

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis *in vitro* de la eficiencia de una nueva mezcla probiótica

Monografía previa a la obtención del título de Biólogo

Cristian Patricio Benalcázar León

Quito, 2024

Certifico que la Monografía de Biología, del Sr. CRISTIAN PATRICIO BENALCÁZAR LEÓN
ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser
presentada para la calificación correspondiente.



Firma del Director de la Monografía

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Quito, 24 de junio de 2024

DEDICATORIA

Expreso un agradecimiento y una dedicatoria muy grande y principal hacia Dios, por todas las bendiciones que me ha dado, por todo lo que me ha dado y me ha ayudado a conseguir.

La presente monografía está dedicada a mis padres Hernán Benalcázar y Miryan León, por todo el apoyo que me han dado, por sus conocimientos y por transmitirme mucha motivación a esforzarme y a realizar varios proyectos. De igual forma está dedicada para mi abuelita Blanca Dávila, y para la memoria de mis abuelitos Luis León, Arturo Benalcázar y Rosa Gómez.

A mis profesores por todo el conocimiento que me han enseñado, y un agradecimiento muy especial a la Doctora Iliana Alcocer, por permitirme realizar mi investigación en el laboratorio que dirige y por la atención prestada.

También está dedicada la presente monografía a toda mi familia y a mis amigos. Finalmente, también expreso una dedicatoria a todas las personas que les gusta la innovación y la ciencia.

Tabla de contenidos

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 OBJETIVOS.....	6
3.1.1 OBJETIVO GENERAL	6
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4. MARCO TEÓRCIO	8
4.1 VINAGRE	8
4.2 HARINA DE GRILLO	9
4.3 <i>Bacillus subtilis</i>	10
4.4 ELABORACIÓN DE LA MEZCLA PROBIÓTICA	11
4.5 BACTERIAS PATÓGENAS	13
4.6 FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	15
4.6.1 Identificación de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	16
4.6.2 Identificación de <i>Psuedomonas aeruginosa</i>	20
4.6.3 Identificación de <i>Bacillus subtilis</i>	22
4.7 ANÁLISIS DE LA PRUEBA IN VITRO	30
4.8 RESULTADOS y DISCUSIÓN	31
5. CONCLUSIONES	39
5.3. PUNTOS FUERTES.....	40
5.4. PUNTOS DÉBILES	41
6. RECOMENDACIONES.....	42

7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
----------	--	-----------

1. RESUMEN

Los probióticos tienen una gran aplicación para la inhibición de patógenos. Además, los probióticos tienen muchas aplicaciones tanto en la salud humana como en la salud animal, además ciertas bacterias contribuyen mucho en la agricultura. Los desbalances de ciertas bacterias, puede llegar a ser un problema de salud para animales y humanos. El objetivo de la presente monografía es determinar la eficiencia de una nueva mezcla probiótica en condiciones similares al intestino delgado a través de pruebas de presencia y ausencia de microorganismos patógenos. Se preparó una nueva mezcla probiótica, misma que incluyó su formulación y elaboración. Para garantizar que sea un producto seguro para el consumo humano se realizó una investigación sobre sus componentes, además la mezcla fue sometida a un tratamiento. Posteriormente se seleccionó distintas bacterias patógenas: *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065 y *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407, las cuales presentan problemas en el ámbito de la salud pública. Con las bacterias patógenas y con la bacteria probiótica, se procedió a realizar pruebas de identificación. Posteriormente se realizó un análisis de la eficiencia de la nueva mezcla probiótica, mediante tres distintos tratamientos y por cada uno de estos tratamientos se realizaron tres repeticiones. Los análisis se realizaron in vitro evaluando si puede inhibir a *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y a *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065. A partir de esto se obtuvo que bajo ciertas condiciones tiene potencial para inhibir a *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407, pero no a *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, el mejor tratamiento fue el tratamiento 1. Se concluye que los componentes de la mezcla probiótica tienen muchos beneficios para la salud y son seguros para su consumo. *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* Enteritidis representan un peligro para la salud pública. El tratamiento 1 es el más eficiente en la inhibición bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065.

2. ABSTRACT

Probiotics have big applications for the inhibition of pathogens. In addition, probiotics have a lot of applications, such as human and animal health, some bacteria have contributions to agriculture. The desbalance of some bacteria, can be a problem for human and animal health. The objective of the present investigation is to determine the efficiency of a new probiotic mixture in similar conditions of the small intestine, through tests of presence and absence of the pathogen microorganisms. It has been prepared a new probiotic mixture, the same that it has been included the formulation and the elaboration. To could guarantee that is a safety product for human consumption an investigation of their components was conducted, and also the mixture were performed with a procedure. Latter different pathogenic bacteria were selected: *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065 and *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407, which represents a problem of public health. Then with the pathogen bacteria and with the probiotic bacteria proceeded to make the identification tests. Subsequently the analysis of the efficiency of this new probiotic mixture in vitro, was performed, with 3 different treatments, each treatment has 3 repetitions. In vitro analysis has tested if this probiotic mixture can inhibit *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065 and *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407. Results shows that under certain conditions was possible to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 but not *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, the first treatment was the best treatment. For this, it was possible to conclude that under some conditions the probiotic mixture has potential to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407, but not *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065. It is possible to conclude that the components of the probiotic mixture has many benefits for health and they are safe for consumption. *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* Enteritidis represents a danger for public health. Treatment 1 was the most efficient treatment for the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065.

3. INTRODUCCIÓN

Los componentes de la mezcla probiótica son *Bacillus subtilis*, harina de grillos y tres tipos de vinagre: vinagre blanco, de manzana y vinagre balsámico. Se realizó una investigación en el buscador de patentes de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, no se encontraron registros de publicaciones sobre propiedad intelectual de la mezcla que se va a analizar in vitro (OMPI, s.f.).

“Los probióticos son alimentos que contienen bacterias vivas que al consumirlos proporcionan beneficios para la salud. Los probióticos actúan principalmente en el aparato digestivo, donde pueden afectar el microbioma intestinal. Este microbioma está formado por muchos microorganismos (en su mayor parte bacterias) que viven principalmente en el intestino grueso. Cuando una persona come o bebe suficientes probióticos, estos le ayudan a proteger el aparato digestivo de microorganismos nocivos, a mejorar la digestión y la función intestinal, y además podrían proporcionar otros beneficios para la salud” (National Institute of Health, 2022). *Bacillus subtilis* es una bacteria probiótica, cepas de bacilo probiótico, aplicadas en humanos puede erradicar la colonización nasal e intestinal de la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* (Piewngam et al., 2018). Además, *Bacillus subtilis* administrada oralmente tiene la capacidad de inhibir la translocación de *Enterococcus faecalis* en el torrente sanguíneo (Piewngam et al., 2021). Los *Lactobacillus* tienen la capacidad de incrementar la inmunidad protectora de la mucosa digestiva (Zeise et al., 2021).

En la actualidad, hay un gran consumo de alimentos fermentados, mismos que aportan una gran cantidad de beneficios, la cantidad de alimentos fermentados que se consumen es 3500 aproximadamente, lo cual indica el gran mercado que implica este sector (Abraham et al., 2022). Existen varios métodos de producir alimentos fermentados (Abraham et al., 2022). En el caso de la presente mezcla se la obtuvo mediante el método de

fermentación por inoculación, este método se basa en agregar al sustrato cultivos de microorganismos, tres ejemplos de alimentos fermentados que se producen por este método, son el vinagre, el kéfir y la kombucha (Abraham et al., 2022). Otro método muy importante en la obtención de alimentos fermentados es el de fermentación espontánea, este método consiste en que los alimentos que se fermentarán, o en el proceso por el cual se fermentan estos alimentos, ya contienen los microorganismos necesarios para que se de esta fermentación, y no es necesario agregar cultivos de microorganismos, dos alimentos fermentados que se obtienen mediante este proceso es el kimchi y chucrut (Abraham et al., 2022).

Un grupo de alimentos que es muy consumido son los insectos (Magara et al., 2021). Estos han sido consumidos durante miles de años, y se han realizado muchas investigaciones para lograr determinar las especies que pueden ser consumidas como un alimento (Magara et al., 2021). Una gran ventaja que se da por el consumo de insectos consiste en que para su crianza ocupan menos espacio y recursos que otros animales como es el caso del ganado, por lo tanto, representan un gran ahorro de recursos en comparación del consumo de otras proteínas (Magara et al., 2021). También se debe verificar la seguridad de los mismos previamente a su consumo (Magara et al., 2021).

Otros probióticos que se destacan en la literatura son *Lactobacillus lactis*, pueden inhibir infecciones bacterianas, por ejemplo, inhiben a *Vibrio cholerae* gracias a la acidificación que produce las bacterias ácido lácticas y a su estado metabólicamente activo (Mao, 2018). *Lactococcus lactis*, en ciertas condiciones, puede inhibir el crecimiento de enterococos resistentes a la vancomicina (Kim et al., 2019). *Lactococcus lactis* produce una bacteriocina que puede inhibir a *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Azhar et al., 2017). En un estudio en ratones se vio, de forma experimental, que *Lactobacillus rhamnosus* puede dar protección frente a una neumonía ocasionada por *Pseudomonas aeruginosa* (Gutiérrez, 2021).

En algunas especies de animales acuáticos como peces y camarones se han encontrado especies de bacterias patógenas del género *Vibrio*, incluyendo *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* (Leyva-Castillo et al., 2013). *Vibrio parahaemolyticus* es causante de gastroenteritis aguda, que en algunos casos puede ocasionar la muerte de la persona que contrae la bacteria (Dabanch et al., 2009). Además, en los camarones causa la necrosis aguda del hepatopáncreas (Varela y Choc, 2020). Existen otras bacterias que pueden ocasionar enfermedades en los peces, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Balbuena et al., 2011). Los probióticos presentan aplicaciones en la acuicultura, por ejemplo, en la trucha arcoíris mediante la administración por dos semanas de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* se puede lograr que se active el sistema inmune y se dé una protección contra la lactococosis (Gutiérrez, 2021).

En el íleon de los pollos hay una gran cantidad de bacterias, de estas la mayoría pertenecen al género *Lactobacillus*, seguida por las familias Clostridiaceae que es la más abundante en el ciego, Streptococcaceae y Enterococcaceae (Blajman et al., 2015). Un problema con la cría intensiva, se da en el intestino, que puede ser colonizado por bacterias del género *Salmonella*, que son bacterias patógenas (Blajman et al., 2015).

Se debe tener cuidado con los desequilibrios de ciertas bacterias, por ejemplo, el desequilibrio de ciertas bacterias del género *Clostridium*, las cuales habitan en el intestino y producen butirato, va a promover procesos en los colonocitos que contribuirá ocasionando un incremento en las concentraciones de oxígeno luminal, lo cual ocasionará que la familia Enterobacteriaceae tenga una expansión (Ashley et al., 2020) La microbiota intestinal, puede influenciar la inflamación pulmonar (Ashley et al., 2020). Uno de estos mecanismos consiste en que los ácidos grasos de cadena corta, que son producidos por ciertas bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, contribuyen a dar protección en casos de infecciones

pulmonares (Le Guern et al., 2023). Adicionalmente las bacterias que habitan en el intestino, pueden influenciar los neurotransmisores del cerebro, lo cual influye en el estado de ánimo y en la salud mental (García et al., 2021).

Los microorganismos tienen una gran importancia en la calidad del suelo, en el caso de *Bacillus subtilis* contribuye a la fertilización del suelo de dos formas, la primera consiste en la fijación de Nitrógeno, mientras que la segunda se trata de su capacidad de solubilizar fosfatos (González-León et al., 2022). Además, esta bacteria puede combatir con bacterias fitopatógenas (González-León et al., 2022). En cuanto a las bacterias de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* tienen la capacidad de combatir a distintos fitopatógenos que habitan en el suelo (Tanya Morocho y Leiva-Mora, 2019). Adicionalmente *Bacillus subtilis* puede contribuir mucho al desarrollo de las plantas, promoviendo su crecimiento (Sun et al., 2020).

