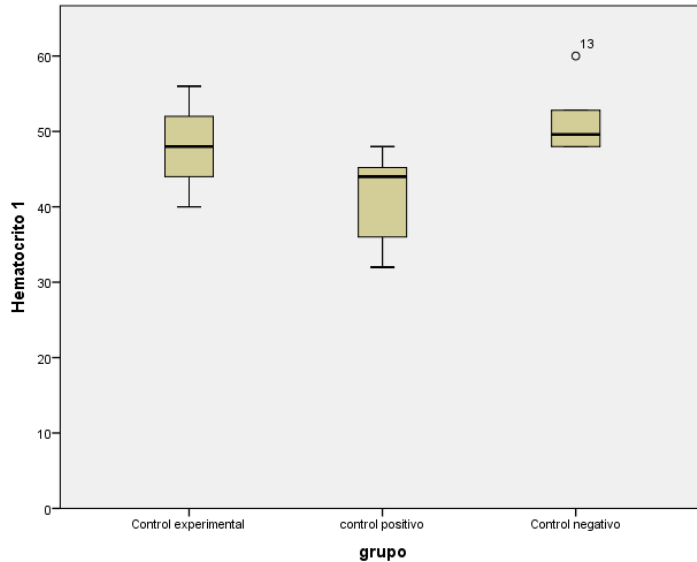
**Tabla 10 : Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza de los hematocritos según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Medía	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Hematocrito 1	Control experimental	48,00 <sub>a,b</sub>	6,325	40,15	55,85	0,604	<b>0,048 (*)</b>
	control positivo	41,04 <sup>a</sup>	6,739	32,67	49,41		
	Control negativo	51,68 <sup>b</sup>	5,047	45,41	57,95		
Hematocrito 2	Control experimental	46,40	4,72229	40,5365	52,2635	0,635	0,072
	control positivo	37,44	6,35358	29,5510	45,3290		
	Control negativo	43,00	5,52268	36,1427	49,8573		
a Existe homogenicidad estadísticamente, según Tukey a , b Existe heterogenicidad estadísticamente, según Tukey (*) Diferencia significativa entre grupos.							

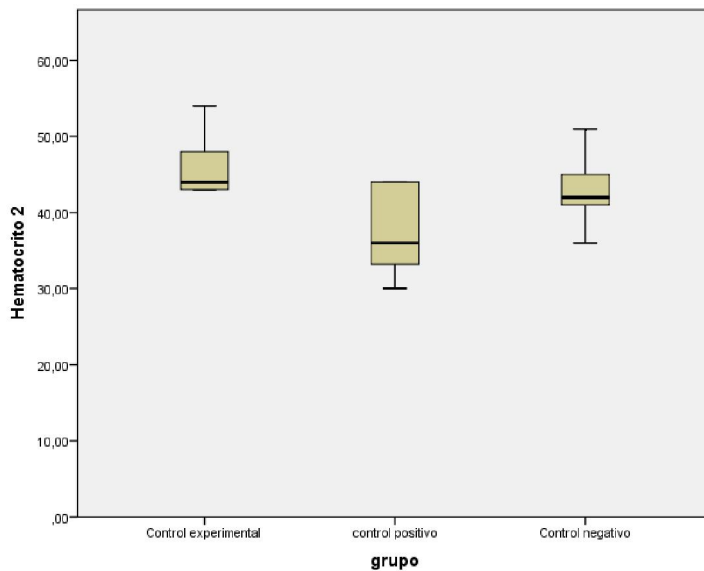
Fuente: Ficha de recolección de datos.

La tabla 10 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición del hematocrito en los grupos de investigación. Con un error estimado de 5 % no existen diferencias significativas en las varianzas según Levine. El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, no obstante, indican una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos durante el primer día de observación, corroborado por el post Hoc Tukey que evidencia diferencias significativas entre el grupo control positivo y el negativo. Dichas diferencias no se hallan en la segunda medición del hematocrito.

**Grafico 02 : Grafica de Cajas según la distribución de valores de hematocrito en el primer día de observación según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**



**Grafico 03 : Grafica de Cajas según la distribución de valores de hematocrito en el último día de observación según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**



Los Gráficos 02 y 03 nos presentan la distribución de valores de los hematocritos en los grupos de estudio tanto en el primer día de medición como en el último día.

El Gráfico 02 muestra durante el primer día de observación que la amplitud de datos de los grupos de control experimental y de control positivo son similares, en cambio el grupo negativo presenta valores de hematocrito distribuidos en una amplitud más pequeña, conglomerados en torno a su mediana de 51, además en ese mismo grupo se observa un dato extremo en el espécimen número 13 de nuestra distribución con un dato de hematocrito de 60 %.

El Gráfico 03 muestra durante el último día de observación que la amplitud de datos de los grupos de control experimental, control positivo y control negativo son similares, no obstante aún se mantiene el conglomerado de datos en torno a la mediana de 43 del grupo control negativo



**Tabla 11: Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza del recuento de leucocitos según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

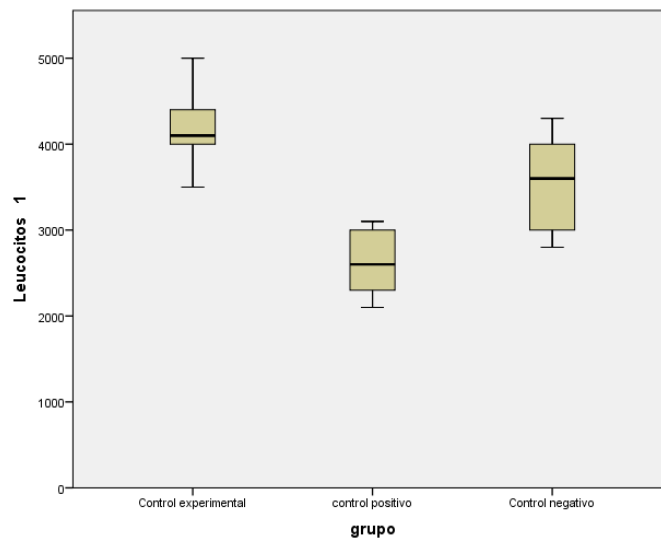
		Medía	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Leucocitos 1	Control experimental	4200,00 <sup>b</sup>	552,268	3514,27	4885,73	0,625	<b>0,002</b> (* )
	control positivo	2620,00 <sup>a</sup>	432,435	2083,06	3156,94		
	Control negativo	3540,00 <sup>a,b</sup>	638,749	2746,89	4333,11		
Leucocitos 2	Control experimental	4060,00	1225,96900	2537,7584	5582,2416	0,107	0,080
	control positivo	2680,00	356,37059	2237,5075	3122,4925		
	Control negativo	3180,00	834,86526	2143,3779	4216,6221		

a Existe homogenicidad estadísticamente, según Tukey  
a , b Existe heterogenicidad estadísticamente, según Tukey  
(\*) Diferencia significativa entre grupos.

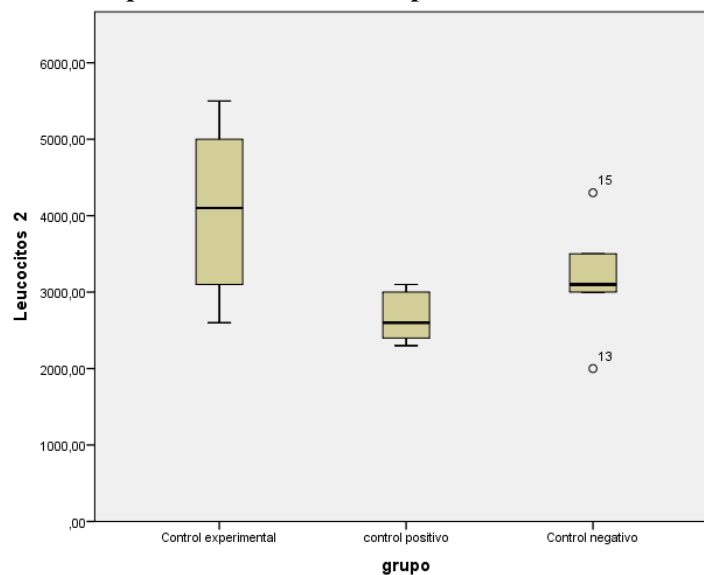
Fuente: Ficha de recolección

La tabla 11 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición del Recuento de leucocitos en los grupos de investigación. Con un error estimado de 5 % no existe diferencias significativas en las varianzas según Levine. El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, no obstante, indican una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos durante el primer día de observación, corroborado por el post Hoc Tukey que evidencia diferencias significativas entre el grupo control positivo y el experimental. Dichas diferencias no se hallan en la segunda medición del recuento de leucocitos.

