

DOI: <https://doi.org/10.56124/allpa.v8i15.0109>

Uso de subproductos como sustratos para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacteria*

Use of by-products as substrates for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria*

Macias-Carranza Yelitza ¹; Véliz Víctor ²; Santacruz-Terán Stalin ³

¹ Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Manta, Ecuador.
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-1234-4774>.

² Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Manta, Ecuador.

³ Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Manta, Ecuador.
Correo: stalin.santacruz@uleam.edu.ec. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0801-9876>.

Resumen

Durante los procesos agroindustriales se generan subproductos que provocan problemas ambientales. Estos materiales podrían ser utilizados como sustratos para el desarrollo de microorganismos de interés. En el presente trabajo se evaluó el uso de subproductos de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum spp.*), haba (*Vicia faba*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) como sustratos para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacteria*, ambas bacterias como control de los patógenos *Salmonella spp.* y *Streptococcus mutans*. Los materiales fueron inoculados con *L. acidophilus* y *Bifidobacteria* e incubados a 37 °C por 24h. Los resultados mostraron que el crecimiento de *L. acidophilus* fue mayor en los sustratos de arroz, trigo, haba y tomate de árbol incubados a 37 °C, con 6.7×10^6 UFC/mL a las 24 h de incubación, mientras que para *Bifidobacteria* el mejor sustrato fue tomate de árbol con 5.1×10^6 UFC/mL después de 24 h. El efecto inhibitorio de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria* fue mayor contra *Salmonella spp.* cuando las BAL se desarrollaron en sustratos de tomate de árbol y trigo-haba, en ambos casos con zonas de inhibición de 12.22 mm.

Palabras clave: Bacterias lácticas, residuos, inhibición, *S. mutans*, *Salmonella*.

Abstract

Agro-industrial processes generate by-products that lead to environmental problems. These materials could be used as substrates for the development of microorganisms of interest. In the present work, the use of by-products of rice (*Oryza sativa*), wheat (*Triticum spp.*), fava bean (*Vicia faba*) and tree tomato (*Solanum betaceum*) as substrates for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* was studied, together with the inhibition of *Salmonella spp.* and *Streptococcus mutans*. The materials were inoculated with *L. acidophilus* and *Bifidobacteria* and incubated at 37 °C for 24 h. The results showed that the growth of *L. acidophilus* was greater in rice, wheat, broad bean and tree tomato substrates incubated at 37 °C, with 6.7×10^6 CFU/mL at 24 h of incubation, while for *Bifidobacteria*, the best substrate was tree tomato with 5.1×10^6 CFU/mL after 24 h. The inhibitory effect of *L. acidophilus* and *Bifidobacteria* was greater against *Salmonella spp.* when the LAB were developed in tree tomato and wheat-fava bean substrates, in both cases with inhibition zones of 12.22 mm.

Keywords: Lactic acid bacteria, residues, inhibition, *S. mutans*, *Salmonella*.

1. Introducción

Durante los procesos agroindustriales se generan subproductos o residuos, los cuales, al no ser reciclados o procesados apropiadamente, generan diversos problemas ambientales. Su eliminación supone un problema económico y de gestión para las empresas agroindustriales. Sin embargo, estos materiales son fuentes especialmente atractivas por su contenido de compuestos químicos (azúcares, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina, etc.) y pueden ser potencialmente útiles cuando se les transforma mediante tratamientos químicos o microbiológicos en productos de elevado valor añadido (Ramírez, 2012).

En el Ecuador la producción de arroz en cáscara corresponde aproximadamente a 1'594 678 ton/año (ESPAC, 2017). El 98% de los campos de cultivo de arroz se encuentran ubicados en la región de la costa, específicamente en las provincias de Guayas, Los Ríos y Manabí. El procesamiento del arroz genera residuos que representan un 22% del total pilado (Loja, 2017). De la misma forma el haba, cultivo importante por su contenido proteico, es la cuarta leguminosa más