Se puede producir biofertilizantes que contengan microorganismos, por ejemplo, en estudios se ha determinado que la mezcla de estiércol con paja sometida a un proceso de compostaje, y la posterior inoculación con *Bacillus subtilis*, produjo muchos beneficios como biofertilizante, contribuyendo principalmente a evitar la pérdida de Nitrógeno del suelo (Sun et al., 2020).

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de una nueva mezcla probiótica en condiciones similares al intestino delgado a través de pruebas de presencia y ausencia de microorganismos patógenos.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar sobre los componentes de la mezcla probiótica y sus posibles efectos beneficiosos para la salud, mediante una revisión bibliográfica.
- Elaborar una nueva mezcla probiótica que incluya harina de grillo, distintos tipos de vinagre: de manzana, vinagre blanco y vinagre balsámico y *Bacillus subtilis*.
- Investigar sobre las bacterias patógenas escogidas, con un énfasis en aspectos como problemática en la salud, identificación y cultivo mediante una revisión bibliográfica del tema.
- Analizar la eficiencia de *Bacillus subtilis* presente en la nueva mezcla probiótica con distintos tipos de vinagre que incluyen vinagre de manzana, vinagre blanco y vinagre balsámico y harina de grillos, para la inhibición de bacterias patógenas luego de ser sometidos a un medio de cultivo que simula parcialmente las condiciones del intestino por análisis de presencia o ausencia del patógeno.

4. MARCO TEÓRCIO

4.1 VINAGRE

Existen varias maneras de obtener vinagre. Entre ellas se encuentra la fermentación, misma que corresponde al proceso de fermentación etanólica y luego la fermentación acetosa (Abraham et al., 2022). A continuación, se describe el proceso, desde que se degrada la glucosa. La glucosa, debido a la acción de la hexoquinasa, se transforma en glucosa 6-fosfato (Berg et al., 2008). La glucosa 6-fosfato va a ser modificada por la enzima fosfoglucoisomerasa transformándose en fructosa fosfato, que, debido a la acción de la enzima fosfofructoquinasa se convertirá en fructosa 1,6 bifosfato (Berg et al., 2008). La aldosa catalizará la fructosa 1,6 bifosfato y ocasionará que se forme gliceraldehído 3 fosfato, mismo que debido a la acción de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, se transformará en 1,3-bisfosfoglicerato (Berg et al., 2008). El 1,3-bisfosfoglicerato por acción de la fosfoglicerato kinasa se transformará en 3-fosfoglicerato, la fosfoglicerato mutasa convertirá el 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. La enzima enolasa intervendrá para que se transforme el 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, finalmente, el fosfoenolpiruvato debido a la enolasa se convierte en piruvato y de esta manera se termina la glucólisis (Berg et al., 2008).

Posteriormente se da la fermentación alcohólica, donde el proceso implica dos reacciones metabólicas, la primera consiste en que la enzima piruvato descarboxilasa actúa transformando el piruvato en acetaldehído mismo que por acción de la alcohol deshidrogenasa se transformará en etanol (Berg et al., 2008). Posteriormente se somete a la fermentación acética, la cual inicia mediante la oxidación del etanol a acetaldehído, el cual es un proceso catalizado por la enzima acetaldehído deshidrogenasa y finalmente la aldehído deshidrogenasa interviene para transformar el acetaldehído en ácido acético (Gullo et al., 2014).

Las características organolépticas del vinagre estarán dadas por el sustrato del que se preparó el mismo, puesto que las bacterias ácido acéticas producen varios ácidos orgánicos, mismos que pueden variar en función de los azúcares y alcoholes presentes en el sustrato (Abraham et al., 2022).

El vinagre aporta muchos beneficios, entre estos se encuentra que tiene propiedades antimicrobianas que son eficientes en medidas pequeñas, puede contribuir a reducir las probabilidades de riesgo del desarrollo de cáncer (Johnston y Gaas, 2006). Adicionalmente a esto, el vinagre tiene muchos beneficios, como es el caso de controlar los índices de glucemia, esto lo puede realizar en personas sanas, además en personas con resistencia a la insulina e incluso en personas con diabetes tipo 2, aunque en este último caso, la glucemia no experimenta una reducción como en los anteriores grupos, y la reducción de glucemia que se da es pequeña (Johnston y Gaas, 2006).

4.2 HARINA DE GRILLO

Alrededor del mundo existen muchas especies de insectos que son comestibles, entre estos se encuentran los grillos (Magara et al., 2021). Los grillos, tienen un gran potencial como alimento, puesto que ocupan muy pocos recursos para su cría, en relación a otros animales como es el caso de pollos, ganado vacuno u ovino (Magara et al., 2021). Adicionalmente estos pueden ser recolectados, porque en muchos lugares son una plaga, aunque se debe tener mucho cuidado con esto, puesto que entre los efectos adversos y precauciones que presenta el consumo de grillos, se encuentra la transmisión de bacterias como es el caso de las enterobacterias, además que ciertas moléculas se pueden bioacumular si el grillo las ha consumido en su dieta, como es el caso de metales pesados o glucósidos cianogénicos, estos riesgos se puede prevenir si el grillo ha sido criado adecuadamente, aunque un riesgo que no se puede prevenir es que ciertas personas pueden desarrollar alergias hacia los grillos (Magara et al., 2021).

El uso de grillos para alimentación humana o animal aporta grandes beneficios, esto se da debido a que los grillos son una gran fuente de proteína, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y lípidos, donde se incluye ácidos grasos poliinsaturados y también los ácidos grasos monoinsaturados (Magara et al., 2021). En humanos además si son preparados de ciertas formas aportan con beneficios medicinales al ayudar a controlar la fiebre y promover un desarrollo mental saludable (Magara et al., 2021). En el sector agropecuario pueden sustituir la fuente de alimentación de animales que se crían con fines de producción de alimento para humanos, de una manera muy positiva (Magara et al., 2021).

Quinteros (2021) ha estudiado las propiedades de las proteínas de los grillos (*Gryllus assimilis*) y reportó que posee una actividad antiinflamatoria, además de una actividad antioxidante. Adicionalmente, la harina de grillos tiene un gran potencial como prebiótico, puesto que en el intestino humano puede incrementar la bacteria *Bifidobacterium animalis* en una cantidad de 5,7 veces (García et al., 2021). Los prebióticos son alimentos (generalmente con alto contenido de fibra) que actúan como nutrientes para la microbiota humana (National Institutes of Health, 2022).

4.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis puede vivir naturalmente en el intestino, en un estudio se comprobó que esta bacteria si es consumida por 6 semanas diariamente en una concentración de 2×10^9 CFU BS50 va a contribuir en mejorar la salud intestinal (Garvey et al., 2022). En el estudio de Garvey et al. (2022) se ha evidenciado que *Bacillus subtilis* contribuye a la reducción de gases, eructos e hinchazón. En este mismo estudio, se comprobó que el consumo de BS50 no ocasionó ningún cambio clínico en los participantes.

Bacillus subtilis tiene una gran importancia en el sector agropecuario. En el caso de la acuicultura, cuenta con una gran cantidad de aplicaciones como es el caso de ser usado

como probiótico para distintas especies de peces, puesto que puede inhibir ciertas bacterias (Gutiérrez, 2021). Se puede dar la inhibición de *Aeromonas hydrophila* luego de un periodo de 24 horas por *Bacillus subtilis* que fue aislado del contenido intestinal de *Cyprinus carpio* (Gutiérrez, 2021). Además, *Bacillus subtilis* puede modular la producción de citoquinas (Gutiérrez, 2021). En otro ámbito de la producción animal, en el caso de los lechones en ciertos casos pueden ser tratados por *Bacillus subtilis* y por otras bacterias del género *Bacillus*, y experimentarán una mejoría similar a la que tendrían si se utiliza productos químicos (Yue et al., 2020).

Bacillus subtilis al igual que otras bacterias probióticas, pueden producir ciertos neurotransmisores que incluyen la serotonina, la dopamina, la norepinefrina, la catecolamina y la acetilcolina como es el caso de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* (Aggarwal et al., 2022). Se ha llegado a determinar que los postbióticos, metabolitos producidos por los probióticos, producidos por *Bacillus subtilis*, tienen beneficios para aves como pollos (Fang et al., 2024). En este sentido se ha beneficiado el rendimiento de carne y el crecimiento de los pollos (Fang et al., 2024). Adicionalmente se da una reducción de la cantidad de *Salmonella* que el pollo excreta y también se da una reducción de la cantidad de amoníaco que emite (Fang et al., 2024). *Bacillus subtilis* puede producir una gran cantidad de enzimas, algunas de estas enzimas son proteasas, alfa-amilasas, beta-mananasas y enzimas pectinolíticas (Yue et al., 2020).

4.4 ELABORACIÓN DE LA MEZCLA PROBIÓTICA

Para la elaboración de la mezcla probiótica, el fundamento de la técnica se basa en el proceso que se describe a continuación.

Preparar el vinagre y adicionarle un 4% de harina de grillos en relación al vinagre. Se procede al tratamiento físico, mismo que consiste en moverlo a 120 rpm (revoluciones por

minuto), y en simultáneo se aumenta la temperatura gradualmente y debe alcanzar los 90 grados centígrados en 15 minutos (Puede haber una variación de 5 grados en este proceso). Una vez que ha alcanzado los 90 grados centígrados se deja de incrementar la temperatura y se mantiene la temperatura estable en 90 grados centígrados y se continua con la agitación a 120 rpm, por 5 minutos, una vez finalizados los 5 minutos se deja de aplicar calor y también se para la agitación.

Una vez que este a temperatura ambiente se inocula los microorganismos, de preferencia 4% de solución salina con microorganismos en una concentración de 0,5 McFarland.

Para la experimentación se analizó la efectividad de la mezcla probiótica con 3 distintos tipos de vinagre, que corresponderían a 3 distintos tratamientos, donde en el tratamiento 1 es empleando vinagre de manzana, en el tratamiento 2 es empleando vinagre blanco y el en tratamiento 3 consiste en el uso de vinagre balsámico.

Para el tratamiento 1 se usa en 50 mL de vinagre de manzana, se adiciona un 4% de harina de grillos en relación al vinagre, en este caso 2 gramos. Se procede al tratamiento físico, se agita a 120 rpm la mezcla de vinagre de manzana con harina de grillos, y en simultáneo se aumenta la temperatura gradualmente y debe alcanzar los 90 °C en 15 minutos. Una vez que ha alcanzada esta temperatura se deja de incrementar la temperatura y se mantiene la temperatura estable en 90 °C y se continua con la agitación a 120 rpm, por 5 minutos, una vez finalizados los 5 minutos se deja de aplicar calor y también se detiene la agitación.

Una vez que este a temperatura ambiente se inoculan los microorganismos, en este caso 2 mL de solución salina en una concentración de 0,9% con *Bacillus subtilis* en una concentración del 0,5 McFarland.

En el tratamiento 2 se utiliza 50 mL de vinagre blanco y en el tratamiento 3 se utiliza 50 mL de vinagre balsámico. Y se procede de la misma manera que en el tratamiento 1.

4.5 BACTERIAS PATÓGENAS

Se seleccionó las bacterias *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis ATCC 3065 y *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407. *Salmonella* Enteritidis pertenece a la familia Enterobacteriaceae es un bacillo gramnegativo, anaerobio facultativo, no esporulado, de flagelos peritricos, no fermentador de la lactosa (Alcocer, 2024). *Salmonella* posee 3 distintos tipos de antígenos, entre estos se encuentra el antígeno O que corresponde al lipopolisacárido, y es el antígeno más variable entre los distintos tipos de serotipos de *Salmonella*, el antígeno H que corresponde al tipo de flagelo y el antígeno Vi, que corresponde a la cápsula. Este se encuentra en pocos serotipos de *Salmonella* (Madigan et al., 1999). *Salmonella* Enteritidis es una bacteria patógena que causa salmonelosis en humanos (Mughini-Gras et al., 2018). A través del consumo de alimentos contaminados con este serotipo. La carne de pollo y los huevos son los alimentos mayormente involucrados en los casos de salmonelosis. (Bahramianfard et al., 2021).