**Grafico 04 : Grafica de Cajas según la distribución de la Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza del recuentos de leucocitos en el primer día de observación según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvergicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**



**Grafico 05 : Grafica de Cajas según la distribución de la Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza del recuento de leucocitos en el último día de observación según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvergicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**



Los Gráficos 04 y 05 nos presentan la distribución de valores de los recuentos de leucocitos en los grupos de estudio tanto en el primer día de medición como en el último día.

El Gráfico 04 muestra durante el primer día que la amplitud de datos de los recuentos de leucocitos grupos de control experimental y de control positivo son similares, en cambio el grupo negativo presenta valores de distribuidos en una amplitud más pequeña, conglomerados en torno a su mediana de 3540.

El Gráfico 05 muestra que la amplitud de datos de los grupos de control experimental, control positivo y control negativo son diferentes visualmente en la distribución de sus datos, pero estadísticamente como lo muestra el ANOVA la prueba de Tukey de la tabla 11, dichas diferencias no son significativas.

**Tabla 12: Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza de los formulas leucocitarias en según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvergicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Medía de porcentajes	Desv. estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Neutrofilos1	C. experimental	27,20	6,380	19,28	35,12	0,024	0,545
	control positivo	23,80	2,950	20,14	27,46		
	Control negativo	24,60	4,980	18,42	30,78		
Neutrofilos2	C. experimental	27,20	6,37966	19,27	35,1214	0,128	0,595
	control positivo	24,40	3,04959	20,61	28,1866		
	Control negativo	27,40	5,27257	20,85	33,9468		
Eosinofilos1	C. experimental	,00	,000	,00	,00	0,052	0,597
	control positivo	0,60	1,342	,07	2,27		
	Control negativo	0,40	,894	0,71	1,51		
Eosinofilos 2	C. experimental	0	0	0	0	NA	NA
	control positivo	0	0	0	0		
	Control negativo	0	0	0	0		
Linfocitos1	C. experimental	48,80	3,899	43,96	53,64	0,631	0,100
	control positivo	51,60	5,128	45,23	57,97		
	Control negativo	55,60	4,561	49,94	61,26		
Linfocitos2	C. experimental	54,80	5,71839	47,6997	61,9003	0,940	0,420
	control positivo	51,00	4,89898	44,9171	57,0829		
	Control negativo	54,60	4,09878	49,5107	59,6893		
Monocitos1	C. experimental	24,00	4,743	18,11	29,89	0,089	0,439
	control positivo	24,00	3,937	19,11	28,89		
	Control negativo	19,40	9,044	8,17	30,63		
Monocitos2	C. experimental	19,80	10,44988	6,8248	32,7752	0,186	0,442
	control positivo	24,40	4,61519	18,6695	30,1305		
	Control negativo	18,00	7,51665	8,6668	27,3332		
NA : No aplicable No se registraron Abastoados ni basófilos en ninguno de los muestreos . No se registraron Eosinófilos en la segunda muestra..							

Fuente; Ficha de recolección de datos.

La tabla 12 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición de la fórmula leucocitaria en sus distintos componentes (neutrófilos, basófilos, linfocitos, monocitos, bastonados). Con un error estimado de 5 % no existe diferencias significativas en las varianzas según Levine. El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, tampoco encontró diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas. No se registraron bastonados ni basófilos en ninguno de los dos momentos de evaluación, tampoco se pudo evidenciar la presencia de Eosinófilos en el último día de evaluación

**Tabla 13: Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza del recuento de plaquetas según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Medía	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levin e (alfa = 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Plaquetas 1	Control experimental	623600,00	104665,180	493641,01	753558,99	0,791	0,934
	control positivo	602000,00	121326,007	451353,86	752646,14		
	Control negativo	624000,00	93968,080	507323,22	740676,78		
Plaquetas 2	Control experimental	522000,00	102567,05124	394646,1851	649353,8149	0,584	0,5
	control positivo	602000,00	121326,00710	451353,8649	752646,1351		
	Control negativo	530000,00	150665,19173	342924,4556	717075,5444		

Fuente: Ficha de recolección de datos.

La tabla 13 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición del recuento de plaquetas. Con un error estimado de 5 % no existen diferencias significativas en las varianzas según Levine. El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, tampoco encontró diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas.

**Tabla 14: Medía, desviación estándar, e intervalo de confianza del colesterol total según grupos de estudio de especímenes de *Rattus norvegicus* alimentados con cepas de lactobacilos de productos lácteos de Tacna. 2013**

		Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Levine (alfa= 0.05)	ANOVA
				Límite inferior	Límite superior		
Colesterol 1	Control experimental	78,580	17,7724	56,513	100,647	0,447	0,308
	control positivo	68,240	9,7428	56,143	80,337		
	Control negativo	84,820	19,9405	60,061	109,579		
Colesterol 2	Control experimental	67,0200	2,24365	51,8175	82,2225	0,697	0,359
	control positivo	65,7200	9,70397	53,6709	77,7691		
	Control negativo	76,6000	15,14860	57,7905	95,4095		

Fuente: Ficha de recolección de datos

La tabla 14 nos presenta a la izquierda, distribuido en las filas los dos momentos de medición del colesterol total. Con un error estimado de 5 % no existen diferencias significativas en las varianzas según Levine. El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, tampoco encontró diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas.

## DISCUSION

Se recolectaron un total 18 muestras de queso artesanal provenientes de los distritos de Tarata, Candarave y Ticaco entre los meses de agosto a setiembre del 2013. A partir de las mismas se realizó el aislamiento de 36 colonias con las características microbiológicas típicas de *Lactobacillus sp* en los laboratorios de Biología de la Universidad Privada de Tacna y Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

A las colonias presuntivas se les realizó una coloración diferencial de Gram y una identificación bioquímica con el reactivo de peróxido de hidrogeno para verificar la producción de la enzima catalasa u otra enzima capaz de degradar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se sometieron a pruebas de fermentación de carbohidratos para completar su diferenciación bioquímica con agar TSI. Fueron incluidas en el estudio todas las cepas de *Lactobacillus sp*, que presentaron la forma de bacilos Gram positivos, no formadores de esporas y, catalasa negativos. A su vez tiene que haber demostrado su inocuidad en el estudio de actividad hemolítica; sean resistentes a un pH entre 2 y 4; y resistentes a las sales biliares en una concentración de 0.3%

Como lo menciona Pot y Col. dentro la familia *Lactobacillaceae* se caracteriza por ser bacilos largos y finos, algunos curvados o cortos y morfología cocobacilar. No es común la movilidad. Crecen en la superficie de medios sólidos en condiciones de anaerobiosis o con tensiones de oxígeno bajas y un 5-10% de CO<sub>2</sub>, en rangos de temperatura comprendidos entre 2-53°C, pH óptimo entre 5.5-6.2. Las condiciones de incubación empleadas en el presente estudio dentro del laboratorio fueron de 37 grados Celsius y CO<sub>2</sub> de +/- 5 % compatibles como vemos con su escala de crecimiento. Tienen además metabolismo fermentativo, su característica principal es fermentar azúcares con producción de ácido láctico. Son homofermentadores cuando originan ácido láctico y heterofermentadores al producir ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), etanol, ácido



fórmico o succínico.<sup>15,6</sup> De esta manera como se mostró en la tabla 06, 5 cepas reunieron las características en mayor o menor grado que la literatura menciona son características del género *Lactobacillus sp.* De este grupo la cepa 15 a proveniente del Distrito de Ticaco fue la que mejores características presentó y fue elegida para pasar a la siguiente fase del estudio, confrontando su efecto sobre seres vivos a nivel de laboratorio. Se debe resaltar que no es la primera vez que se aísla cepas de Lactobacilos en Tacna, al igual que nuestro estudio, Viloche y Col. aislaron microorganismos del género *Lactobacillus sp.* a partir de productos fermentados como el yogurt, el queso y la leche. Encontraron colonias, pequeñas, cremosas casi transparentes de aproximadamente de 1 mm de diámetro, de coloración Gram positivas y desatancándose la no presencia de la enzima catalasa, llegándose a identificar las especies *L.casei*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*.<sup>3</sup>

No se dispuso de toda la batería bioquímica especializada para la identificación de especie no obstante la cepa seleccionada fue enviada para su identificación molecular posterior en un laboratorio especializado. Como lo muestra el anexo 9 se tipifica molecularmente la cepa como de la especie *Lactobacillus reuterii* con una confianza mayor del 99%, mediante la técnica de secuenciación del ADN ribosomal 16 S. Esta molécula tiene excelentes propiedades por su presencia universal. Como lo indica Amoroch y Col. El ADN y el ARN son elementos químicos que no varían por las condiciones de crecimiento de la bacteria por lo tanto son herramientas exitosas para la identificación bacteriana.<sup>6</sup>