cultivada. Los residuos del haba (cáscara) representan la mitad del peso generado (Basantes, 2015). El trigo es el cereal de mayor importancia en el Ecuador, su consumo supera las 450 000 ton/año, sin embargo, de ello el Ecuador importa el 98% de requerimientos y tan solo el 2% es producido a nivel local. Los residuos del procesamiento del trigo, mayoritariamente salvado, corresponden al 27% de la masa total (Basantes, 2015). La producción de tomate de árbol en Ecuador se da principalmente en la sierra teniendo una producción continua de 21014 ton anuales. Los residuos de su procesamiento, cáscara y semillas, abarcan un 14% de su masa total (Montenegro, 2008). Algunos de estos residuos son quemados o vertidos en rellenos sanitarios, lo que produce una gran liberación de dióxido de carbono, contaminación de cursos de aguas, molestias por presencia de olores, proliferación de ratas, moscas y otros insectos, entre otros efectos negativos (Lara, 2016).

Se conoce en la actualidad que el microbiota intestinal humana y de los animales juega un papel importante en su estado de salud. En ambos casos los

probióticos mejoran la salud intestinal y estimulan el sistema inmunológico. La cepa bacteriana *L. acidophilus* vive de forma natural en el cuerpo humano y se encuentra principalmente en los intestinos y la vagina (Foye et al., 2014). Las Bifidobacterias como *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, constituyen el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso, constituyendo hasta un 25% de la microbiota presente en el colon del adulto, y hasta un 95% del recién nacido (Teitelbaum, 2002).

La aplicación de las bacterias ácido lácticas (BAL) en la industria alimenticia ha crecido en los últimos años. Se han realizado estudios del uso de los residuos postcosecha de arroz (Campos et al., 2015; Almarche, 2018), hidrolizados de vainas de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Phaseolus lunatus* como sustratos viables para el crecimiento de *L. acidophilus* (Flores et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios del uso de subproductos del tomate de árbol como sustrato para el desarrollo de BAL.

Se conoce que las BAL poseen el potencial de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. En general, las bacterias lácticas son capaces de

producir ácidos orgánicos y sustancias con actividad antibiótica conocidas como bacteriocinas, mismas que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos (Rodríguez, 2001).

Existen muchos microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium botulinum*, *Shigella*), cuya ingestión puede causar intoxicación alimentaria con síntomas que varían dependiendo del microorganismo y el estado de salud o edad del consumidor. A estas afecciones se suma la prevalencia de caries que afecta a más del 60% de la población mundial. Esta afección, cuyo microorganismo responsable es *Streptococcus mutans*, tiene mayor prevalencia en países asiáticos y latinoamericanos (Childers, 2017).

En base a la información anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo, estudiar el uso de subproductos de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum*), haba (*Vicia faba*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*), solos y combinados, como sustratos para el crecimiento de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*, estas dos últimas como control de los microorganismos patógenos *Salmonella* spp. y *S. mutans*.

2. Metodología (materiales y métodos)

Las cáscaras de arroz y trigo fueron obtenidas de la Piladora "La Fortuna", Calceta-Tosagua, Manabí, las cáscaras de haba del mercado de Los Esteros, Manta y las cáscaras de tomate de árbol fueron adquiridas en puestos de elaboración de jugos naturales del mercado central de la ciudad de Manta. Cultivos liofilizados de las bacterias lácticas de género *L. acidophilus* (Pharmacy's, Ecuador) y *Bifidobacteria* (Bagó, Ecuador) fueron adquiridos en una farmacia de la ciudad de Manta.

El cultivo puro liofilizado se inoculó en caldo "De Man, Rogosa and Sharpe Agar" (MRS) y se mantuvo a 37 °C por 24 h en condiciones anaerobias. Finalizado el tiempo de activación, una alícuota se

sembró en placas de agar MRS. Consecutivamente se realizó un aislamiento y las células se suspendieron en caldo MRS para posteriormente incubar la suspensión a 37 °C por 48 h (Villa et al., 2013).

Diseño Experimental

Para la investigación se empleó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial AxB con tres repeticiones. El factor A (composición de sustrato con 9 niveles) y el factor B (tipo de microorganismo) con dos niveles, dando un total de 18 tratamientos y 54 unidades experimentales (Tabla 1). Para el caso de mezclas del factor A, estas se prepararon con 50% del componente 1 y 50% del componente 2 (% m/m).