Se ha determinado que más del 80% de los brotes causados por los serotipos Enteritidis, Heidelberg y Hadar, tienen relación con distintos productos avícolas incluidos huevos y la carne de aves de corral (Aljahdali et al., 2020). La prevalencia de *Salmonella* a nivel mundial en distintos tipos de productos avícolas, en promedio, registra en pollos de engorde 40,5%, en carne de pollo cruda 30% y en huevos y gallinas ponedoras 40,5% (Castro-Vargas et al., 2020). Salmonellosis puede destruir ciertas células en su huésped, por ejemplo, los macrófagos (Bahramianfard et al., 2021). Las infecciones en algunos casos pueden variar desde problemas como gastroenteritis leve a problemas de mortalidad que pueden estar asociados a infecciones sistémicas (Bahramianfard et al., 2021). Las infecciones ocasionadas por *Salmonella* Enteritidis en algunos casos puede llegar a

incrementar el riesgo del desarrollo de cáncer de colon (Mughini-Gras et al., 2018). También se conoce ciertos mecanismos genéticos involucrados en la colonización de *Salmonella* en el huésped, por ejemplo, el sRNA PinT en *Salmonella* se encarga de regular la expresión génica para promover una etapa de la transición de invasión hacia la supervivencia intracelular (Cao et al., 2023).

Infecciones con *Salmonella* Enteritidis puede alterar la microbiota del intestino, por ejemplo, infecciones en el tracto gastrointestinal de pollos, puede aumentar los miembros de la familia Enterobacteriaceae (Aljahdali et al., 2020). El aumento del número de miembros de Enterobacterias se dio porque los órdenes Clostridiales, Lactobacillales y Bifidobacteriales presentaron una disminución en su abundancia relativa (Aljahdali et al., 2020).

Las bacterias del género *Salmonella* presentan un peligro debido a la resistencia a los antimicrobianos, por ejemplo, hay un aumento en las variantes de *Salmonella* Typhi en lugares como África y Asia que presentan resistencia a cierto tipo de antibióticos (Marchello et al., 2020). Además, se ha podido evidenciar que las cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples drogas (MDR) provienen: principalmente, de fuentes avícolas (Castro-Vargas et al., 2020).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa (Reynolds y Kollef, 2021). Pertenece a la familia Pseudomonadaceae (Yauri, 2009). Algunas de sus características son que posee flagelos polares y no produce esporas (Madigan et al., 1999). *Pseudomonas aeruginosa* fue seleccionada porque es una bacteria que puede ocasionar muchos problemas de salud, por ejemplo, en Estados Unidos se registra una cantidad aproximada de 51 000 infecciones por esta bacteria cada año (Bassetti et al., 2018).

Esta bacteria puede causar enfermedades como la neumonía, infecciones de la piel, además infecciones del tracto urinario (Bassetti et al., 2018). Otro problema consiste en que

algunos casos de infección con esta bacteria pueden dar lugar a una bacteriemia (Bassetti et al., 2018). Hay muchas personas que son portadoras sanas de *Pseudomonas aeruginosa*, llegando a cifras de portadores sanos de aproximadamente el 24% que contiene esta bacteria en sus intestinos y un 7% que es portador de la bacteria en distintas partes del cuerpo, como es el caso de la piel, la garganta y en la mucosa nasal (Milagro, 2012). Esta bacteria puede ser multirresistente a varios antibióticos, de esta manera ocasiona un aumento de la mortalidad (Milagro, 2012). El uso de ventiladores en hospitales puede ser una forma de transmisión, además las personas que se han realizado un trasplante tienen un mayor riesgo de infección por *Pseudomonas aeruginosa* y también un mayor riesgo de tener resultados adversos (Reynolds y Kollef, 2021). La neumonía ocasionada por *Pseudomonas aeruginosa*, puede tener síntomas más graves, en el caso de ser portador de *Klebsiella pneumoniae* en el intestino (Le Guern et al., 2023).

En *Pseudomonas aeruginosa* se conoce ciertos mecanismos genéticos que están involucrados en los procesos infecciosos, por ejemplo, el ARNs SicX que se encarga de la transición de infección crónica a infección aguda (Cao et al., 2023). Este ARNs se ve influenciado por la presencia de oxígeno (Cao et al., 2023). Las infecciones que son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y se tratan con fagos, en muchos casos se da la administración en conjunto de los fagos con antibióticos; sin embargo, no se logra erradicar la bacteria, pero sí controlar la infección (Köhler et al., 2023).

4.6 FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Posteriormente a la reactivación de las bacterias *Salmonella* Enteritidis y *Pseudomonas aeruginosa*, se identificaron a través de medios selectivos diferenciales y pruebas de bioquímica. Además, a *Bacillus subtilis*, microorganismo usado en la mezcla probiótica.

4.6.1 Identificación de *Salmonella* Enteritidis

Agar entérico de Hektoen: Este es un medio selectivo diferencial usado para pocas bacterias entéricas (Difco, 1984). Se fundamenta en su composición, la cual contiene sustancias que inhiben a las bacterias, pero solo parcialmente a bacterias como *Shigella* y *Salmonella* (Difco, 1984). La inhibición de estas bacterias no es muy grande porque cuenta con una gran cantidad de peptona y carbohidratos (Difco, 1984). Actúa como un medio diferencial, porque permite la diferenciación de distintas cepas bacterianas, por ejemplo, las bacterias que producen sulfuro de hidrógeno, tendrán una coloración negra porque el medio contiene tiosulfato y también citrato amónico férrico, ocasionado que se dé una reacción, la cual produce el color negro (Difco, 1984). En este medio en función de la coloración de las bacterias se puede identificar a que pertenece, en el caso de *Salmonella* su aspecto más común es de color verde-azul, y generalmente tiene un centro negro, producto de la formación de sulfuro de hidrógeno (Difco, 1984). El tiempo de cultivo en el caso de *Salmonella* es de 24 horas (Difco, 1984).

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de *Salmonella* fueron agar triple azúcar (TSI), fenil alanina (FA), caldo úrea (U), agar citrato de Simmons (CIT), Rojo de metilo (RM) y Voges Proskauer (VP); se detallan a continuación:

Triple Sugar Iron (triple azúcar, TSI): Esta prueba emplea varios indicadores para detectar las moléculas que se han producido como consecuencia del metabolismo bacteriano (Alcocer, 2024). Por ejemplo, el indicador rojo fenol producirá un cambio de color a amarillo por la producción de ácidos por la fermentación de azúcares, mientras que se producirá un color rojo si se da una alcalinización (Alcocer, 2024). Este medio contiene 3 distintos tipos de azúcares que son la glucosa, la lactosa y la sacarosa (Alcocer, 2024). En función del metabolismo del microorganismo se pueden dar 3 variables, si se da solo fermentación de la glucosa es (alcalino (k)/ ácido (A)), si se da la fermentación de los 3 tipos de azúcares que

contiene se produce (ácido/ácido) y si no se da la fermentación de estos azúcares se obtiene un resultado (alcalino/alcalino) (Alcocer, 2024). Es posible observar una coloración negra, en el caso de que la bacteria produzca Sulfuro de Hidrógeno, el cual reaccionará con el Sulfato ferroso que está presente en el medio, tornándolo a una coloración negra (Alcocer, 2024).

Fenilalanina: Este es un medio que contiene el aminoácido Fenilalanina, y la finalidad de esta prueba consiste en ver el metabolismo que ejerce sobre la fenilalanina (Alcocer, 2024). Para lograr determinar esto se realiza el inóculo de la bacteria en este medio y posteriormente se coloca cloruro férrico, con lo cual, mediante cambios en la coloración, específicamente si desarrolla un color verde oscuro indica que se dio una desaminación de la fenilalanina, en cambio en caso de no observarse un cambio en la coloración indicaría que la prueba es negativa y no se dio la desaminación de la fenilalanina (Alcocer, 2024).

Caldo urea: La urea es la única fuente de carbono que contiene este medio para determinar si el microorganismo puede utilizar la urea como fuente de carbono (Alcocer, 2024). Para esto el microorganismo debe contar con la enzima ureasa (Alcocer, 2024). En caso de que, sí utilice la urea, en este medio se producirá una coloración roja, lo cual indica que la prueba es positiva para la enzima ureasa. Por otro lado, si mantiene su coloración original que es amarilla, indicaría que no posee la enzima ureasa y la prueba es negativa para esta enzima (Alcocer, 2024).

Citrato de Simmons: Esta prueba bioquímica consiste en un medio que contiene citrato y también sales de amonio (Alcocer, 2024). El mecanismo de esta prueba consiste en determinar si el microorganismo posee la enzima citratasa, con la cual puede degradar al citrato, se obtiene dos moléculas que son el piruvato y el dióxido de carbono. Los microorganismos que pueden usar el citrato como fuente de carbono, también pueden utilizar las sales de amonio, pero en este caso esta sal sería usada como fuente de Nitrógeno, a partir del metabolismo de esta sal se obtiene NH_3 (Alcocer, 2024). Con la obtención de

amoníaco se produce una alcalinización del medio, que se evidencia por la presencia de un indicador de pH el azul de bromotimol, que hace que cambie el color del medio de verde a color azul. Este resultado indicaría que la prueba fue positiva para la enzima citratasa (Alcocer, 2024). En el caso de que el medio mantenga su color original que en este caso es verde, la prueba sería negativa para la enzima citratasa (Alcocer, 2024).

Rojo de metilo y Voges Proskauer (RM/VP): El fundamento de estas pruebas bioquímicas de identificación se basan en los productos del metabolismo que presentan las bacterias (Alcocer, 2024).

En la fermentación ácido mixta de la glucosa se producen productos ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético, láctico y succínico) en consecuencia se da un fuerte descenso del pH inicial del medio (Alcocer, 2024). Este cambio, se puede detectar por el viraje del indicador de rojo de metilo que permanece amarillo por encima de pH 5,1 y rojo por debajo de 4,4 (Alcocer, 2024). Para revelar esta prueba se colocan 2 a 3 gotas de rojo de metilo, observando inmediatamente un color rojo que indica una prueba positiva y un color amarillo que indica una prueba negativa (Alcocer, 2024).

En la fermentación butilén glicólica de la glucosa se producen productos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoina como intermediario (Alcocer, 2024). La acetoina puede ser detectada añadiendo al medio KOH y alfa-naftol que reaccionarán con este compuesto produciendo un color rojo característico (Alcocer, 2024). Al realizar la prueba Voges-Proskauer (VP) usando el reactivo de Barrit, inicialmente hay oxidación de la acetoina en la presencia de α -naftol, KOH 40% y el oxígeno atmosférico en diacetil, que representa el reactivo colorido en la prueba del VP (Alcocer, 2024). En la segunda etapa, el diacetil se une al núcleo guanidínico de la arginina y el α -naftol con la producción de una coloración roja indicativa de la prueba positiva (presencia de acetoina) (Alcocer, 2024). Después de este período, para la prueba de VP, adicionar 0,6mL de la solución de α -naftol 5% y agitar,

enseguida, adicionar 0,2mL de la solución de KOH 40%. Dejar descansar y observar periódicamente, hasta por una hora (Alcocer, 2024). En la prueba positiva se desarrolló un color rojo o rosa en el medio de cultivo y en la prueba negativa permanece el color del reactivo amarillo o ligeramente verdoso (Alcocer, 2024).

Sulfuro indol y movilidad (SIM): El fundamento de este medio se da por su composición, la cual consiste en tiosulfato sódico, el cual contribuye para determinar si hubo producción de sulfuro de hidrógeno (Difco, 1984). En este medio es posible observar si los microorganismos presentan motilidad, esto se lo puede realzar observando si hay turbidez en partes del medio, excluyendo a la línea de inoculación, además en algunos casos es posible observar producción de sulfuro de hidrógeno, fuera de la línea de inoculación, como es el caso de organismos móviles (Difco, 1984). En este medio se puede detectar la presencia de indol. Para la detección del indol se usa el reactivo de Kovacs, el cual se torna de color rosa o rojo, en el caso de producción de indol (Difco, 1984). Las bacterias entéricas deben permanecer en incubación a 37 grados en este medio por un periodo de tiempo de 18 a 24 horas (Difco, 1984).