Como lo define Azais y Col. los probióticos son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas. Los efectos beneficiosos deben ser demostrados en animales y humanos, lo cual busco preliminarmente el presente estudio.<sup>16</sup>

La cepa de *Lactobacillus reuteri* aislada para ser considerada probiótica debió cumplir una serie de requisitos de seguridad. Amorocho menciona que deben no ser ni patógeno ni toxigénico, mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno, poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas. El presente estudio demostró que la cepa aislada no es una patógena debido a que no presentó hemólisis mal llamada “gamma hemólisis”, descartando la presencia exotoxinas hemolíticas que indicarían una probable patogenicidad.<sup>6</sup>

Por otro lado resistió el crecimiento a pH 4 y a una concentración de sales biliares de 0.3% conforme se estipuló en los criterios de inclusión. Estas condiciones simulan las condiciones gástricas que toda cepa de probiótico tiene que superar para guardar sus propiedades y llegar a colonizar el tubo digestivo, como lo menciona Marquez.<sup>27</sup>

Además debe poseer la capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Nuestro estudio demostró un grado de inhibición del crecimiento de otra bacteria como es *E. coli*, de potencial patógeno. En diversos estudios se ha demostrado la capacidad de *Lactobacillus spp* para inhibir microorganismos patógenos y de esta manera tiene un efecto barrera en la superficie intestinal<sup>28</sup> La producción de

---

<sup>27</sup> Marquez F. Caracterización de la tolerancia a pH ácido, tolerancia a la bilis, susceptibilidad a antibióticos y de la colonización en gerbos de Mongolia de las cepas de *Lactobacillus* gástricas 25A y 979C. . [tesis de grado] Universidad de Concepción. Concepción.: 2011

<sup>28</sup> Vanegas M, González L, Arévalo Mayorga S, Villanueva C. Evaluación del potencia probiótico de cepas de *Lactobacillus* Colombianas aisladas de leche materna. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes. 2011

sustancias antimicrobianas como por ejemplo ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano y la producción de toxinas además de lograr la disminución del pH intestinal favorecen el crecimiento de microorganismos beneficiosos y una mejor producción sobre todo de las bacteriocinas. Como cita Rodriguez muchos investigadores como Silva, Davison y Saxalin han demostrado la capacidad de determinadas cepas de *Lactobacillus spp.* de inhibir el crecimiento de otros microorganismos destacando su efecto sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus spp*, *Salmonella spp*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium spp*, entre otros<sup>9</sup> . Distintas cepas principalmente de han resultado con buena actividad antibacteriana sobre todo para cepas de *Escherichia coli*.<sup>29,30</sup>

A su vez Gayathri demostró que diversas cepas de *Lactobacillus* pueden producir un efecto inhibitor del crecimiento sobre *E coli* en un rango de halos que va desde 10 a 36 mm. Lo cual comparativamente con nuestro aislado puede llegar a ser similar a lo encontrado con cepa seleccionada.<sup>31</sup>

Respecto a la probable utilidad o efecto beneficioso de la cepa en estudio se diseñó un ensayo experimental *in vivo* que buscó demostrar la capacidad probiótica a nivel básico de la cepa seleccionada, brindándola en la alimentación de especímenes de *Rattus norvegicus* .

Las ratas son los animales de experimentación más frecuentemente usados después de los ratones. A nivel mundial existe un registro de casi 400 especies consanguíneas definidas genéticamente que son utilizadas en su mayoría en

---

<sup>29</sup> Roldán M, Otero J, Villarreal F, Baroni M, Carrasco R. Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2011; 31:37-41. ,

<sup>30</sup> Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Locatelli E, Di Gioia D, Oggero R, Matteuzzi D. Efecto antagonista de cepas de *Lactobacillus* contra coliformes productores de gas aislada de infantes. BMC Microbiology 2011, 11:157

<sup>31</sup> Gayathri A. Potencial antagonistas de *Lactobacillus* spp contra bacterias enteropatógenos: Purificación y caracterización de las bacteriocinas. Adv. J. Food Sci. Technol., 4(5): 265-269, 2012

investigación. Para nuestro estudio se eligió la especie *Rattus norvegicus* que es una de las líneas más antiguas de roedores de experimentación por su menor grado de canibalismo, poca agresividad lo que permitió su mejor manipulación. Además su excelente adaptación a diversidad de dietas.<sup>32</sup>

La cepa en estudio se administró a la concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml en yogurt preparado que corresponde al tubo de 0.5 de la Escala de Mac Farland. En una similar concentración se preparó otros frascos de yogurt con una cepa probiotica de Lactobacilo control. Se prefirió administrárselos *Ad libitum* en frasco bebederos debido a las dificultades técnicas que representó otros métodos de inoculación como es el sondaje orogástrico. La dieta se mantuvo hiperlipídica hasta el final de experimento para procurar evidenciar cambios en la concentración del colesterol causados por el consumo del probiotico.

Como se evidenció las primeras 5 observaciones existió diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control negativo y los otros grupos (control experimental y control negativo) confirmados por la prueba de Tukey. En la sexta y séptima observación ya no existe diferencias entre los tres grupos. Aparentemente los grupos de especímenes que recibían algún tipo de cepa de Lactobacilo en su dieta (grupo experimental y control positivo) lograron equiparar hacia el final de la segunda semana el peso comparativamente con el grupo negativo. A pesar de la evidencia de una probable prevención en la ganancia de peso por el uso de probioticos como lo sugieren Miyoshi y Col este estudio no demostró este aspecto por el contrario sugiere ganancia de peso pero

---

<sup>32</sup> Hernandez M. Manejo y sujeción de roedores utilizados en laboratorio. [tesis de grado] Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia. 2009

relativa como para mantenerse dentro de parámetros normales como lo indican Sanchez y Col.<sup>33,34</sup> .

Respecto a perfil hematológico realizado. Por la dificultad de la técnica de extracción de sangre, los costos elevados en pruebas de laboratorio y para evitar daños físicos innecesarios en el animal como sugiere las recomendaciones internacionales<sup>25</sup> , se optó por extraer sangre el primer día del estudio y luego a los 14 días, al final del mismo. Se encontró respecto al hemograma que el hematocrito, Recuento de leucocitos mostraron diferencias significativas durante la medición al primer día, pero no así durante hacia el final del experimento, en la cual no se evidenció diferencias estadísticas significativas. A pesar de que las medias de los Recuentos de leucocitos estaban levemente incrementadas con respecto a los valores normales sugeridos por Messias ( 3000 a 3600 leu/ml) , no se pueden atribuir al uso de los lactobacilos ya que no hubo variación significativa entre la primera medición y la última, ni tampoco diferencias entre los grupos.

<sup>36</sup>

Los demás parámetros del hemograma se hallan en valores aceptables comparativamente con los valores normales presentados. La clínica de los especímenes estudiados muestra individuos con comportamiento, respuesta al estímulo y características de las heces normales. Lo que descarta enfermedad en los mismos a causas de algún agente patógeno. Sulemankhil y col.en Canadá evaluaron una cepa de *Lactobacillus reuteri* in vitro y técnicas in vivo, para su seguridad en el consumo humano. Se alimentó con dosis orales repetidas por 28-días a ratas *Sprague-Dawley* para demostrar la seguridad de la cepa in vivo. La administración oral de la cepa no produjo cambios en el estado general y no

---

<sup>33</sup> Miyoshi M, Ogawa A, Higurashi S. Efecto antiobesidad de *Lactobacillus gasseri* SBT2055 acompañado por la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios en tejido adiposo visceral en ratones obesos inducidos por dieta. Eur J Nutr (2014) 53. 599-606

<sup>34</sup> Sanchez M, Darimont C, Drapeau V, Emadi-Azar S, Lepage M, Rezzonico E. y Col. Efecto de *Lactobacillus rhamnosus* CGMC 1.3724 en la pérdida de peso y mantenimiento en hombres y mujeres obesos. Brit J Nutr (2014) 111: 1507-1519

hubo cambios clínicamente significativos en los marcadores bioquímicos y hematológicos de la seguridad en relación con los animales de control. Esta evaluación global de seguridad de *L. reuteri* apoya la seguridad de la cepa para su uso como un probiótico, como confirmamos con nuestro estudio.<sup>5</sup>

Un estudio de biopsia de los ganglios mesenterios no se pudo realizar por el costo elevado de la misma y la ausencia de personal técnico capacitado para poder evaluar cortes de tejido en ratas.