Tabla 1. Tratamientos en estudio, resultado de la combinación de cuatro sustratos y dos bacterias lácticas

Sustrato (Factor A)	Tipo de BAL (Factor B)
Cáscara de arroz	<i>L. acidophilus</i>
Cáscara de arroz	<i>Bifidobacterium</i>
Salvado de trigo	<i>L. acidophilus</i>
Salvado de trigo	<i>Bifidobacterium</i>
Cáscara de haba	<i>L. acidophilus</i>
Cáscara de haba	<i>Bifidobacterium</i>
Cáscara de tomate de árbol	<i>L. acidophilus</i>
Cáscara de tomate de árbol	<i>Bifidobacterium</i>
Cáscara de arroz-Cáscara de haba	<i>L. acidophilus</i>
Cáscara de arroz-Cáscara de haba	<i>Bifidobacterium</i>

<i>Cáscara de trigo-Cáscara de haba</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Cáscara de trigo-Cáscara de haba</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Cáscara de arroz-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Cáscara de arroz-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Cáscara de Trigo-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Cáscara de Trigo-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Cáscara de haba-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Cáscara de haba-Cáscara de tomate de árbol</i>	<i>Bifidobacterium</i>

Utilización de sustratos para el crecimiento de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*

Los subproductos fueron sometidos a un calentamiento hasta llegar a ebullición, con la finalidad de inactivar otros microorganismos presentes y a su vez gelatinizar el almidón presente previo a la inoculación de las BAL. Los sustratos se prepararon de acuerdo al diseño experimental con una concentración del 10% (m/v). La mezcla obtenida se sometió a cocción hasta llegar a una temperatura de 90 °C, para luego enfriarla a 28 ± 2°C previa inoculación.

Los sustratos se prepararon de acuerdo al diseño experimental y su pH se ajustó a 5.75 con hidróxido de sodio para *L. acidophilus* y a pH 6.75 para *Bifidobacteria*. Los sustratos se inocularon posteriormente con *L.*

acidophilus y *Bifidobacteria* (105 UFC/mL) e incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 h con agitación de 100 r.p.m. (Rojo, 2002; León, 2013). Durante el proceso de incubación se tomaron muestras a los tiempos de 0, 1, 3 y 24 h con las cuales se inocularon en cajas Petri previamente preparadas con agar MRS, para luego incubarlas a 37 °C por 24 h y posteriormente realizar el conteo de las UFC de acuerdo al método propuesto por Puupponen et al. (2001).

Inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp. y *Streptococcus mutans* con *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*

La actividad inhibitoria de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria* frente a *Salmonella* spp. y *S. mutans* se determinó de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) y Santacruz y Castro (2018).

Se inocularon *Salmonella* spp. y *S. mutans* en cajas Petri usando como medio de cultivo Agar *Salmonella-Shigella* (HiMedia Laboratories, India) y MRS, respectivamente para seguidamente incubar las cajas a 37 °C por 24 h. Discos de papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro se sumergieron en una solución que contenía el sustrato con *L. acidophilus* o *Bifidobacteria* previamente incubadas. Los discos se colocaron en el centro de placas Petri inoculadas previamente con *Salmonella* spp. o *S. mutans*, e incubadas a 37 °C durante 24 h para posteriormente medir el área de la zona de inhibición.

Con el fin de analizar la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas, estas fueron inoculadas e incubadas en el sustrato de tomate de árbol tal como se describió anteriormente, para luego realizar una centrifugación, descartando el precipitado. El sobrenadante fue neutralizado con NaOH 0.1 N, para luego ser utilizado como medio de inhibición de *Salmonella* spp. y *S. mutans* de acuerdo con el método propuesto por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009).

Acidez titulable

La acidez de los sustratos se determinó por titulación con NaOH 0.1 N, (AOAC, 1984) y se calculó de acuerdo a la ecuación (1).

$$\% \text{ acidez} = \frac{AxBxCx100}{D} \quad (1)$$

Donde:

A: cantidad en mL de hidróxido de sodio

B: normalidad de hidróxido de sodio

C: peso equivalente del ácido láctico (0.009 g ácido láctico/meq)

D: masa de la muestra

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza ADEVA con un nivel $\alpha = 5\%$ y una prueba de medias de Tukey al 5%. Todos los datos fueron analizados por triplicado y los resultados procesados por el programa Infostat 2016, versión libre.