Motilidad indol lisina (MILI): En este medio se puede determinar la habilidad enzimática de un determinado microorganismo en descarboxilar el aminoácido lisina con alcalización del medio de cultivo por la formación de una amina (Difco, 1984). La descarboxilación se trata de un proceso en el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas, pueden actuar en los grupos carboxilo-terminal (-COOH) de los aminoácidos produciendo una amina o diamina y dióxido de carbono (Alcocer, 2024). Microorganismos que poseen la enzima lisina descarboxilasa pueden descarboxilar la lisina, produciendo amina Cadaverina (Alcocer, 2024). Este proceso ocasionará un viraje al violeta del indicador de pH púrpura de bromocresol (Alcocer, 2024). Se debe producir previamente la acidificación del medio de cultivo, puesto que la descarboxilación solo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6.0), esto es posible por la fermentación de la glucosa (Alcocer, 2024). Un viraje al amarillo

en la totalidad del medio de cultivo, se puede dar por microorganismos lisinadescarboxilasa-negativos, pero fermentadores de la glucosa (Alcocer, 2024). Este medio tiene como finalidad evidenciar la movilidad del microorganismo, determinar la capacidad del microorganismo en producir indol a partir del triptófano y la capacidad enzimática de descarboxilar el aminoácido lisina, en el caso de que la prueba tenga un resultado positivo se desarrolla un color púrpura y en el caso de que la prueba tenga un resultado negativo se desarrolla un color amarillo, esta prueba se lee en los dos tercios inferiores (Alcocer, 2024).

Además, en este medio se determina la movilidad, producción de indol. La movilidad se indica por la turbidez del medio o por un crecimiento, el cual se extiende desde la línea de inoculación. Para la prueba del indol, se añadieron 3 a 4 gotas de reactivo de Kovacs en la parte superior del cultivo. La aparición de un color rosa a rojo en el reactivo se interpreta como una prueba positiva para la producción de indol (Difco, 1984).

4.6.2 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Medio Cetrimide: Este medio contiene cetramida que es la molécula bromuro de cetiltrimetilamonio (Difco, 1984). La cetramida cumple la función de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas que no sean *Pseudomonas aeruginosa*, esto lo realiza dado que ocasiona la liberación de fósforo y también de nitrógeno de las bacterias que no son *Pseudomonas aeruginosa* (Difco, 1984). Adicionalmente a este medio para su preparación se le debe adicionar glicerol (Difco, 1984). El tiempo de cultivo en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* es de 24 horas (Difco, 1984).

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación *Pseudomonas aeruginosa* se detallan a continuación:

Medio basal para oxidación y fermentación: Esta prueba se fundamenta en la capacidad de un organismo para producir ácido en su fermentación o en procesos oxidativos en presencia de oxígeno (Difco, 1984). Para esto se emplea dos tubos con este medio y en uno de ellos se le cubre con una sustancia para evitar que, entre oxígeno, en el presente caso se empleó 1 ml de glicerol (Difco, 1984). Para observar las distintas reacciones que se pueden producir una vez que se ha preparado el medio, se le coloca una solución del tipo de carbohidrato que se quiere evidenciar si produce la oxidación y la fermentación o solo la oxidación, para colocar este carbohidrato una vez que se tiene preparada la solución, se la pasa por un microfiltro y se la coloca en el medio (Difco, 1984). Posterior a esto se puede observar si ocurrió una reacción ácida, una reacción en la que se produzca gas y ácido, o a su vez si no hubo reacción o si esta fue alcalina (Difco, 1984).

El medio para movilidad, indol y ornitina (MIO) Identifica bacterias de acuerdo a su movilidad, deaminasa de ornitina e indol (Difco, 1984). La reacción de ornitina se la puede evidenciar mediante un color púrpura en todo el medio en consecuencia a que el organismo fermenta la dextrosa de la fórmula reduciendo su pH (Difco, 1984). Esta condición ácida origina que el indicador de pH, púrpura de bromo cresol, se vuelva amarillo y proporcione condiciones óptimas para la descarboxilación de la ornitina presente en la fórmula (Difco, 1984). Si ocurre esta reacción el pH sube en respuesta a la alcalinización y como resultado el indicador se vuelve púrpura, lo cual indica un resultado positivo (Difco, 1984). Los cultivos negativos a ornitina producen un tubo amarillo que puede ser morado en la parte superior (Difco, 1984).

La identificación fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa* se la puede confirmar, mediante el crecimiento en caldo BHI a 43 °C por 24 horas. El crecimiento a 43 °C se lo considera positivo cuando se observa turbidez en el caldo o en la superficie del tubo (Yauri, 2009).

Así como el TSI, el SIM y MILI descrito en el 4.6.1

4.6.3 Identificación de *Bacillus subtilis*

Para la identificación de *B. subtilis* se usó como medio selectivo diferencial el agar seg Mossel y las pruebas bioquímicas de reducción de nitratos a nitritos, agar gelatina, agar almindón y tioglicolato.

Agar selectivo seg Mossel: Este medio es selectivo diferencial, selectivo porque contiene Polimixina B que inhibe el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra y favorece el aislamiento selectivo de *Bacillus*. Además, es diferencial porque contiene manitol. Las bacterias fermentadoras de manitol, acidifican el medio produciendo el viraje del indicador de pH rojo de fenol de rojo a amarillo, como es el caso de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, las bacterias que no lo fermentan, producen colonias del color del medio, como es el caso de *Bacillus cereus*. A este medio se adiciona emulsión de yema de huevo, que mejora el aislamiento de *Bacillus*, además favorece y facilita la visualización de las colonias de *Bacillus cereus* ya que se produce un halo de precipitación de la lecitina hidrolizada, por acción de la lecitinasa, alrededor de las mismas. Las colonias de *Bacillus subtilis* no forman halo de precipitación (Laboratorios Britannia s,a, s.f.).

Caldo con nitrato: Esta prueba tiene su fundamento en la capacidad de ciertos microorganismos de reducir el nitrato a nitrito (Difco, 1984). Por lo que en su composición esta prueba contiene nitrato potásico (Difco, 1984). Esta reacción se la puede observar añadiendo alfa-naftilamina, el cual va a reaccionar en el caso de que haya habido una producción de nitrito y se tornará el medio de amarillo a un color rojo o rosa (Difco, 1984). En el caso de que sí se de este cambio de coloración luego de añadir alfa-naftalina indica que la prueba es positiva, si no se observa el cambio de coloración, la prueba es negativa (Difco, 1984). El tiempo que se deje en incubación el medio, puede variar en función del

microorganismo del que se cree se puede tratar, esto se da porque en tiempos cortos puede darse esta reducción e incluso se puede reducir a otras formas como es el caso del amoníaco o el nitrógeno gaseoso, si esto se produce el indicador ya no tornará el medio a color rojo (Difco, 1984).

Gelatina nutritiva: Este es un medio que en su composición contiene gelatina (Difco, 1984). La gelatina tiene la función en este caso de ayudar a determinar si la bacteria que se está analizando puede licuar la gelatina (Difco, 1984). Esta licuefacción se da por medio de reacciones enzimáticas (Difco, 1984). La licuefacción de la gelatina es visible a simple vista sin la necesidad del uso de indicadores (Difco, 1984). En este caso se inoculó el microorganismo y se dejó a temperatura ambiente (Difco, 1984). Adicionalmente se puede incubar este medio a temperaturas superiores de 22 °C, pero en este caso se requerirá de una prueba sin inóculo, para que cuando finalice el periodo de incubación se enfríe el medio a temperaturas inferiores de 22 grados centígrados y con esto se puede comparar con el medio que no tenía inóculo y de esta forma se determina si hubo licuefacción de la gelatina (Difco, 1984).

Tioglicolato: Este medio contribuye a la identificación del tipo de respiración que presentan las bacterias (Difco, 1984). La respiración bacteriana puede ser identificada gracias a la resazurina, que se encuentra presente en este medio (Laboratorios Britannia s,a, s.f.). “La resazurina es el indicador de óxido-reducción. En presencia de oxígeno es de color rosado-fucsia y es incoloro en ausencia de oxígeno” (Laboratorios Britannia s,a, s.f.). “El bajo contenido de agar (0,75%) le otorga la propiedad de ser un medio fluido y retarda la dispersión de CO₂ y O₂. Debido a todas estas características desarrollan microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos” (Laboratorios Britannia s,a, s.f.). *Bacillus subtilis* es aerobio estricto y se evidenciará crecimiento en la parte superficial del medio de cultivo (Difco, 1984).

Agar con almidón: Esta prueba tiene su fundamento en su composición la cual incluye almidón (Difco, 1984). Debido a esta composición, se puede inocular microorganismos y es posible determinar si hubo una hidrólisis de almidón (Difco, 1984). Para determinar esto, una vez que se ha realizado el inóculo y ya ha transcurrido el periodo de incubación, se coloca yodo, y en base a cambios de coloración del medio se determina si hubo o no el proceso de hidrólisis del almidón (Difco, 1984). Para esto, un resultado positivo se evidencia una vez que se ha colocado el yodo y si en los lugares donde están las colonias bacterianas no se observa un cambio de coloración, pero en otros lugares donde no se inoculó el microorganismo se observa un cambio en la coloración tornándose a un tono púrpura o azul, se trata de un resultado positivo (Difco, 1984). Mientras que si se observa un cambio de coloración azul o púrpura la prueba tiene un resultado negativo (Difco, 1984).

Para las identificaciones bacterianas, se obtuvieron los siguientes resultados, en el caso de *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, si se logró observar un crecimiento en el medio Hektoen, que coincide con lo planteado en la literatura sobre la morfología que presentan las colonias bacterianas. Esto consiste en un cambio en la coloración del medio a un tono verde-azulado, y además en las colonias se las veía de un color negro, debido a la producción de H_2S .

Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas y se obtuvieron los siguientes resultados. En el caso del medio TSI, se observó producción de gas, al igual que hubo producción de H_2S y también el resultado de la lectura fue alcalino/ácido. En el caso de la prueba Sulfuro Indol Motilidad (SIM), se obtuvo un resultado positivo para la Motilidad y la producción de H_2S y negativo para la prueba de producción de indol. En la prueba de Fenilalanina, se obtuvo un resultado negativo, así como para la urea. La prueba de lisina fue positiva. La prueba fue positiva en el caso de Rojo de metilo posterior a la adición del reactivo rojo de metilo y en el caso de la prueba Voges Proskauer, posterior a la adición de 0,6 mL de la solución de alfa-naftol en una concentración del 5% y a la adición inmediata de 0,2 mL de

la solución de KOH al 40%, se obtuvo un resultado negativo. Finalmente se obtuvieron resultados negativos para la prueba de Citrato de Simmons (Figura 1).



K/H₂S+ CIT + Mot+ Lis + RM+ VP+ UREA - FA -
Gas+ H₂S+ Indol -



Figura 1: Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación se *Salmonella*

Enteritidis. **A** Bioquímica representativa de *Salmonella* Enteritis y **B.** Bioquímica de *Salmonella* Enteritis ATCC 3065 usada en este estudio.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407, se obtuvo el crecimiento esperado en el medio Cetrimide, donde se observó un cambio en la coloración del medio, pasando de un color blanco a un color verde. Por consiguiente, se pudo evidenciar que la

bacteria que creció era *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407.

Se realizaron algunas pruebas bioquímicas y se logró obtener los siguientes resultados. En el caso del medio TSI, se obtuvo que es lactosa negativa y no se produjo sulfuro de hidrógeno; por lo tanto, fue H₂S negativa, con una lectura alcalino/alcalino, en las pruebas de oxidación se tuvo un resultado positivo y en el caso de la prueba de fermentación se obtuvo un resultado negativo. En la prueba Sulfuro Indol Motilidad se obtuvo un resultado negativo para H₂S, negativo para indol, pero si se obtuvo un resultado positivo para la motilidad. Adicionalmente se realizó la prueba para determinar la presencia de oxidasa, en la cual se obtuvo un resultado positivo. En la prueba del MILI y el MIO se obtuvieron resultados positivos así como en la prueba de crecimiento a 43 °C (Figura 2).