Finalmente se midió paralelamente al estudio de hemograma, los niveles de colesterol total. De la misma manera se realizaron sólo dos mediciones siguiendo las premisas anteriormente señaladas para el hemograma El Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de cada grupo, tampoco encontró diferencias significativas entre las dos mediciones realizadas al primer día y al último día. Los niveles de colesterol no se alteraron al pasar el tiempo. Probablemente por el activo metabolismo que presenta estos animales. No obstante pudo haber sido también favorecido su control por la capacidad que tienen estos microorganismos de generar un aumento en la excreción de esteroides ácidos en las heces, precipitando el colesterol con ácidos biliares libres catabolizados por hidrolasas bacterianas o simplemente convirtiendo el colesterol a coprostanol en el intestino.<sup>35</sup>

---

<sup>35</sup> Rubín de Celis M, Valdez N, Villantoy A. Aplicación de probióticos en el manejo de patologías del aparato digestivo. Revista Médica de Tacna. 2014. 3(1)

## CONCLUSIONES

- Se logró aislar 5 cepas con características del género *Lactobacillus* a partir de quesos confeccionados de manera tradicional en Tacna, siendo la cepa 15 a proveniente de Ticaco la que reunió mejores características microbiológicas probióticas en el estudio.
- La cepa elegida fue tipificada molecularmente y filogenéticamente dentro de la especie *Lactobacillus reuteri* con más de 99% de seguridad.
- La cepa estudiada preliminarmente cumple la mayoría de condiciones para ser considerada con capacidad potencialmente probiótica.

## RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio con una mayor población de roedores para confrontar resultados con el presente estudio para permitir su posterior escalamiento productivo.
- Realizar un estudio patológico de capacidad de colonización intestinal de la cepa de *Lactobacillus reuteri* aislada de productos lácteos de Tacna.
- Ampliar estudios de búsqueda de capacidad probiótica de las otras 4 cepas de *Lactobacillus* aisladas en el presente estudio.
- Fomentar el aislamiento de mas cepas con potencial probiotico proveniente de otras muestras biológicas.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo Acta Pediatría Española, 2013;9(61)
2. Dirección Ejecutiva de Epidemiología. Análisis de situación de salud. Región de Salud Tacna. 2011.
3. Viloche J, Tito C. Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. Revista Ciencia y Desarrollo. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 2009:61-66
4. Organización mundial de gastroenterología. Guías prácticas: Probióticos y prebióticos. Mayo 2008.
5. Sulemankhil I, Parent M, Jones ML, Feng Z, Labbé A, Prakash S. Caracterización y selección segura en vitro y en vivo de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30253 para aplicación como probiótico. Can J Microbiol. 2012 Jun;58(6):776-87.
6. Amorocho CM. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra.[Tesis doctoral en Biotecnología]. Universidad politécnica de Valencia.2011
7. Randazzo V. Costamagna S Comparación del efecto de la administración oral de dos probióticos en ratones infestados con *Trichinella spiralis*. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. (2010); 69 (1): 60-65

8. Uskova M, Kravchenko L, Avrenjeva L, Tutelyan V. Efecto de *Lactobacillus casei* 114001 probiótico sobre la bioactividad de la rutina. Bull Exp. Biol. Med. 2010; 149 (5):578-82.
9. Rodriguez M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e Inmunomoduladora.[Tesis Doctoral en Genética y Microbiología]. Barcelona:Universitat Autònoma de Barcelona. 2009
10. Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJ, Chee KM. Efecto de *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 en el desarrollo de tumores precancerosos inducidos químicamente en el colon de rata. J MedMicrobiol. 2012 Mar;61(Pt 3):361-8.
11. Dock-Nascimento, Diana Borges .Restablecimiento rápido de las células caliciformes del colon inducida por la dieta hidrolizada que contiene probióticos en la malnutrición experimental. Acta Bras Cir. 22 (Supl. 1): 72-76, 2007.
12. Lazo N, Maco M, Matos Z, Maguiña Y. Efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones. CIMEL 2007 Vol. 12, N.º 2
13. Parra R. Bacterias Acido lácticas :Papel funcional en los alimentos. [tesis doctoral] Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de investigación en Química y Tecnología de los Alimentos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; 2010.
14. Rodríguez-Carvajal M.A, Sánchez J, Campelo A, Martínez B, Rodríguez A, Gil Serrano A. Estructura de un exopolisacárido de elevado peso

molecular aislado de *Lactobacillus pentosus* LPS26. Carbohydrate Research, 2008; 343:3066–3070.

15. Pot B, Tsakalidou E. Taxonomía y metabolismo de *Lactobacillus*. Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic. 2ª ed. Norfolk: Caister Academic Press;2009
16. Azaïs-Braesco V, Bresson J, Guarner L, Corthier G. 2010.No todas las bacterias ácido lácticas son probióticas pero algunas lo son. British Journal of Nutrition; 2010: 103, p. 1079–1081
17. Quigley, E, 2010. Prebióticos y probióticos; modificando y mimetizando la microbiota. Pharmacol Res. 2010 Mar;61(3):213-8
18. Warren I, Lee E, Marin H, 2007. Probióticos para la prevención y tratamiento de infecciones nosocomiales. CHEST. 2007;132(1):286-294
19. Amorocho C, Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra, [tesis doctoral] Valencia: Editorial Universitat Politècnica de València; 2011
20. Allgeyer L, Miller M, Lee S. Vehiculos de de union para las bebidas de yogur con prebióticos y probióticos. Journal of Food Science.2010; 75(4):212-S219
21. Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado M, Vesterlund S. Interacción de los probióticos y los patógenos - Beneficios para la salud humana? Current Opinion in Biotechnology.2010;( 21):157-167.
22. Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P, Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos fermentados

con antiproliferación de las células de cáncer de colon *Biotechnol Lett* 2009;(31):571-576.

23. Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. *Rattus norvegicus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. 2008
24. Supo J. Seminario de investigación Científica .Estadistico.com. Arequipa.2014 [acceso 30 de Noviembre del 2013]. Disponible en: <http://seminariosdeinvestigacion.com/sinopsis>
25. Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos. Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación. 8ª ed. Prensa de la Academia Nacional. Washington.2010.
26. Instituto Nacional de Salud. Guía de manejo y cuidado de manejo y cuidado de animales de laboratorio. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Lima. 2008
27. Marquez F. Caracterización de la tolerancia a pH ácido, tolerancia a la bilis, susceptibilidad a antibióticos y de la colonización en gerbos de Mongolia de las cepas de *Lactobacillus* gástricas 25A y 979C. . [tesis de grado] Universidad de Concepción. Concepción:. 2011
28. Vanegas M, González L, Arévalo Mayorga S, Villanueva C. Evaluación del potencia probiotico de cepas de *Lactobacillus* colombianas aisladas de leche materna. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes. 2011

29. Roldán M, Otero J, Villarreal F, Baroni M, Carrasco R. Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2011; 31:37-41.
30. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Locatelli E, Di Gioia D, Oggero R, Matteuzzi D. Efecto antagonista de cepas de *Lactobacillus* contra coliformes productores de gas aislada de infantes. *BMC Microbiology* 2011, 11:157
31. Gayathri A. Potencial antagonistas de *Lactobacillus* spp contra bacterias enteropatógenos: Purificación y caracterización de las bacteriocinas. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 4(5): 265-269, 2012
32. Hernandez M. Manejo y sujeción de roedores utilizados en laboratorio. [tesis de grado] Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia. 2009
33. Miyoshi M, Ogawa A, Higurashi S. Efecto antiobesidad de *Lactobacillus gasseri* SBT2055 acompañado por la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios en tejido adiposo visceral en ratones obesos inducidos por dieta. *Eur J Nutr* (2014) 53. 599-606
34. Sanchez M, Darimont C, Drapeau V, Emadi-Azar S, Lepage M, Rezzonico E. y Col. Efecto de *Lactobacillus rhamnosus* CGMC 1.3724 en la pérdida de peso y mantenimiento en hombres y mujeres obesos. *Brit J Nutr* (2014) 111: 1507-1519
35. Rubín de Celis M, Valdez N, Villantoy A. Aplicación de probióticos en el manejo de patologías del aparato digestivo. *Revista Médica de Tacna*. 2014. 3(1)

36. Messias J. Parámetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtenidos a través de método automatizado y no automatizado. Medicina Veterinaria, ;2009.3(2):, p.1-8
37. León C, Diuris B, Peña A, Ronda M, Barbara G, Arteaga M, Bada A, Gonzales Y, Mancebo Y. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. Rev. electrón. Vet. 2011: 12(11)

ANEXO 01

CUADRO 01: Características del género *Lactobacillus* spp

CARACTERÍSTICAS	GRUPO I Homofermentativos Obligados	GRUPO II Heterofermentetivos Facultativos	GRUPO III Heterofermentativos Obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	-	-	+
CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa	+	+	-
Presencia de fosfoquetolasa	-	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. reuteri</i>
		<i>L. paracasei</i>	<i>L. kefir</i>

CUADRO 02: Especies características del género *Lactobacillus* según la procedencia, uso y producción de heteropolisacáridos