3. Resultados y discusión

Utilización de sustratos para el crecimiento de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*

El sustrato cáscara de tomate de árbol dio como resultado el mayor número de UFC, 6.7×10^6 , de *L. acidophilus* (Tabla 2),

siendo similar al obtenido para los sustratos de trigo-tomate de árbol para 0, 1 y 3 h de incubación, tomate de árbol (1 y 3 h), arroz-haba (3 h), trigo-haba (1 y 24 h), haba-tomate de árbol (3 h), arroz-tomate de árbol (24 h), trigo (0 h) ($p < 0.05$).

Las altas UFC de *L. acidophilus* presentes en el sustrato del tomate de árbol podría deberse a que la composición del tomate de árbol favorece el crecimiento del microorganismo. No se conoce un estudio acerca del desarrollo de algún tipo de bacteria láctica en tomate de árbol, sin embargo, Hernández et al. (2016) evaluaron los subproductos de cáscara de plátano, cáscara de manzana

y bagazo de zanahoria con cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*. Dichos autores observaron que el género *L. acidophilus* presentó mayor tolerancia a la acidez.

Por otro lado, las menores UFC obtenidas para la combinación de tomate de árbol con otro material pudo deberse a que la mezcla dio como resultado una disminución de la calidad nutricional del sustrato. Sendra (2008) mencionó que la adición de fibras, frutas y derivados (especialmente oligosacáridos) ejercen un efecto beneficioso en el crecimiento y supervivencia de cepas de bacterias probióticas de género *Lactobacillus*.

Tabla 2. Crecimiento de *L. acidophilus* en sustratos de cáscara de arroz, trigo, haba y tomate de árbol por incubación a 37 °C durante 24 h

Sustratos	Tiempo (h)	UFC/mL
Arroz	3	4.8x10 ^{5A}
Arroz	0	5.7x10 ^{5A}
Arroz	1	5.8x10 ^{5A}
Trigo-Haba	3	7.7x10 ^{5A}
Trigo-Haba	0	8.2x10 ^{5A}
Arroz	24	8.3x10 ^{5A}
Arroz-Tomate de árbol	3	9.5x10 ^{5A}
Arroz-Haba	24	9.6x10 ^{5A}
Arroz-Haba	1	1.0x10 ^{6A}
Arroz-Tomate de árbol	1	1.1x10 ^{6A}
Haba-Tomate de árbol	24	1.2x10 ^{6A}

Trigo	1	1.2x10 ^{6A}
Haba	3	1.4x10 ^{6A}
Haba	24	1.6x10 ^{6A}
Arroz-Haba	0	1.6x10 ^{6A}
T. árbol	0	1.6x10 ^{6A}
Trigo-Tomate de árbol	24	1.6x10 ^{6A}
Haba-Tomate de árbol	1	1.6x10 ^{6A}
Trigo	24	1.9x10 ^{6A}
Trigo-Tomate de árbol	1	2.1x10 ^{6A, B}
Tomate de árbol	1	2.2x10 ^{6A, B}
Arroz-Haba	3	2.4x10 ^{6A, B}
Trigo-Haba	1	2.6x10 ^{6A, B}
Trigo-Tomate de árbol	0	2.7x10 ^{6A, B}
Haba-Tomate de árbol	3	2.9x10 ^{6A, B}
Arroz-Tomate de árbol	24	3.1x10 ^{6A, B}
Tomate de árbol	3	3.7x10 ^{6A, B}
Trigo	0	3.9x10 ^{6A, B}
Trigo-Haba	24	3.9x10 ^{6A, B}
Trigo-Tomate de árbol	3	4.3x10 ^{6A, B}
Tomate de árbol	24	6.7x10 ^{6B}

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

En relación con el crecimiento de Bifidobacteria, no se presenciaron diferencias estadísticas significativas en las UFC entre los sustratos (Tabla 3). Posiblemente, el pH de los sustratos

cercano a la neutralidad dio como resultado condiciones favorables para el desarrollo de las Bifidobacterias (Rojo, 2002) sin que exista diferencia en las UFC desarrolladas.