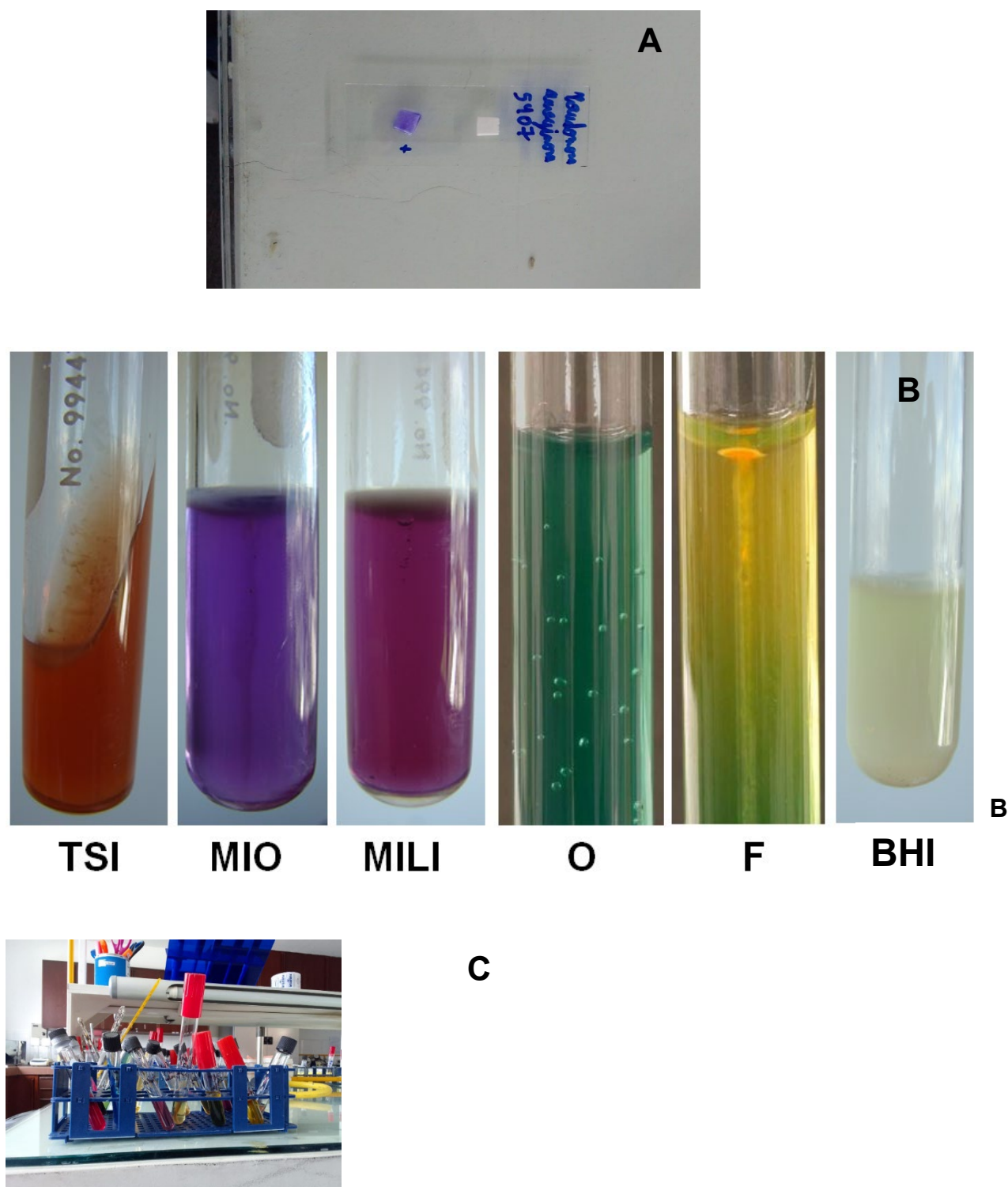


Figura 2 Pruebas de identificación para *Pseudomonas aeruginosa*.

A, oxidasa positiva; **B**, identificación bioquímica representativa: TSI, triple azúcar y hierro con producción de H_2S , producción de gas a partir de glucosa, producción de ácido a partir de lactosa negativas; MIO, motilidad indol ornitina con motilidad positiva, indol negativo y ornitina descarboxilasa positiva; MILI, motilidad indol lisina con motilidad positiva, indol negativo y lisina descarboxilasa positiva; O, oxidación de glucosa positiva; F, fermentación de glucosa negativa; BHI, infusión cerebro-corazón con crecimiento positivo a $43^\circ C$ por 24 horas. **C**, prueba con *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 usada en este estudio.

Bacillus subtilis en el medio seg Mossel resultó manitol positivo, con presencia de colonias amarillas sin halo de precipitación. Se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación correspondientes y se obtuvieron los siguientes resultados: gelatinasa positivo, en el medio gelatina nutritiva, donde se evidenció hidrólisis de la gelatina. En el agar con almidón se obtuvo un resultado positivo, con hidrólisis del almidón, posterior a la colocación de lugol. En la prueba de nitrato, se obtuvo un resultado positivo, tornándose a un color rojizo, posterior a la colocación de alfa-naftilamina. En el caso de la prueba Sulfuro Indol Motilidad, se obtuvo un resultado positivo para la Motilidad, negativo para la producción de H_2S y también para la producción de indol. Se obtuvo un resultado positivo, en el caso de la prueba Rojo de metilo y Voges Proskauer (RM/VP), posterior a la adición de los reactivos rojo de metilo en el caso de la primera prueba y la adición de 0,6 mL de la solución de alfa-naftol en una concentración del 5% y a la adición inmediata de 0,2 mL de la solución de KOH al 40%, en el caso de la segunda prueba. Una prueba que fue muy importante para la identificación de esta bacteria, fue la prueba del medio fluido con tioglicolato, en la cual se evidenció una respiración aerobia (Figura 3).

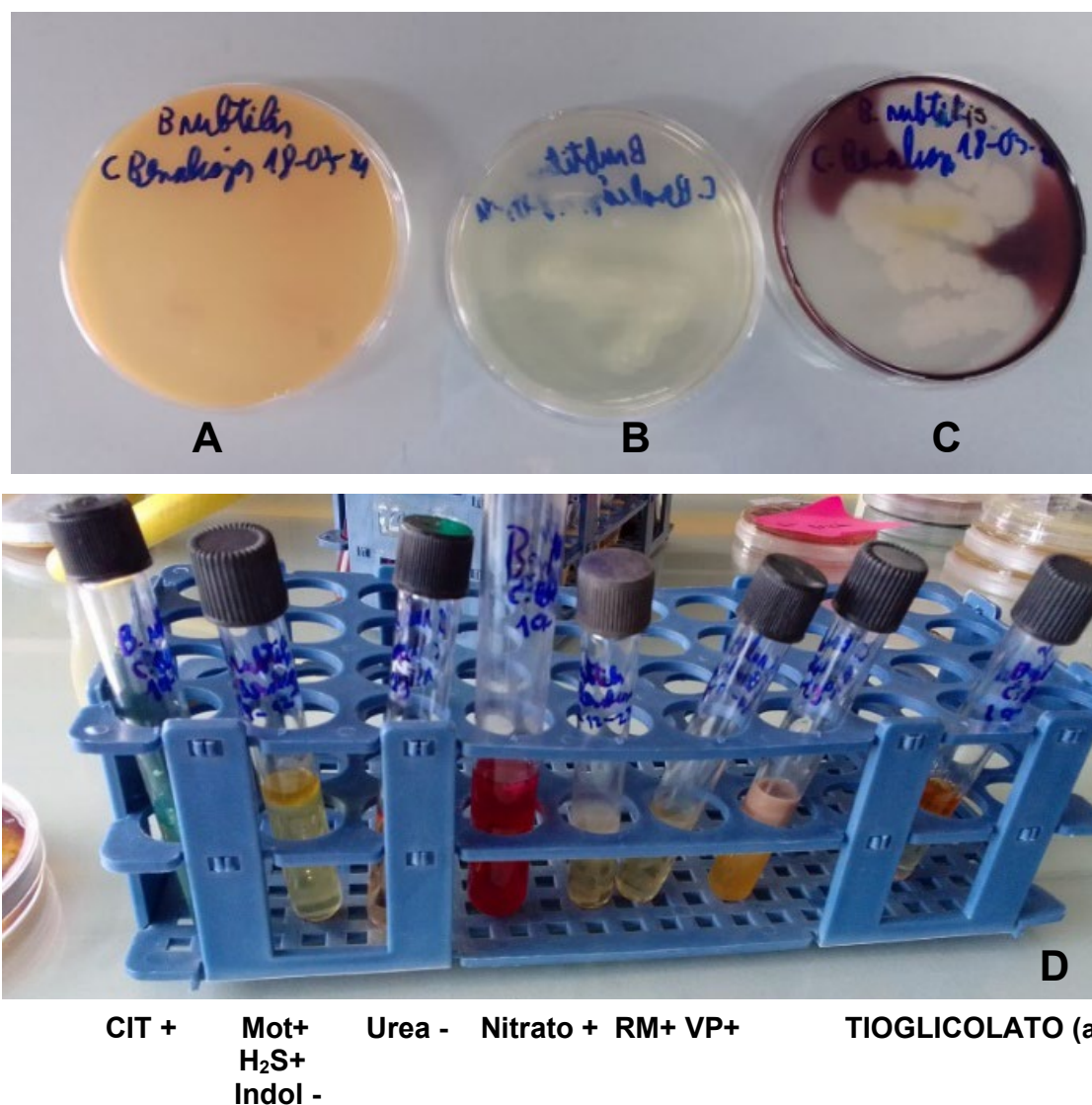


Figura 3. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus subtilis*. **A**, seg Mossel, manitol positivo sin halo de precipitación; **B**, gelatina positiva; **C**, almidón positivo. **D**, Bioquímica de *Bacillus subtilis*.

4.7 ANÁLISIS DE LA PRUEBA IN VITRO

Los patógenos serán inoculados en medio BHI que ha sido modificado con HCl, para alterar su pH y que se obtenga un pH de 6,5, esta modificación se la realizó debido a que el pH del intestino delgado puede variar en un rango de 7,0 a 5,0 en el caso de alpacas (Vásquez et al., 2012). En el caso de humanos el pH del intestino delgado es neutro (García Luna y López Gallardo, 2007). Por lo tanto, este medio ácido simulará parcialmente al intestino de distintas especies. Se inoculará una cantidad de 25 microlitros de solución salina al 0,9% que contiene las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065 en una concentración de 0,5 McFarland. Posteriormente se las incubará por un lapso de 4 a 5 horas y se procederá a agregar la mezcla probiótica en una cantidad de 200 microlitros al BHI que contiene las bacterias patógenas, que en este caso son *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065. Se dejará en incubación durante 18 horas y finalmente se tomará una muestra del BHI para inocularlo en el medio selectivo diferencial de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, para poder determinar si hay presencia o ausencia de las bacterias patógenas (Figura 4).