Aisladas casos atípicos	Empleadas en alimentos	Presentes en humanos	Producen pequeñas cantidades heteropolisacáridos
<i>L. rhamnosus</i> * (1) <i>L. paracasei</i> *(1) <i>L. plantarum</i> *(1) <i>L. brevis</i> * <i>L. delbrueckii</i> * <i>L. johnsonii</i> * <i>L. salivarius</i> + <i>L. acidophilus</i> * <i>L. casei</i> * <i>L. fermentum</i> * <i>L. gasseri</i> + <i>L. jensenii</i> +	<i>L. rhamnosus</i> (2) <i>L. paracasei</i> (2) <i>L. plantarum</i> (2) <i>L. brevis</i> (2) <i>L. delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i> (2) <i>L. johnsonii</i> ** <i>L. salivarius</i> ** <i>L. acidophilus</i> (2) <i>L. casei</i> (2) <i>L. fermentum</i> (2) <i>L. helveticus</i> (2) <i>L. reuteri</i> (2)	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. antri</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. gastricus</i> <i>L. kaliixensis</i> <i>L. oris</i> <i>L. paraplantarum</i> <i>L. sakei</i> <i>L. ultumensis</i> <i>L. vaginalis</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. sakei</i> <i>L. kefiranoferiens</i>

(1) Aislados con mayor frecuencia/\*Relacionadas con intestino humano/+Asociadas a alimentos, cultivos iniciadores, probióticos

(2) Animales granja y alimentos/\*\* Solo alimentos. (P. De Vos et al. 2009)

## ANEXO 02

**Tabla 15: Parámetros hematológicos de *Rattus norvegicus*.<sup>36</sup>**

Variable Hematológica	Valor normal
Eritrocitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5.7 – 6.1
Hemoglobina (g/dL)	11.3 – 11.9
Hematocrito (%)	36.1 – 38.8
VCM (ft)	62.5 – 65.1
HCM (pg)	18.8 – 22.5
CHCM (%)	30.4 – 31.8
Leucocitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	3.0 – 3.5
Neutrófilos (%)	26.0 – 34.3
Eosinófilos (%)	0.2 – 0.9
Linfocitos (%)	59.5 – 68.3
Monocitos (%)	2.1 – 8.2
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	6.1 – 7.4

<sup>36</sup> Messias J. Parámetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtenidos a través de método automatizado y no automatizado. Medicina Veterinária, ;2009.3(2);, p.1-8



**Tabla 16: Parámetros bioquímicos de *Rattus norvegicus*<sup>37</sup>**

Parámetros	Genero					
	Hembras			Machos		
	Rangos de edad (semanas)					
	5-8	9-14	15-22	5-8	9-14	15-22
Fosfatasa alcalina (UI/L)	60.5 - 284.1	82.8 - 297.3	69.65 - 227.26	150.5 - 421.3	85.1 - 311.7	131.5 - 357.3
Creatinfosfokinasa (UI/L)	246 - 3228	494 - 4132	3027 - 3428	381 - 3393	233 - 4367	1384 - 4975
GGT (UI/L)	0 - 2.33	0 - 1.43	0 - 3.13	0.86	0 - 1.05	0 - 1.97
GOT /AST (UI/L)	79.5 - 248.1	94.9 - 240.8	42.9 - 270.8	65.8 - 266.2	88.9 - 215.8	61.4 - 275.2
GPT/ALT (UI/L)	20.2 - 59.8	32.7 - 84.1	33.4 - 73.1	26.3 - 68.5	32.2 - 80.9	41 - 83.1
Albúmina (g/dL)	2.76 - 4.88	2.92 - 4.64	3.18 - 5.22	2.63 - 4.59	2.94 - 4.29	2.94 - 4.65
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.005 - 0.19	0.025 - 0.42	0 - 0.48	0.01 - 0.17	0 - 0.39	0.01 - 0.43
Proteínas totales (g/dL)	6.11 - 17.49	5.99 - 7.45	6.40 - 8.20	5.45 - 7.67	5.69 - 7.34	5.94 - 7.97
Glucosa (mg/dL)	60.0 - 161.7	66.8 - 154.9	54.7 - 189.7	43.0 - 152.7	58.0 - 160.2	48.4 - 91.2
Urea (mg/dL)	33.11 - 86.5	38.33 - 8.79	43.2 - 70.8	38.0 - 63.3	31.6 - 52.6	39.6 - 68.8
AcidoÚrico (mg/dL)	1.05 - 3.01	2.22 - 4.11	1.25 - 3.76	0.88 - 1.66	0.97 - 4.72	1.28 - 3.71
Calcio (mmol/L)	1.79 - 3.29	2.37 - 2.91	2.15 - 3.17	1.51 - 3.19	2.21 - 2.81	2.19 - 3.27
Fósforo (mg/dL)	4.33 - 3.74	5.42 - 6.74	4.2 - 8.33	6.1 - 8.26	6.01 - 8.68	5.26 - 8.44
Colesterol Total (mg/dL)	49.7 - 91.0	41.1 - 59.1	58.5 - 101.6	44.4 - 96.9	40.3 - 84.7	52.2 - 95.7
Triglicéridos (mg/dL)	24.5 - 91.3	76.4 - 132.8	62.4 - 123.7	26.7 - 99.9	44.8 - 119.8	52.2 - 21.5
Creatinina (mg/dL)	0.23 - 0.80	0.5 - 0.92	0.48 - 0.68	0.32 - 0.71	0.46 - 0.88	0.43 - 0.64
Albúmina/globulina	0.25 - 2.80	0.69 - 2.19	0.44 - 2.68	0.32 - 2.48	0.74 - 2.12	0.43 - 2.41

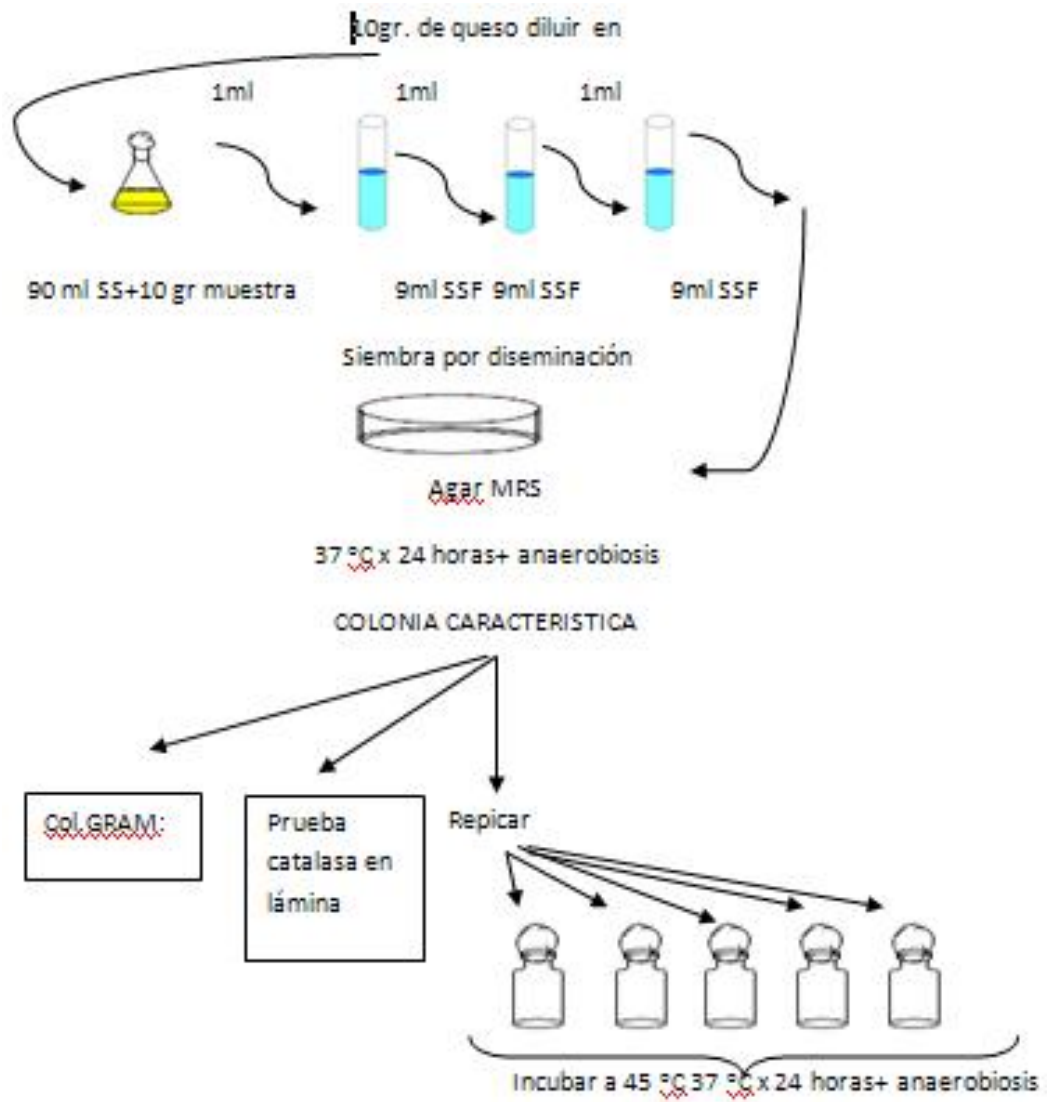
<sup>37</sup> León C, Diuris B, Peña A, Ronda M, Barbara G, Arteaga M, Bada A, Gonzales Y, Mancebo Y. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cemp: SPRD. Rev. electrón. Vet. 2011: 12(11)