Tabla 3. Crecimiento de Bifidobacteria en sustratos de cáscara de arroz, trigo, haba y tomate de árbol por incubación a 37 °C durante 24 h

Sustratos	Tiempo (h)	UFC/mL
Haba	0	6.6x10 ^{5A}
Trigo-Haba	1	7.5x10 ^{5A}

Trigo-Haba	3	7.5x10 ^{5A}
Haba-Tomate de árbol	0	8.3x10 ^{5A}
Arroz-Haba	0	8.4x10 ^{5A}
Haba	1	8.9x10 ^{5A}
Haba-Tomate de árbol	1	9.2x10 ^{5A}
Arroz	0	9.9x10 ^{5A}
Haba	3	1.1x10 ^{6A}
Trigo	24	1.2x10 ^{6A}
Arroz-Tomate de árbol	1	1.3x10 ^{6A}
Trigo-Haba	0	1.5x10 ^{6A}
Trigo	3	1.5x10 ^{6A}
Arroz-Haba	1	1.5x10 ^{6A}
Arroz-Tomate de árbol	3	1.6x10 ^{6A}
Arroz-Haba	3	1.7x10 ^{6A}
Arroz-Haba	24	1.8x10 ^{6A}
Tomate de árbol	0	1.9x10 ^{6A}
Trigo	1	2.3x10 ^{6A}
Arroz	24	2.3x10 ^{6A}
Tomate de árbol	1	2.5x10 ^{6A}
Trigo-Tomate de árbol	0	2.5x10 ^{6A}
Trigo	0	3.1x10 ^{6A}
Tomate de árbol	3	3.2x10 ^{6A}
Haba-Tomate de árbol	3	3.5x10 ^{6A}
Arroz-Tomate de árbol	24	3.9x10 ^{6A}
Trigo-Haba	24	4.2x10 ^{6A}
Haba	24	4.7x10 ^{6A}
Haba-Tomate de árbol	24	5.1x10 ^{6A}
Tomate de árbol	24	5.1x10 ^{6A}

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Acidez de los sustratos durante el desarrollo de *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*

En la tabla 4 se observa que hubo diferencia en la acidez de los sustratos luego de 24 h de incubación con *L. acidophilus* ($p < 0.05$), siendo la mayor la de cáscara de tomate (2.12%) y menor la de arroz-haba y arroz, ambos con 0.50% de acidez. La acidez propia del tomate de

árbol se pudo ver incrementada por la presencia de ácidos orgánicos producidos por las BAL, a diferencia de los otros sustratos cuya acidez fue menor. Maldonado et al. (2018) estudiaron la elaboración de una bebida fermentada de quinoa bajo la acción de cultivos con bacterias lácticas (*L. acidophilus* y *L. bulgaricus*) observando un incremento de la acidez de 0.06 % a 0.47 %.

Tabla 4. Acidez titulable de los sustratos (arroz, trigo, haba y tomate de árbol) durante el desarrollo de *L. acidophilus* a 37 °C por 24 h

Sustrato	Acidez (%)
Arroz-Haba	0.50 ^A
Arroz	0.50 ^A
Trigo-Haba	0.64 ^B
Trigo	0.76 ^{B,C}
Trigo-Tomate de árbol	0.90 ^{C,D}
Haba-Tomate de árbol	0.98 ^D
Haba	1.02 ^D
Arroz-Tomate de árbol	1.07 ^D
Tomate de árbol	2.12 ^E

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La tabla 5 muestra una mayor acidez por el desarrollo de *Bifidobacteria* en la cáscara de arroz (25,22 %) y una menor acidez para la cáscara de tomate de árbol (7,72 %). La mayor acidez para el tomate de árbol como sustrato para *L. acidophilus* en comparación con

Bifidobacteria (Tablas 4 y 5) puede deberse a que *L. acidophilus*, tolera mejor los medios más ácidos. En todo caso, no se puede descartar la acidez propia del tomate de árbol, que podría contribuir a la acidez al final de la incubación. Un ejemplo claro de ello se ve en el trabajo de Hardy et al. (2013),

que trabajaron con sustratos a base de cereales y cacao y encontraron que la

acidez titulable era mayor en los que presentaban cacao.