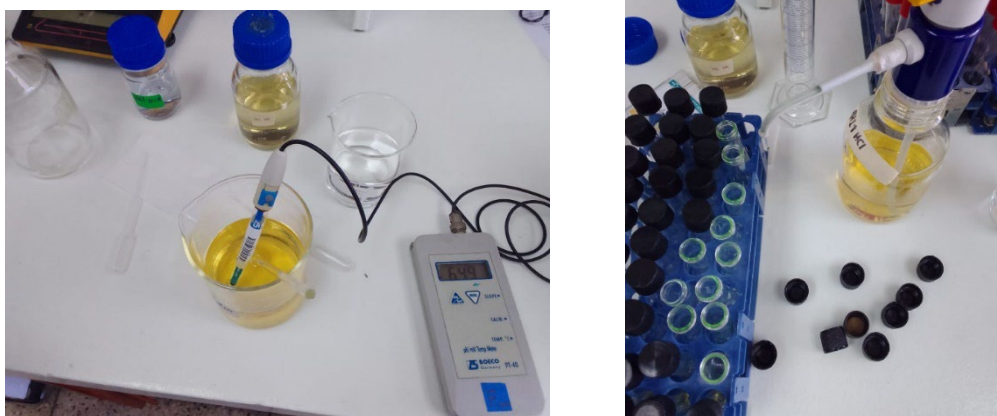


Figura 4: Preparación del BHI ácido

4.8 RESULTADOS y DISCUSIÓN

En el caso de *Salmonella* Enteritidis, se obtuvieron los siguientes resultados. En el tratamiento 1, en el caso de la primera repetición hay poco crecimiento, en la segunda repetición hay un mayor crecimiento y en la tercera repetición no se observa crecimiento. Se puede evidenciar que no se presentó en ningún lugar de la placa de la primera repetición un cambio en la coloración del medio Hektoen, lo cual indicaría que la baja cantidad de bacterias que crecieron, en la segunda repetición se puede observar que en aproximadamente la mitad de la placa bipetri no hubo cambio de coloración y en la tercera repetición si hubo un cambio de coloración.

En el tratamiento 2 se puede observar que en la primera repetición el crecimiento bacteriano es mínimo, sin llegar a superar la mitad de la placa bipetri. En la segunda repetición hay un mayor crecimiento bacteriano, el cuál es superado en la tercera repetición. En el tratamiento 3 se puede observar que en la segunda repetición se da el menor crecimiento bacteriano, seguido por la tercera repetición, donde se observa mayor crecimiento bacteriano, y finalmente la primera repetición es la que presenta el mayor crecimiento bacteriano (Figura 5).

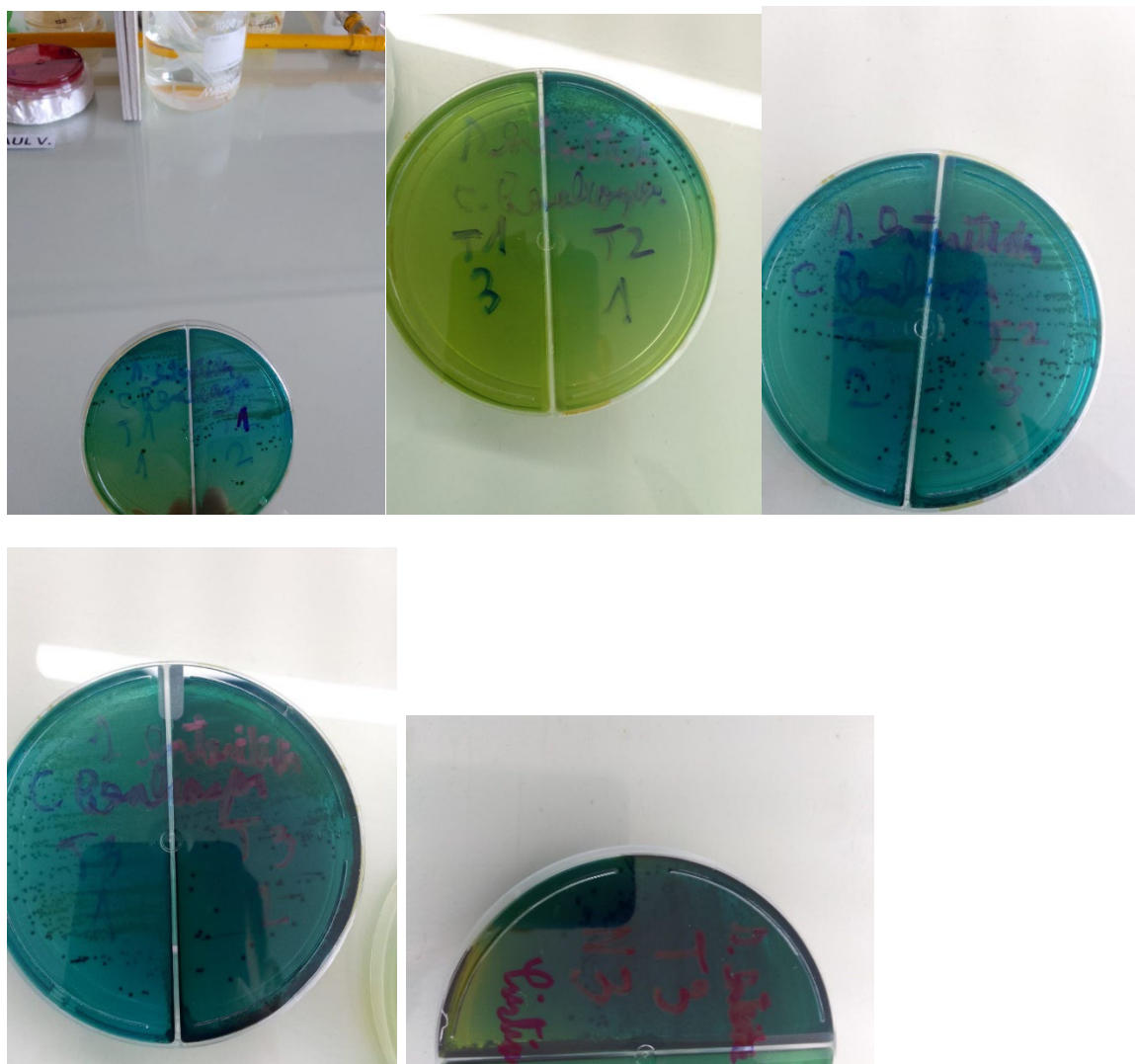


Figura 5: Tratamientos “in vitro” de *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065 en Hektoen

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 se obtuvieron los siguientes resultados. En el tratamiento 1, en el caso de la repetición número 3 no creció *Pseudomonas aeruginosa*, en la segunda repetición se observó un pequeño crecimiento y en la repetición 1 el crecimiento es mínimo. Se puede evidenciar que no se presentó en ningún lugar un cambio en la coloración del medio Cetrimide, lo cual indicaría la baja cantidad de bacterias que crecieron.

En el tratamiento 2 creció en las 3 repeticiones, observándose un menor crecimiento en la segunda repetición en comparación al resto de repeticiones. En la primera y tercera repeticiones se observa un cambio de color en el medio cetrímide, lo que indica que, si hubo un gran crecimiento bacteriano. En la segunda repetición una pequeña región no tiene crecimiento bacteriano en la cual no se observa el cambio de coloración del medio cetrímide.

En el tratamiento 3 creció en las 3 repeticiones es posible observar un menor crecimiento, en el tratamiento 2, pero esta diferencia con la primera y tercera repetición es mínima. En los tres casos se observa un cambio de color en el medio cetrímide, lo que indica que si hubo un gran crecimiento bacteriano (Figura 6).

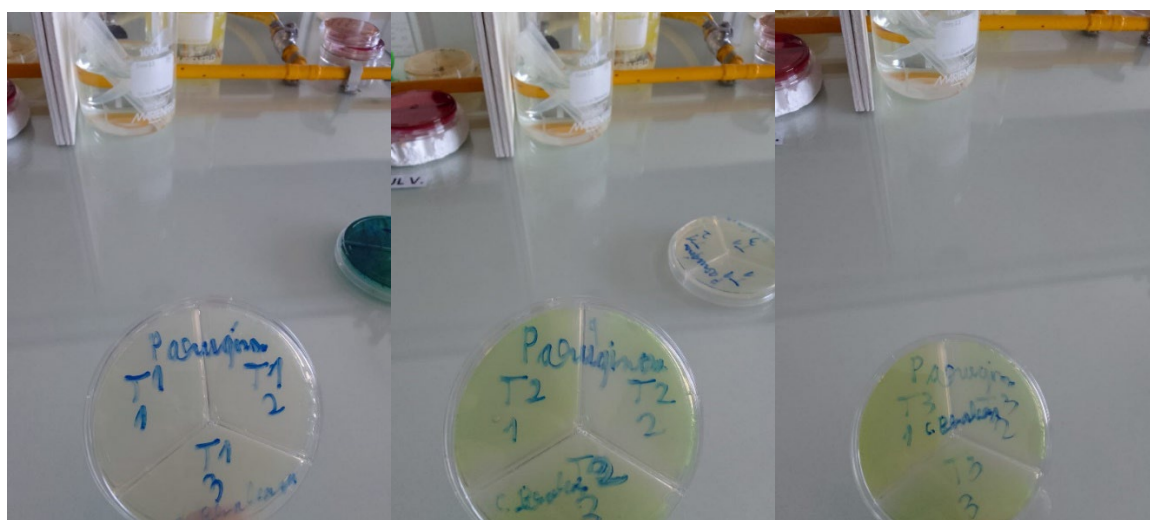


Figura 6: Tratamientos “*in vitro*” de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 en cetrímide.

Posteriormente a la revisión de la bibliografía sobre los componentes de la mezcla probiótica, se pudo evidenciar que los componentes son muy útiles y saludables. En el caso del vinagre, aporta muchos beneficios a la salud, principalmente con pequeñas propiedades

antimicrobianas, reduce el índice glucémico, lo cual es muy importante para la salud, especialmente en personas con tendencia al desarrollo de diabetes y tiene propiedades anticancerígenas (Johnston y Gaas, 2006). Es posible reducir el crecimiento e incluso se puede llegar a inhibir a los patógenos *Macrophomina phaseolina* y *Magnaporthiopsis maydis* que causan problemas en especies de plantas, esta reducción se la puede lograr mediante la aplicación de vinagre de madera, teniendo una concentración ideal de 2% de vinagre de madera para lograr la inhibición.

La harina de grillo aporta muchos beneficios, puesto que contiene muchas moléculas muy importantes, como es el caso de aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados, uno de los beneficios que aporta el consumo de grillos se encuentra el desarrollo mental saludable (Magara et al., 2021). La incorporación de la harina de grillo en esta mezcla contribuye aportando prebióticos, esto se ha evidenciado en el caso de la bacteria *Bifidobacterium animalis* la cual incremento en el intestino de una persona que consumió harina de grillos en una cantidad de 5,7 veces, por lo cual es muy adecuado que se incorpore la harina de grillos en la mezcla, puesto que aporta con muchos nutrientes y tiene este potencial prebiótico (García et al., 2021).

Bacillus subtilis aporta muchos beneficios, esta bacteria puede vivir en el intestino y contribuye mucho a la salud intestinal en humanos (Garvey et al., 2022), y también puede contribuir a la salud mental, puesto que *Bacillus subtilis* contribuye a la producción de neurotransmisores (Aggarwal et al., 2022). En otras especies también hay una gran contribución, por ejemplo, puede ser usada en acuicultura (Gutiérrez, 2021). Además, sus postbióticos producidos son muy importantes, otorgando grandes beneficios a aves de corral entre estos se encuentra el aumento del rendimiento de las aves en lo referente a la carne producida y al crecimiento, y también se obtiene una reducción en sus desechos, principalmente en bacterias del género *Salmonella* y en la cantidad de amoníaco que excreta, lo cual tiene un gran beneficio en el ámbito de la salud (Fang et al., 2024). *Bacillus subtilis*

también tiene grandes aplicaciones en la agricultura, principalmente actuando en la biodisponibilidad de nutrientes que pueden tener las plantas (González-León et al., 2022).

Adicionalmente los componentes de la mezcla probiótica son muy fáciles de elaborar, por ejemplo, en el caso del vinagre existen varios métodos para su producción, y se pueden producir varios tipos de vinagre que pueden variar en función del sustrato del que se inicia la fermentación (Abraham et al., 2022). En el caso de la harina de grillos, aporta múltiples beneficios en su producción, en comparación a la producción de otro tipo de animales, puesto que la producción de grillos requiere menos recursos como es el caso de espacio y alimento, en comparación a otros animales destinados al consumo humano como es el caso de los pollos o el ganado (Magara et al., 2021).