**ANEXO 03:Tipos de hemolisis.<sup>9</sup>**

<b><math>\alpha</math>-hemólisis o hemólisis incompleta</b>	Se observa clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias.
<b><math>\beta</math>-hemólisis o hemólisis verdadera</b>	Se observa una clarificación total del medio de cultivo alrededor de las colonias.
<b><math>\gamma</math>-hemólisis</b>	No se observa clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias.

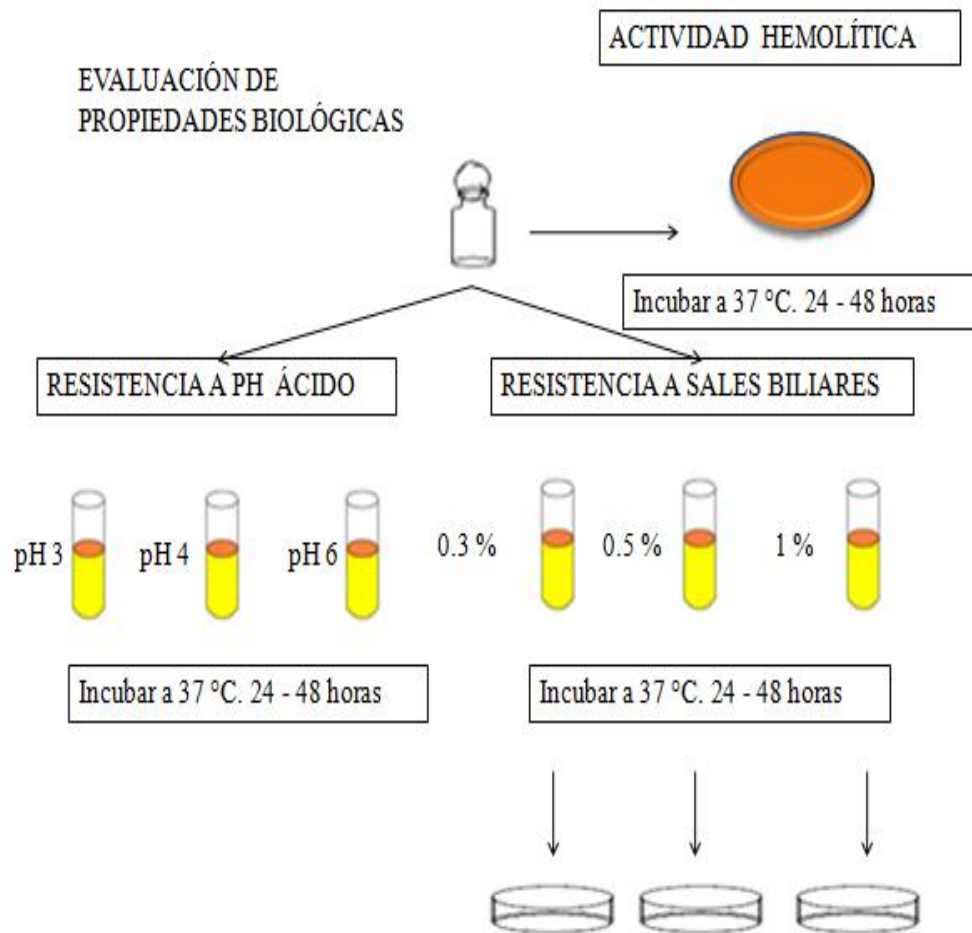
#### ANEXO 04

Esquema de aislamiento de cepas de *Lactobacillus sp.* de muestras provenientes de quesos tradicionales de Tacna