Tabla 5. Acidez titulable de los sustratos (arroz, trigo, haba y tomate de árbol) durante el desarrollo de *Bifidobacteria* a 37 °C por 24 h

Sustrato	Acidez (%)
Tomate de árbol	0.59 ^A
Arroz-Haba	1.07 ^B
Haba	1.21 ^B
Trigo-Haba	1.53 ^C
Trigo-Tomate de árbol	1.57 ^C
Arroz-Tomate de árbol	1.59 ^C
Trigo	1.60 ^C
Haba-Tomate de árbol	1.68 ^C
Arroz	1.92 ^D

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp. y *Streptococcus mutans* con *L. acidophilus* y *Bifidobacteria*

Los resultados obtenidos (Tabla 6) mostraron mayores zonas de inhibición contra *Salmonella* spp. y *S. mutans* ante la acción de *L. acidophilus*, desarrollado en tomate de árbol, con valores de 12.22

y 10.44 mm, respectivamente ($p < 0.05$).

La inhibición de *Salmonella* spp. y *S. mutans* frente a las colonias de *L. acidophilus* se puede deber a la presencia de ácidos orgánicos y bacteriocinas producidos por las bacterias lácticas y a compuestos con carácter antimicrobiano del tomate de árbol (Lord, 2002; Moromi, 2013).

Tabla 6. Zonas de inhibición de *L. acidophilus* previamente desarrollado en sustratos (arroz, trigo, haba y tomate de árbol) frente a *Salmonella* spp. y *S. mutans* después de 24 h de incubación a 37 °C.

Sustrato	<i>Salmonella</i> spp. Diámetro de halo (mm)	<i>S. mutans</i> Diámetro de halo (mm)
Arroz	6.67 ^A	7.66 ^A
Trigo	7.33 ^A	8.88 ^{A,B}
Trigo-Haba	7.33 ^A	8.55 ^{A,B}
Trigo-Tomate de árbol	7.33 ^A	9.67 ^{A,B}
Arroz-Haba	8.20 ^A	7.00 ^{A,B}
Arroz-Tomate de árbol	8.88 ^A	8.11 ^{A,B}

Haba	9.00 ^A	9.22 ^{A,B}
Haba-Tomate de árbol	9.11 ^A	8.11 ^{A,B}
Tomate de árbol	12.22 ^B	10.44 ^B

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Los resultados de la zona de inhibición de *Salmonella* spp. frente a *Bifidobacteria* (Tabla 7) reflejaron diferencia entre el sustrato trigo-haba con un valor de 12.22 mm con los demás sustratos ($p < 0.05$). Los resultados del efecto inhibitorio de *Bifidobacteria* frente a *S. mutans*. para los distintos sustratos no mostraron diferencia ($p < 0.05$). Saavedra et al. (2001) realizaron investigaciones de inhibición

de *Salmonella* *tiphymurium* por parte de *Bifidobacteria*, encontrando zonas de inhibición de 11 mm, valor similar al del presente trabajo. Por otro lado, Vanegas & Rojas (2004) realizó estudios del uso de *Bifidobacterium* spp. aislada de leche materna frente a patógenos como *S. mutans*. Los halos de inhibición presentaron diámetros mayores a los del presente estudio. Posiblemente las diferencias se deban al tipo de BAL utilizada.

Tabla 7. Zonas de inhibición de *Bifidobacteria* previamente desarrollado en sustratos (arroz, trigo, haba y tomate de árbol) frente a *Salmonella* spp. y *S. mutans* después de 24 h de incubación a 37 °C

Sustrato	<i>Salmonella</i> spp. Diámetro de halo (mm)	<i>S. mutans</i> Diámetro de halo (mm)
Trigo-Tomate de árbol	5.89 ^A	7.11 ^A
Haba-Tomate de árbol	5.89 ^A	7.11 ^A
Haba	6.33 ^A	6.89 ^A
Arroz	6.89 ^A	7.89 ^A
Trigo	7.00 ^A	7.22 ^A
Tomate de árbol	7.22 ^A	7.89 ^A
Arroz-Haba	7.33 ^A	8.22 ^A
Arroz-Tomate de árbol	8.44 ^A	7.88 ^A
Trigo-Haba	12.22 ^B	7.44 ^A

Medias con una misma letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

El estudio de la presencia de bacteriocinas mostró que la incubación de *L. acidophilus* en sustrato tomate de

árbol dio como resultado, un extracto líquido, posiblemente rico en bacteriocinas, que tuvo una zona de

inhibición de 20.50 mm para *S. mutans* y una menor de 11.43 mm para *Salmonella* spp.