Las bacterias patógenas escogidas fueron adecuadas, puesto que representan un problema para la salud. En el caso de *Salmonella* Enteritidis, puede causar infecciones que generalmente son gastroenteritis, pero estas infecciones, en algunos casos, pueden llegar a convertirse en infecciones sistémicas (Bahramianfard et al., 2021). Las bacterias del género *Salmonella* representan un peligro, puesto que hay una cantidad grande de alimentos que se encuentran contaminados con *Salmonella*, principalmente productos agrícolas, llegando a cifras de contaminación del 40,5% en huevos y gallinas ponedoras (Castro-Vargas et al., 2020). Además, *Salmonella* puede influir de una manera negativa la composición de las bacterias que habitan en el intestino, donde se da una reducción de bacterias como Lactobacillales y Bifidobacteriales y se da un incremento de Enterobacterias (Aljahdali et al., 2020). Además, la exposición a esta bacteria se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad intestinal, como es el caso del cáncer de colon (Mughini-Gras et al., 2018). En base a esta problemática que presentan estas dos bacterias en la salud, se decidió evaluar si la mezcla probiótica puede inhibirlas, para ayudar a tratar este tipo de infecciones, de una forma en que sea un coadyuvante al tratamiento.

De forma similar *Pseudomonas aeruginosa*, puede causar infecciones en distintos tejidos, e incluso puede llegar a causar bacteriemia y hay una gran cantidad de infecciones reportadas por esta bacteria, un ejemplo son las 51000 infecciones por esta bacteria que cada año se da en Estados Unidos, por lo tanto, esta bacteria constituye un problema para la salud (Basseti et al., 2018). Adicionalmente para la neumonía ocasionada por *Pseudomonas aeruginosa*, en distintos tipos de tratamientos como es el caso de la terapia en conjunto empleando el uso de fagos y antibióticos en la mayoría de los casos, no se logra erradicar la bacteria en los pulmones, aunque si se logra calmar la neumonía (Köhler et al., 2023). Además, ciertos organismos probióticos pueden ser empleados para el tratamiento de la neumonía ocasionada por *Pseudomonas aeruginosa*, en ratones se ha evidenciado que *Lactobacillus rhamnosus* puede dar protección frente a una neumonía ocasionada por *Pseudomonas aeruginosa* (Gutiérrez, 2021).

En el caso de *Salmonella* Enteritidis, se realizó la prueba bioquímica de identificación y a partir de los resultados obtenidos, que son en el caso de la prueba de TSI, se observó producción de H₂S, la lectura fue ácido/ácido, y se evidenció que hubo producción de gas. En el caso de la prueba Sulfuro Indol Motilidad, se obtuvo positivo para H₂S y positivo para movilidad, pero negativo para la producción de indol. En la prueba de fenilalanina, al igual que en la prueba Voges Proskauer y en la prueba de urea, se obtuvo un resultado negativo, en la prueba rojo de metilo y en la prueba de lisina se obtuvo un resultado positivo, al igual que se describe en la bibliografía (Alcocer, 2024; Winn et al., 1997). En el caso del Citrato se obtuvo un resultado negativo, y según la literatura esta prueba puede variar dependiendo del serotipo, e incluso puede haber variaciones dentro de un mismo serotipo (Winn et al., 1997). Para confirmar si se trata del serotipo *Salmonella* Enteritidis debemos hacer pruebas serológicas, pero por falta de sueros no se realizaron.

En cuanto a la identificación bacteriana, se obtuvo resultados similares a los de otros autores. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se obtuvo un resultado de oxidasa positivo.

En las pruebas de oxidación y fermentación se obtuvo un resultado positivo para la oxidación y negativo para la fermentación. En el caso de la prueba Sulfuro Indol Motilidad, se obtuvo un resultado negativo para la producción de indol y de igual forma para la producción de H₂S, pero si se obtuvo un resultado positivo para la motilidad. En la prueba empleando el medio TSI, se obtuvo que es lactosa negativa, con una lectura alcalino/alcalino y no se produjo sulfuro de hidrogeno; por lo tanto, fue H₂S negativa. En el caso de las pruebas MILI y MIO se obtuvo un resultado positivo. Estos resultados obtenidos fueron de forma similar al obtenido en otra investigación (Yauri, 2009).

En el caso de *Bacillus subtilis*, se obtuvo los siguientes resultados, manitol positivo en el seg Mossel con colonias amarillas sin halo de precipitación, lo cual permite diferenciarlo de otras bacterias como es el caso de *Bacillus cereus*, que presenta colonias de color rosado (Laboratorios Britannia s,a, s.f.). En la prueba SIM, se obtuvo H₂S negativo, motilidad positiva, producción de indol. En la prueba de la gelatina nutritiva se obtuvo un resultado positivo para la hidrólisis de gelatina, de igual forma se obtuvo un resultado positivo para la hidrólisis de almidón en el agar almidón y también se obtuvo un resultado positivo para la reducción a Nitrato, los cuales son resultados descritos en la literatura sobre la identificación de *Bacillus subtilis* (Winn et al., 1997). Además, se ha planteado que se puede evidenciar el tipo de respiración de las bacterias mediante la prueba de tioglicolato (Alcocer, 2024). En este caso se obtuvo un resultado de respiración aerobia para la prueba de tioglicolato.

Se observó que la asociación de vinagre de manzana con la harina de grillos y *Bacillus subtilis*, fue la que mejor resultados aportaron en la inhibición bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Enteritidis*. Adicionalmente, se observó que en los análisis in vitro, hubo un menor crecimiento de colonias de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que se ha comprobado en estudios que el vinagre puede inhibir de forma parcial el desarrollo de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Johnston y Gaas, 2006).

En cuanto a la *Salmonella* Enteritidis, se observó un resultado de acuerdo a lo esperado, puesto que el vinagre puede tener distintos efectos sobre las bacterias, por ejemplo, en mezcla con jugo de limón teniendo un pH de 2,3 tiene la capacidad de reducir la población de *Salmonella* en clastodios de nopal (Moreno et al., 2021). Esto puede ayudar a explicar los resultados, en los cuales en ciertas repeticiones de distintos tratamientos se observó menos colonias de *Salmonella* Enteritidis. Además de esto, *Bacillus subtilis* no inhibe a *Salmonella* Typhimurium (Jurado-Gómez y Jarrín-Jarrín, 2015); sin embargo, también se ha determinado que aves que han consumido *Bacillus subtilis*, entre los múltiples beneficios que presentan se da la reducción de *Salmonella* (Fang et al., 2024). Esto indicaría una posible razón de porque se observó muy poca inhibición de *Salmonella* Enteritidis.

5. CONCLUSIONES

Se investigó sobre los distintos componentes de la mezcla probiótica, con un énfasis en los principales beneficios a la salud que presentan, lo cual permitió evidenciar que los ingredientes con los cuales se preparó la mezcla probiótica son muy saludables.

Posteriormente se logró obtener un bioproducto, con 3 distintas variaciones, que cambian en función del vinagre utilizado para su elaboración. Los distintos tipos de vinagre que se emplearon son el de manzana, el blanco y el balsámico.

Se investigó sobre las bacterias patógenas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* Enteritidis, especialmente aspectos relacionados a su problemática en la salud, e información relacionada a su cultivo e identificación, estos dos últimos aspectos también se los investigó para *Bacillus subtilis*. Esto permitió evidenciar que *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* Enteritidis presentan un gran peligro para la salud pública, y con la información relacionada al cultivo e identificación se facilitó que se pueda cultivar e identificar a las bacterias de una manera adecuada, y se logró evitar problemas en su desarrollo.

En cuanto a la eficiencia “*in vitro*”, se puede concluir que la mezcla probiótica tiene efectos que pueden variar sobre la inhibición en las cepas patógenas *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065. Se evidenció que en el tratamiento 1, el cual emplea vinagre de manzana, inhibe de manera más eficiente a los patógenos estudiados. Incluso con inhibición total hacia *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y hacia *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, en uno de las repeticiones, mostrando efecto bactericida.

En el tratamiento 2 que emplea el vinagre blanco, se plantea como conclusión que hay

un poco de eficacia sobre la inhibición bacteriana, esto se concluye en base al crecimiento bacteriano, donde se registra la mayor eficiencia en la inhibición sobre *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065. La eficiencia en la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 en este tratamiento es mínima.

En el tratamiento 3, el cual emplea el vinagre balsámico, se concluye que no hay ningún tipo de eficiencia, sobre la inhibición de las bacterias patógenas.

En base a la investigación realizada, es posible plantear a manera de una conclusión general que después de haber realizado la investigación sobre los distintos elementos que implicaban la elaboración de la mezcla probiótica y también sobre los organismos en los cuales se mediría su eficacia, bajo las condiciones que se trabajó simulando el sistema digestivo “*in vitro*”, con ciertas limitaciones, para que se dé una mejor inhibición de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* CBQCA 5407 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 3065, es mejor la mezcla elaborada con vinagre de manzana.

5.3. PUNTOS FUERTES

Se trabajó con 3 distintos tipos de vinagre, lo cual aporta el beneficio de tener una mayor diversidad de sustratos con los que se investigó.

Se trabajó con las bacterias *Salmonella* Enteritidis y con *Pseudomonas aeruginosa*. El punto fuerte del trabajo con estas bacterias, consiste en que *Salmonella* Enteritidis es una bacteria patógena peligrosa que afecta al sistema digestivo, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* causa muchos tipos de infecciones, una gran parte de la población es portadora de esta bacteria en sus intestinos.

5.4. PUNTOS DÉBILES

No se pudo simular mayores variables involucradas en el sistema digestivo, por ejemplo, la inclusión de enzimas digestivas y moléculas ácidas.

No se obtuvo a manera de resultados un número de unidades formadoras de colonias de las bacterias patógenas *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* Enteritidis luego de ser sometidas a los distintos tratamientos, en donde se observó que no hubo inhibición.

No se realizó un estudio “*in vivo*” para determinar la eficiencia de la mezcla probiótica inhibiendo a las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y a *Salmonella* Enteritidis.

6. RECOMENDACIONES

En consecuencia, a la investigación realizada, se sugiere los siguientes usos para la presente mezcla probiótica. Se recomienda para suplementación de alimentación animal. Para este fin se puede diluir la mezcla probiótica en agua y se la puede dar a animales como cerdos y aves de corral.

Otro uso que se recomienda es para consumo humano. En este uso se lo recomienda de varias formas, la principal consiste en usarlo como un aderezo para diversos alimentos especialmente para ensaladas. Adicionalmente se lo puede diluir en agua y consumirlo, en este caso se recomienda emplear de 1 a 2 cucharas en un vaso de agua de aproximadamente 250 ml, se recomienda en esta proporción, porque al contener vinagre este estará más diluido, lo cual puede evitar sus efectos secundarios.

Finalmente, otro uso que se recomienda para la mezcla probiótica consiste en emplearlo como un fertilizante. Para este uso se debe diluirlo, de preferencia en agua, y posteriormente se lo colocará en el suelo. Con el objetivo de que esto sea lo más sustentable, la harina de grillos que se destine para este uso, puede ser elaborada a partir de grillos que han sido capturados y que representaban una plaga en distintas zonas geográficas, con lo cual se contribuirá a reducir con la plaga en un lugar determinado y al mismo tiempo se obtiene una fuente de fertilizante. El uso de fertilizante de la mezcla probiótica, se recomienda especialmente para regular el pH del suelo. Debido a la composición de la mezcla probiótica, su uso como fertilizante aportará con múltiples beneficios.

En base a los puntos débiles, se recomienda realizar estudios donde se analice la eficiencia "*in vitro*" de esta mezcla probiótica con más variables, que pueden incluir las enzimas digestivas que se encuentran en el sistema digestivo, ácidos y sales que también

forman parte del sistema digestivo, y simular de la forma más precisa los tiempos que debe ser sometida a la exposición de cada uno de estos componentes.

Se recomienda obtener también resultados que implique el número de unidades formadoras de colonias que había luego de realizar las pruebas de análisis "*in vitro*", en los casos en los que si se observó crecimiento bacteriano. Esto se puede realizar con distintas metodologías de análisis "*in vitro*".