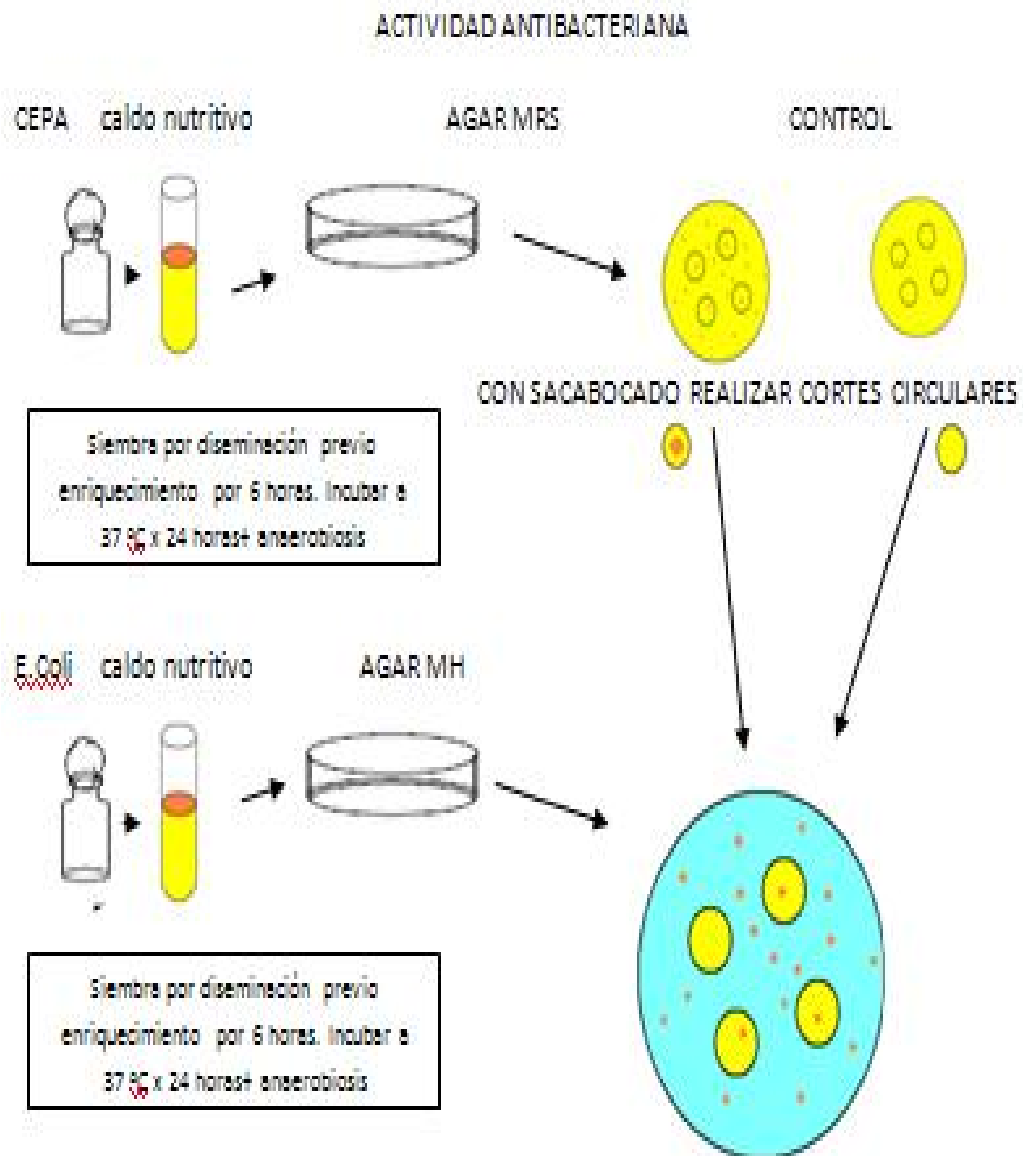


## ANEXO 05

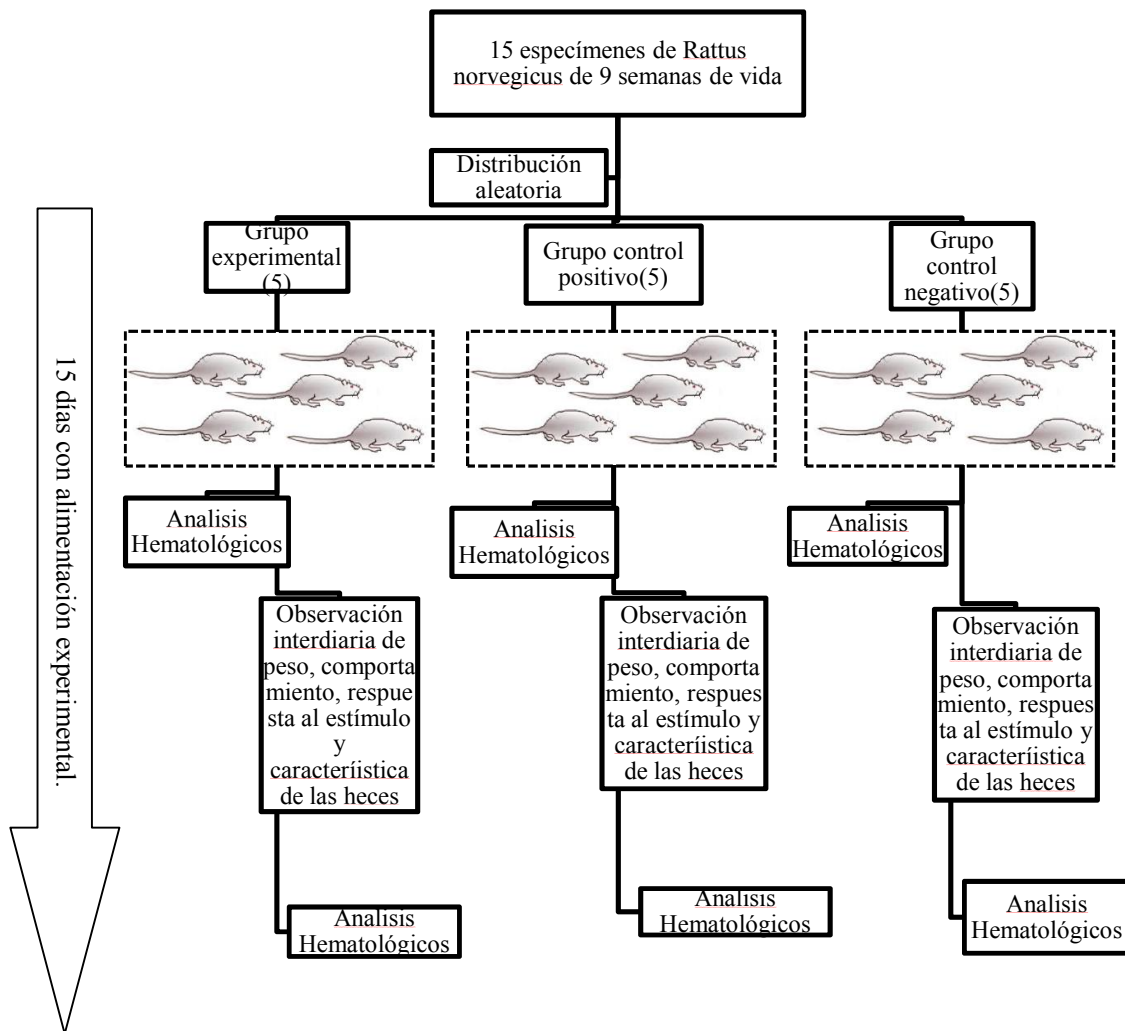
Esquema de Evaluación de las propiedades biológicas cepas nativas de *Lactobacillus sp.* aisladas de productos lácteos de Tacna



**ANEXO 06: Evaluación de la actividad antibacteriana antagonista de cepas de *Lactobacillus sp.* Provenientes de productos lácteos sobre *Escherichia coli* ATCC 25922**



**ANEXO 07 : Esquema de la evaluación de la capacidad probiotica *in vivo* de la cepa seleccionada de lactobacilos en especímenes de *Rattus norvegicus***



**ANEXO 08**

<p align="center"><b>FICHA DE EVALUACIÓN DÍARIA</b>  <b>“EVALUACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE <i>Lactobacillus sp.</i> AISLADOS DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE TACNA COMO PROBIÓTICOS.2013”</b></p>									
<p>GRUPO: <input type="checkbox"/> control positivo    <input type="checkbox"/> experimental    <input type="checkbox"/> control negativo                      Código :</p>									
FECHA /HORA:	/	/	/	/	/	/	/	/	
1PESO	.....Kg	.....Kg	.....Kg	.....Kg	.....Kg	.....Kg	.....Kg	.....Kg	
COMPORTAMIENTO	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal <input type="checkbox"/> Pelo dañado y/o secreción ocular <input type="checkbox"/> Postura anormal <input type="checkbox"/> Automutilación y/o expresión de dolorosa. <input type="checkbox"/> OTRO:
RESPUESTA LA ESTIMULO	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:	Normal. <input type="checkbox"/> Agresivo. <input type="checkbox"/> Comatos o. <input type="checkbox"/> OTRO:
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS HECES	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:	Forma Color Consistencia olor <input type="checkbox"/> OTRO:
Hemograma	Fecha:	Descripción:							
Colesterol Total	Fecha:	Resultado:	Fecha:	Resultado:	Fecha:	Resultado:	Fecha:	Resultado:	

**ANEXO 09 : Características Microbiológicas de las cepas aisladas de muestras provenientes de quesos tradicionales de Tacna**

Cepa	Origen	Condiciones de Respiración	Tiempo de crecimiento	Morfología en Agar MRS	Morfología Tinción Gram	Catalasa	Agar TSI
1a	Tarata	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	No bioquímica
1b	Tarata	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa sobreelevada de 1.5mm de Diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	No bioquímica
2a	Tarata	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero color plumizo de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	No bioquímica
2b	Tarata	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
3a	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/a + -
3b	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
4a	Tarata	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
4b	Tarata	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
5a	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	No bioquímica
5b	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia ploma de borde entero liso de 0.8 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	No bioquímica
6a	Tarata	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
6b	Tarata	Anaerobiosis	72 horas	Colonia crema de borde entero liso crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica



7a	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa sobreelevada de 1.5mm de Diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
7b	Tarata	Anaerobiosis	24 horas	Colonia ploma de borde entero liso de 0.8 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Negativo	No bioquímica
8a	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
8b	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
9a	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia ploma de borde entero liso de 0.8 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
9b	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa ploma de 1 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Positivo	No bioquímica
10a	Candarave	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
10b	Candarave	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
11a	Candarave	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
11b	Candarave	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
12a	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -
12b	Candarave	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Negativo	a/k - -
13a	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia ploma de borde entero liso de 0.8 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Positivo	No bioquímica
13b	Candarave	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa ploma de 1 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Positivo	No bioquímica
14a	Ticaco	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica

14b	Ticaco	Anaerobiosis	24 horas	Colonia de borde entero lisa ploma de 1 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Positivo	No bioquímica
15a	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	a/k - -
15b	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero liso crema de 1.2 mm de diámetro	Bacilos Gram positivos	Positivo	a/k - -
16a	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa ploma de 1 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Negativo	No bioquímica
16b	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa ploma de 1 mm de diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Negativo	No bioquímica
17a	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa crema de 1 mm de diámetro	Levaduras	Positivo	No bioquímica
17b	Ticaco	Anaerobiosis	48 horas	Colonia de borde entero lisa sobreelevada de 1.5mm de Diámetro	Cocobacilos Gram positivo	Negativo	No bioquímica
18a	Ticaco	Anaerobiosis	72 horas	Colonia ploma de borde entero liso de 0.8 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Positivo	No bioquímica
18b	Ticaco	Anaerobiosis	72 horas	Colonia de borde entero plomo claro de 2 mm de diámetro	Coco Gram positivo	Positivo	No bioquímica

**Fuente: Ficha de recolección de datos.**

**Anexo 10: Informe de identificación molecular de la cepa 15 aislada de productos lácteos de Tacna. 2013**



24 Febrero 2015

**INFORME DE IDENTIFICACION MOLECULAR**

**CLIENTE:** Sr. Milton Rubin de Celis/ Universidad Privada de Tacna

**CODIGO DE LA MUESTRA:** L01: Muestra de cultivo de lactobacilo sin identificar

**RESULTADO**

La identificación molecular de L01 de la muestra de cultivo bacteriano mediante secuenciamiento del gen 16S rRNA, análisis por *Blast* y análisis filogenético se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1. Resultados de la identificación molecular de 1 muestra de cultivo bacteriano.**

Código Muestra	ID ADN	Identificación Molecular
L01	L01	<i>Lactobacillus reuteri</i>

**Dr. José R. Espinoza**  
BIONOMA  
MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS

*PD. Informe incluye 3 páginas más 1 documento anexo de análisis filogenético*

1

\*La identificación a nivel de especie es referencial, para identificación a nivel de especie con niveles de confianza del 100% es necesario secuenciar todo el gen 16S rDNA.