Para el caso de Bifidobacterias desarrolladas en sustrato tomate de árbol las zonas de inhibición fueron de 20.33 mm para *S. mutans* y 11.33 mm para *Salmonella* spp. Otero-Tuárez et al. (2019) concluyen que las bacterias grampositivas son más sensibles que las bacterias gramnegativas, debido a las diferencias de estructura en la membrana celular. Esta teoría concuerda con los resultados expuestos en este trabajo, donde se observó un mayor efecto antimicrobiano en las bacterias grampositivas (*S. mutans*).

Martínez (2013) comprobó que los sobrenadantes libres de células obtenidos de un cultivo desarrollado a partir de muestras fecales de pollo tuvieron un efecto inhibitorio de 21 y 25 mm sobre el crecimiento de patógenos *Salmonella* spp. y *S. mutans*. asociados a infecciones gastrointestinales. Estos últimos resultados muestran una menor inhibición para *Salmonella*, tal como se encontró en el presente trabajo.

4. Conclusiones

El uso de sustratos a base de cáscaras de arroz, trigo, haba y tomate de árbol y sus combinaciones promueven el desarrollo de *Lactobacillus acidophilus* y Bifidobacterias, con mayor desarrollo para las cáscaras de tomate de árbol. Las dos BAL presentaron poder inhibitorio frente a *Salmonella* spp y *S. mutans*, con un mayor poder de inhibición de *L. acidophilus*. El desarrollo de las dos BAL al parecer generan productos antimicrobianos, posiblemente bacteriocinas, que inhiben mayormente el desarrollo de patógenos grampositivos como *S. mutans* en relación a gramnegativos como las de *Salmonella* spp.

Bibliografía

Almarche, F.A. 2018. Estudio de la bioactividad potencial de extractos hemicelulósicos de la cascarilla de arroz. (título de ingeniería, Universidad Politécnica de Valencia). <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/107252/ALMARCHE%20-%20Studio%20de%20la%20bioactividad%20potencial%20de%20extractos%20hemicelul%C3%B3sicos%20de%20la%20cascarilla%20de%20arroz>

- 20de%20a....pdf?sequence=1&isAllowed=y
- AOAC. 1984. Official methods of analysis of official analytical chemists international. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Campos, Y.; Valero, J. & Peñaranda, M. 2015. Evaluación de ensilajes a partir de residuos de post cosecha de arroz tratados con bacterias ácido lácticas. *Alimentos hoy* 23, 62-64. <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/345/295>
- Childers, N.; Momeni. S.; Whiddon. J.; Cheon. K.; Cutter, G.; Wiener, H.; Ghazal, T.; Ruby, J. & Moser, S. 2017. Association Between Early Childhood Caries and Colonization with *Streptococcus mutans* Genotypes From Mothers. *Pediatr Dent.* 39(2), 130-135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385848/pdf/nihms-830314.pdf>
- CLSI. 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44-A2.
- Basantes, E. 2015. Manejo de cultivos Andinos en el Ecuador. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10163/4/Manejo%20Cultivos%20Ecuador.pdf>
- ESPAC. 2017. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Quito. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_2017.pdf
- Foye, O.; Huang, I.; Chiou, C.; Walker, W. & Ning, H. 2014. Early administration of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling. *Revista FEMS Immunology & Medical Microbiology* 65 (3), 467-472. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00978.x>
- Flores, J. & Sifuentes, E. 2014. Hidrolizados de vainas de Vicia faba (Haba) *Pisum sativum* (arveja) y *Phaseolus lunatus* (pallar) como sustratos viables para el *Lactobacillus acidophilus* (monografía) Universidad Nacional de Callao. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNAC_3b026933716c0b2caf743738a4315483
- Hardy, H.; Harris, J.; Lyon, E.; Beal, J. & Foey, A. 2013. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut

- mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5(6), 1869–1912. <https://doi.org/10.3390/nu5061869>.
- Hernández, A.; Díaz, V.; Totosaus, A. & Pérez, M. 2016. Evaluación de subproductos agroindustriales como posibles probióticos. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1, 837-842. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/9/145.pdf>
- Lara, C. 2016. Caracterización y microencapsulación de compuestos bioactivos de tomate de árbol. Universidad de las Américas. <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/6159/3/UDLA-EC-TIAG-2016-20.pdf>
- León, D.; Calderón, B.; Martínez, A.; Sánchez, E.; Zulatto, A. & Camacho, I. 2013. Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar* 12, 133 – 144. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4745491>
- Loja, C. 2017. Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26247/1/TRABAJO%20DE%20TITULACION%2093N.pdf>
- Lord, H. 2002. Utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico para el control de *Salmonella enteritidis* en pescado. Universidad Nacional, Estación de Biología Marina, Puntarenas. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/5655/utilizacion%20lactobacillus%20acidophilus%20salmonella.pdf?sequence=1>
- Maldonado, R.; Carrillo, P.; Ramírez, L. & Carvajal, F. 2018. Elaboración de una bebida fermentada a base de quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Enfoque UTE* 1, 1-11.
- Martínez, F.; Balciunas, E.; Converti, A.; Cotter, P. & De Souza Oliveira, R. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances* 31, 482-488. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.010>
- Moromi, N. 2013. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontología Sanmarquina* 10, 18-20. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9384473>

- Montenegro, G. 2008. Estudio de prefactibilidad para la producción de mermeladas de tomate de árbol, mango y piña. Escuela Politécnica Nacional. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17335/1/CD-1611.pdf>
- Otero-Tuárez, V.; Fernández-Pan, I. & Maté, J. 2019. Effect of the presence of ethyl lauroyl arginate on the technological properties of edible fish gelatin films. *International Journal of Food Science & Technology* 5, 213-2121. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14454>
- Puupponen, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen, M; Heionen, M; Hopia, A. & Oksman, K. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90, 494-507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x>
- Ramírez, S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de arroz y papa para la producción de *Trichoderma* spp. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3063/1/SBQ.29.pdf>
- Rodríguez, J. 2001. El control de patógenos en los alimentos. Eroski Consumer. <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/el-control-de-patogenos-en-los-alimentos.html>
- Rojo, S. 2002. Aislamiento, identificación, y caracterización de Bifidobacterias presentes en heces de lactantes. Universidad de los Andes. http://bdigital.ula.ve/storage/pdfsis/pregrado/tde_archivos/1/TDE-2006-06-05T07:54:07Z-69/Publico/Ingrid%20Medina.pdf
- Saavedra, J. 2001. Clinical applications of probiotic agents. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(6), 1147-1151. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1147S>
- Santacruz, S. & Castro, M. 2018. Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *Food Science and Technology* 93, 570-572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.016>
- Sendra, E.; Fayos, P.; Lario, Y.; Fernández-López, J.; Sayas Barberá, E. & Alvarez, J. 2008. Incorporation of citrus fibers in

fermented milk containing
probiotic bacteria. Food
Microbiology 25, 13-21.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.003>

Teitelbaum, J. & Walker, W. 2002.
Nutritional impact of probiotics
as protective gastrointestinal
organisms. Annual Review of
Nutrition 22, 107-38.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.110901.145412>

Vanegas, M. & Rojas, J. 2004. Detección
de patógenos en alimentos.
Hipótesis: apuntes científicos
uniandinos 1, 34-40.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7195271>

Villa-García, M., Pedroza-Islas, R.,
Martin-Martínez, S., & Aguilar-
Frutis, M. (2013). Espectroscopía
de Impedancia: Un método
rápido y eficiente para el
monitoreo del crecimiento de
Lactobacillus acidophilus. Revista
mexicana de ingeniería química,
12(1), 57-64.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382013000100006&script=sci_abstract