Se recomienda realizar estudios "*in vitro*", donde se puede trabajar con modelos biológicos y se puede determinar la eficiencia "*in vitro*". Además de esto se puede trabajar con personas que sean portadoras en su intestino de *Pseudomonas aeruginosa*, para analizar mediante experimentos que incluyan placebos si hubo una inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* en los participantes. Finalmente se puede trabajar con personas que sean diagnosticadas con salmonelosis, producida por *Salmonella* Enteritidis, donde se les puede suministrar la nueva mezcla probiótica, a un grupo y también se administraría un placebo, adicionalmente ambos grupos deben seguir las indicaciones médicas, y se puede determinar cuál grupo presento una mejoría más pronta, además que es posible determinar cuál de los dos grupos tubo menores síntomas.

Finalmente, se recomienda que se continúe con el desarrollo de nuevos bioproductos, tratamientos alternativos, alimentos, productos agropecuarios, suplementos y medicamentos. Además de continuar realizando investigación sobre la ecología bacteriana analizando que bacterias tienen la capacidad de inhibir a otras bacterias, además de investigar y desarrollar innovaciones en el desarrollo tecnológico y científico.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, D., Lombardo, B., Méndez, M., Ojeda, M., Alfageme, C. y Drolas, C. (2022). Descripción de las técnicas de producción del vinagre de sidra de manzana y sus beneficios. *Revista Nutrición Investiga*, 7(1) 6-39.
- Aggarwal, S., Sabharwal, V., Kaushik, P., Joshi, A., Aayushi, A. y Suri, M. (2022) Postbiotics: From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 6(887642). doi: 10.3389/fsufs.2022.887642.
- Alcocer, I. (2024). *Manual Laboratorio de Microbiología*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Aljahdali, N., Sanad, Y., Han, J. y Foley, S. (2020). Current knowledge and perspectives of potential impacts of *Salmonella enterica* on the profile of the gut microbiota. *BMC Microbiology* 20(353). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02008-x>.
- Allen, S., Martínez, E., Gregorio, G. y Dans, L. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(CD003048). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3>.
- Ashley, S., Sjöding, M., Popova, A., Cui, T., Hoostal, M., Schmidt, T., Branton, W., Dieterle, M., Falkowski, N., Baker, J., Hinkle, K., Konopka, K., Erb-Downward, J., Huffnagle, G. y Dickson, R. (2020). Lung and gut microbiota are altered by hyperoxia and contribute to oxygen-induced lung injury in mice. *Science Translational Medicine*, 12(556). DOI:10.1126/scitranslmed.aau9959
- Azhar, N., Zin, N. y Hamid, T. (2017). *Lactococcus Lactis* Strain A5 Producing Nisin-like Bacteriocin Active against Gram Positive and Negative Bacteria. *Tropical life sciences research*, 28(2), 107–118. <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.8>
- Balbuena, E. (2011). *Manual Básico de sanidad psíquica*. FAO Paraguay. <https://www.fao.org/3/as830s/as830s.pdf>
- Bahramianfard, H., Derakhshandeh, A., Naziri, Z. y Khaltabadi Farahani, R. (2021).

- Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella Enteritidis* from poultry and egg samples in Iran. *BMC Veterinary Research*, 17(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-021-02900-2>
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. y Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7(212527).
<https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Blajman, J., Zbrun, M., Astesana, D., Berisvil, A., Romero, A., Fusari, M., Soto, L., Signorini, M., Rosmini, M. y Frizzo, L. (2015). Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista argentina de microbiología*, 47(4), 360-367. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002>
- Berg, J., Tymoczko, J., y Stryer, L. (2008). Bioquímica. Reverté, S. A.
- Cao, P., Fleming, D., Moustafa, D., Dolan, S., Szymanik, K., Redman, W., Ramos, A., Diggle, F., Sullivan, C., Goldberg, J., Runbaugh, K. y Whiteley, M. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection. *Nature*, 618, 358–364.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06111-7>
- Castro-Vargas, R. E., Herrera-Sánchez, M. P., Rodríguez-Hernández, R. y Rondón-Barragán, I. S. (2020). Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Veterinary world*, 13(10), 2070–2084.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>
- Dabanch, J., Herrero, D., Pavéz, C., Veas, N., Braun, S. y Porte, L. (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 26(4), 360-362. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000500011>
- Darwesh, O. y Elshahawy, I. (2023). Management of sunflower charcoal-rot and maize late-wilt diseases using the aqueous extract of vermicompost (vermitea) and environmental-safe biochar derivative (wood vinegar). *Scientific Reports*, 13(17387).
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-43974-2>
- DIFCO LABORATORIES. (1984). *Manual Difco medios de cultivo deshidratados y reactivos*

para microbiología. DIFCO LABORATORIES.

- Fang, S., Fan, X., Xu, S., Gao, S., Wang, T., Chen, Z. y Li, D. (2024) Effects of dietary supplementation of postbiotic derived from *Bacillus subtilis* ACCC 11025 on growth performance, meat yield, meat quality, excreta bacteria, and excreta ammonia emission of broiler chicks. *Poultry Science*, 103(5). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103444>
- García Salvador, A., Quintela Antolinez, S., Horrillo Furundarena, I., Aróstegui Uranga, S., Bilbao Sevillano, A., Villaran Velasco, M., Meana Martínez, J. y Goñi de Cerio, F. (2021). Enfermedades mentales y nutrición saludable. Nuevas alternativas para su tratamiento. *Revista española de nutrición comunitaria*. 27(1). DOI: 10.14642/RENC.2021.27.1.5357
- García Luna, P. y López Gallardo, G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 22(Supl. 2), 05-13. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500002&lng=es&tlng=es
- Garvey, S., Mah, E., Blonquist, T., Kaden, V. y Spears, J. (2022). The probiotic *Bacillus subtilis* BS50 decreases gastrointestinal symptoms in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gut microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2122668>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. y Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Gullo, M., Verzelloni, E. y Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 49(10), 1571-1579. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>.
- Gutiérrez, A. (2021). *Nuevas cepas probióticas para acuicultura*. [Tesis doctoral. Universidad de las palmas de gran canaria. Arucas].

- Johnston, C. y Gaas, C. (2006). Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect. *Medscape general medicine*, 8(2), 61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1785201/>
- Jurado-Gómez H., y Jarrín-Jarrín V. (2015) Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Revista Biosalud*; 14(2), 49-62. DOI: 10.17151/biosa.2015.14.2.5
- Kim, S. G., Becattini, S., Moody, T. U., Shliaha, P. V., Littmann, E. R., Seok, R., Gjonbalaj, M., Eaton, V., Fontana, E., Amoretti, L., Wright, R., Caballero, S., Wang, Z. X., Jung, H. J., Morjaria, S. M., Leiner, I. M., Qin, W., Ramos, R. J. J. F., Cross, J. R., Narushima, S., ... Pamer, E. G. (2019). Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature*, 572, 665–669. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1501-z>
- Köhler, T., Luscher, A., Falconnet, L., Resch, G., McBride, R., Mai, Q., Simonin, J., Chanson, M., Maco, B., Galiotto, R., Riat, A., Civic, N., Docquier, M., McCallin, S., Chan, B. y Van Delden, C. (2023). Personalized aerosolised bacteriophage treatment of a chronic lung infection due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 14(3629). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39370-z>
- Leyva Castillo, V., Puig Peña, Y., Espino Hernández, M., Pereda Lamela, G., Portela López, N., Morejón, P., & Roble, O. (2013). Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23(1), 13. <https://revalnutricion.sld.cu/index.php/rcan/article/view/248>.
- Laboratorios Britannia s.a. (s.f.). *Bacillus cereus* Selectivo Agar (según Mossel) https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60705f42f3f0e.pdf
- Laboratorios Britannia s.a. (s.f.). Tioglicolato USP con Indicador Medio https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607095675660f.pdf
- Le Guern, R., Grandjean, T., Stabler, S., Bauduin, M., Gosset, P., Kipnis, E. y Dessein, R. (2023). Gut colonisation with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* worsens *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Nature Communications*, 14(78). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35767-4>

- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (1999). *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall
- Magara, H., Niassy, S., Ayieko, M., Mukundamago, M., Egonyu, J., Tanga, C., Kimathi, E., Ongere, J., Fiaboe, K., Hugel, S., Orinda, M., Roos, N. y Ekesi, S. (2021) Edible Crickets (Orthoptera) Around the World: Distribution, Nutritional Value, and Other Benefits—A Review. *Frontiers in Nutrition*. 7(537915). Doi: 10.3389/fnut.2020.537915
- Mao, N., Cubillos-Ruiz, A., Cameron, D. E. y Collins, J. J. (2018). Probiotic strains detect and suppress cholera in mice. *Science translational medicine*, 10(445). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao2586>
- Marchello, C. S., Carr, S. D. y Crump, J. A. (2020). A Systematic Review on Antimicrobial Resistance among Salmonella Typhi Worldwide. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 103(6), 2518–2527. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0258>
- Milagro, M. (2012). “*Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos”. [Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España].
- Moreno-Rodas, C., Hernández-Anguiano, A., Aranda-Ocampo, S., Suárez-Espinosa, J., Landa-Salgado, P. y Castro-Rosas, J. (2021). Efecto de soluciones antimicrobianas en poblaciones de Salmonella y color de cladodios de nopal verdura. *Revista fitotecnia mexicana*, 44(1), 77-84. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.1.77>
- Mughini-Gras, L., Schaapveld, M., Kramers, J., Mooij, S., Neefjes-Borst, E., Pelt, W. y Neefjes, J. (2018). Increased colon cancer risk after severe Salmonella infection. *PLoS ONE*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189721>
- National Institutes of Health, 2022. Probióticos, hoja informativa para consumidores. U.S. Department of Health & Human Services. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>
- Reynolds, D. y Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *An Update. Drugs*, 81, 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- OMPI. (s.f.). *Vinagre con harina de grillos y Bacillus subtilis*.

https://patentscope.wipo.int/search/es/result.jsf?_vid=P22-LX98GI-07998

- Pérez, L., Núñez, J. F., Villagómez, D.A., Tolosa, M. N. y Rubio, M.S. (2005). Bacteriological harmlessness in mexican export shrimp. *Veterinaria México*, 36(4), 411–423.
Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2005/vm054d.pdf>
- Piewngam, P., Zheng, Y., Nguyen, T. H., Dickey, S. W., Joo, H. S., Villaruz, A. E., Glose, K. A., Fisher, E. L., Hunt, R. L., Li, B., Chiou, J., Pharkjaksu, S., Khongthong, S., Cheung, G. Y. C., Kiratisin, P. y Otto, M. (2018). Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*, 562(7728), 532–537. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0616-y>
- Piewngam, P., Chiou, J., Ling, J., Liu, R., Pupa, P., Zheng, Y. y Otto, M. (2021). Enterococcal bacteremia in mice is prevented by oral administration of probiotic *Bacillus* spores. *Science translational medicine*, 13(621). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf4692>
- Quinteros, M. (2021). Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*). [Tesis de maestría. Universidad de Cotopaxi. Latacunga].
- Sun, B., Gu, L., Bao, L., Zhang, S., Wei, Y., Bai, Z., Zhuang, G. y Zhuang, X. (2020). Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 148(107911). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107911>.
- Tanya Morocho, M. y Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*. 46(2), 93-103.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&tlng=es
- Varela, A. y Choc, L.F. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 31(3) <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>
- Vásquez, M., Rodríguez, J., Lira, B., Cueva, S., Ayón, M. y Mallma, Y. (2012). pH de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las

primeras semanas de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 23(1), 20-26. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000100003&lng=es&tlng=es.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Woods, G. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Yauri, M. (2009). *Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenemes (Tipo Metallo-B-lactamasas) en Pseudomonas aeruginosa* [Tesis de grado. Pontificia Universidad Católica Del Ecuador. Quito].

Yue, S., Li, Z., Hu, F. y Picimbon, J. (2020). Curing piglets from diarrhea and preparation of a healthy microbiome with Bacillus treatment for industrial animal breeding. *Scientific Reports*, 10(19476). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75207-1>

Zeise, K., Woods, R. y Huffnagle, G. (2021). Interplay between Candida albicans and Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tract: Impact on Colonization Resistance, Microbial Carriage, Opportunistic Infection, and Host Immunity. *Clinical microbiology reviews*, 34(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00323-20>