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS

### MUESTRA L01

MUESTRA: Cultivo de 48 horas  
CÓDIGO PLACA: L01  
CÓDIGO SECUENCIAMIENTO: L01

### 1. BASES DE DATOS UTILIZADAS PARA EL ANALISIS BLAST

<sup>1</sup> Blast server for bacterial identification (<http://bioinfo.unice.fr/blast/>)

<sup>2</sup> Ribosomal database project ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp))

<sup>3</sup> BiBi database (<http://umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/qm?page=BibiDataBases>).

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Identidad >99%, e-value (> e<sup>-140</sup>) y análisis filogenético (Mignard & Flandrois, 2006).

### RESULTADO

#### Secuencia (5'- 3')

```
TGCTAGTCGTACGCACTGGCCACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGAC
GATGGATCAACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACAACGTAGGTAACCTGC
CCGGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAC
AAAAGCCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGAT
GGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGAT
GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTGAGACACG
GTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGGCGCA
AGCCTGATGGAGCAACACCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAG
CTCTGTTGTTGGAGAAGAOCGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTGAOC
GTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTGCTTAGGCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATC
GGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTA
GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGT
CTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATT
AGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGG
TTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATG
ACAGGTGGTGCATGGTCGTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT
CTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGA
TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACA
ACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTT
CGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
```

2

\*La identificación a nivel de especie es referencial, para identificación a nivel de especie con niveles de confianza del 100% es necesario secuenciar todo el gen 16S rDNA

GTCACACCATGGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGG  
AGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACT

**Género / Especie**

*Lactobacillus reuteri*<sup>1\*</sup>

e-value: e<sup>0</sup>

Identidad: 100%

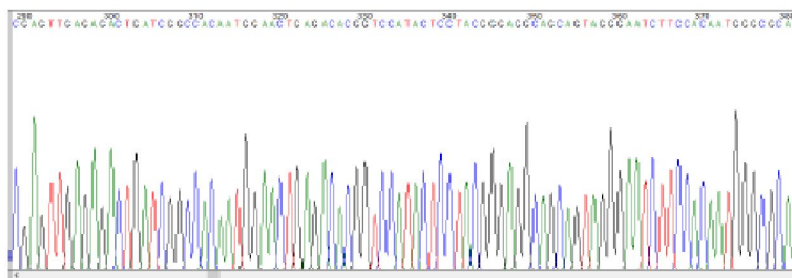
*Lactobacillus reuteri*; AJ853322<sup>2\*</sup>

S<sub>ab</sub> score: 1.0

*Lactobacillus reuteri*<sup>3\*</sup>

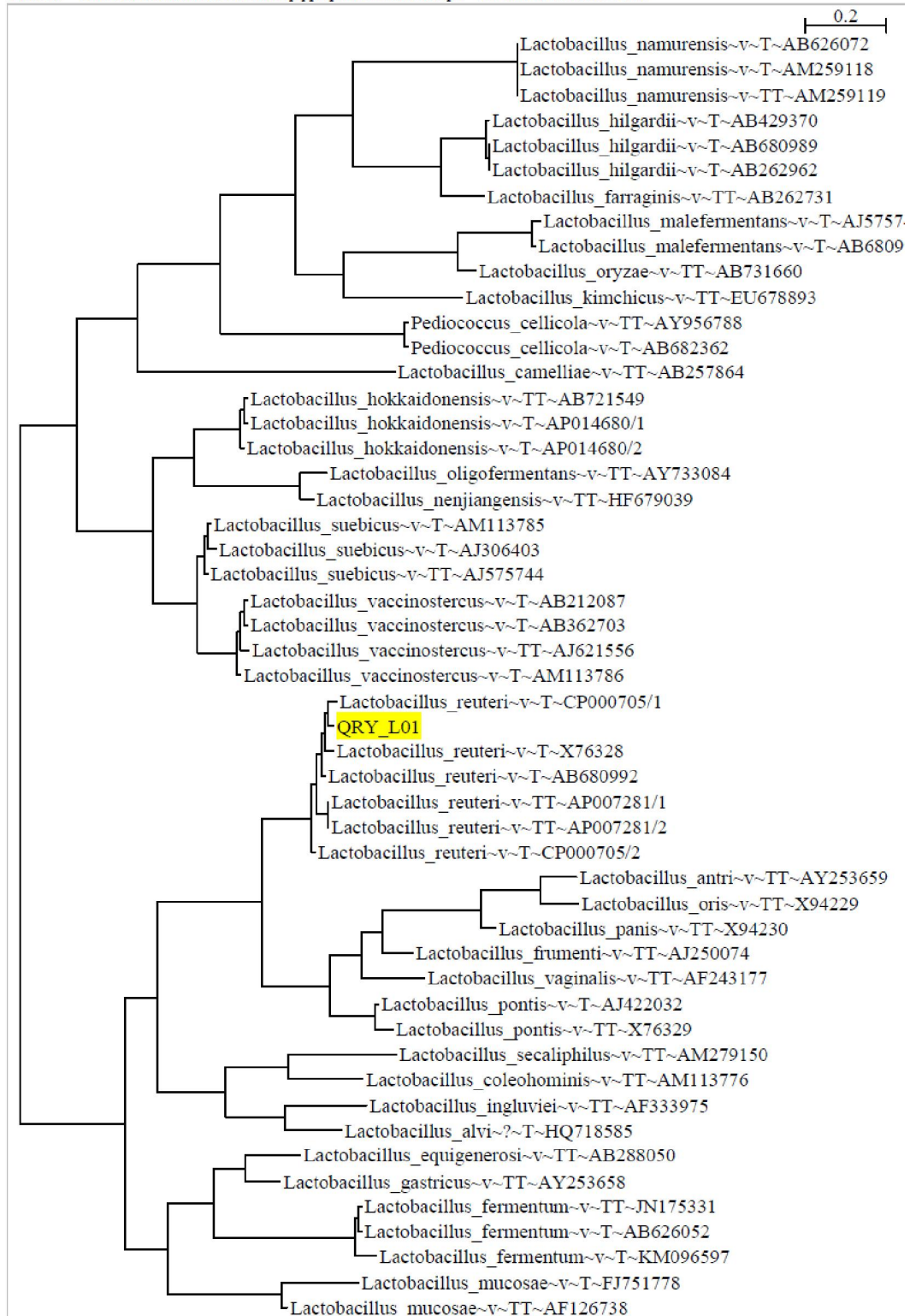
**Literatura citada**

1. Mignard S & Flandrois J. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 67: 574–581.



**Figura 1.** Cromatograma obtenido por secuenciamiento de gen 16S de muestra L01

\*La identificación a nivel de especie es referencial, para identificación a nivel de especie con niveles de confianza del 100% es necesario secuenciar todo el gen 16S rDNA



**ANEXO 11 : Fotos del estudio**

**Foto 04: Pesado previo a la siembra de las muestras de queso artesanal de Tacna en medio selectivo MRS.**



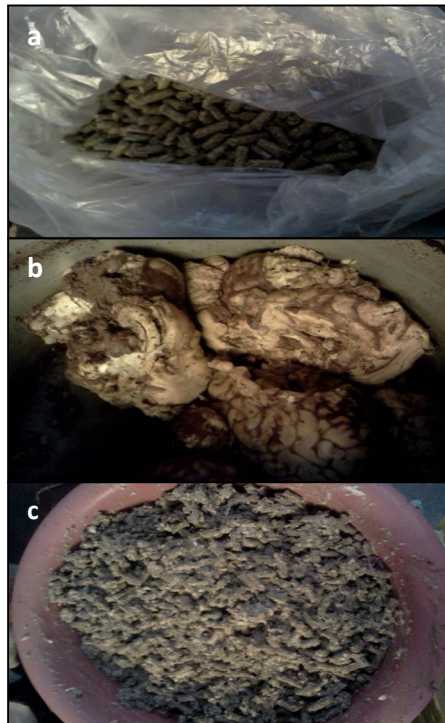
**Foto 05: Muestras de queso tradicional de Tacna disueltas en buffer previa siembra en medio en medio selectivo MRS**



**Foto 06: Campana de Anaerobiosis empleada para las siembras microbiológicas.**



**Foto 07: Componentes de la dieta hiperlipídica: concentrado de alimento para conejos(a), sesos de vacuno (b) y el producto final (c).**





**Foto 08: Pesado interdiario, control de comportamiento, respuesta al estímulo y características de las heces.**



**Foto 09: Extracción de sangre mediante la técnica de Kolmer desde la vena lateral de la cola de los especímenes de estudio.**

