

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

Resistencia térmica de cepas probióticas aisladas de pollo criollo

Estudiante

Juan Carlos Zuniga Carvajal

Adriana Nohelia Velásquez Galeas

Asesores

Mayra Márquez González, Ph.D.

Yordan Martinez Aguilar, D.Sc.

Honduras, julio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	10
Abstract.....	11
Introducción.....	12
Materiales y Métodos	15
Reactivación y Crecimiento de Bacterias.....	15
Resistencia Térmica	15
Estimación de Valor D.....	17
Estimación de Valor Z.....	17
Resistencia a pH Ácido	18
Resistencia en Sales Biliares.....	18
Determinación del Porcentaje de Células Viables	19
Diseño Experimental y Análisis Estadísticos	20
Resistencia a Temperatura	20
Resistencia a pH y Sales Biliares.....	20
Resultados y Discusión.....	21
Análisis de Resistencia Térmica	21
Estimación de Valor D.....	22
Estimación de Valor Z.....	24
Análisis de Resistencia a pH Ácido	26
Análisis de Resistencia en Sales Biliares.....	29
Conclusiones	32

Recomendaciones.....33

Referencias.....34

Anexos.....37

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.....	23
Cuadro 2 Valor Z para todas las cepas de bacterias ácido lácticas.....	24
Cuadro 3 Supervivencia de bacterias ácido lácticas en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) a un pH ajustado de 3.0 con porcentaje de supervivencia.	27
Cuadro 4 Resistencia de bacterias ácido lácticas en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) a una concentración de sales biliares de 0.03% con porcentaje de supervivencia.....	30

Índice de Figuras

Figura 1	Proceso de reactivación para una cepa de bacterias ácido lácticas.	15
Figura 2	Proceso de prueba de resistencia térmica.....	16
Figura 3	Proceso de prueba de resistencia a pH ácido.	18
Figura 4	Proceso de prueba de resistencia a sales biliares.....	19
Figura 5	Curvas de supervivencia de bacterias ácido láctica a diferentes temperaturas.....	22

Índice de Anexos

Anexo A Recuentos de la cepa C1 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	37
Anexo B Recuentos de la cepa C2 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	38
Anexo C Recuentos de la cepa C5 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	39
Anexo D Recuentos de la cepa C7 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	40
Anexo E Recuentos de la cepa H7.1 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	41
Anexo F Recuentos de la cepa H7.2 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	42
Anexo G Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa C1 y C5.	43
Anexo H Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa C2 y C7.	44
Anexo I Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa H7.1 y H7.2.	45
Anexo J Curvas de sobrevivencia de la cepa C1 y C5 de bacterias ácido láctica a diferentes temperaturas.	46
Anexo K Valor D para la cepa C1 a partir de todas las repeticiones.	47
Anexo L Valor D para la cepa C2 a partir de todas las repeticiones.	48
Anexo M Valor D para la cepa C5 a partir de todas las repeticiones.	49
Anexo N Valor D para la cepa C7 a partir de todas las repeticiones.	50
Anexo O Valor D para la cepa H7.1 a partir de todas las repeticiones.	51
Anexo Q Valor D para la cepa H7.2 a partir de todas las repeticiones.	52

Anexo R Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de la cepa C1 de bacterias ácido lácticas.....	53
Anexo S Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de la cepa C5 de bacterias ácido lácticas.....	54
Anexo T Análisis estadístico para comparación de la resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.....	55
Anexo U Separación de medias Duncan del Valor D de la resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.....	56
Anexo V Valor Z para la cepa C1 a partir de todas las repeticiones.	57
Anexo W Valor Z para la cepa C5 a partir de todas las repeticiones.	58
Anexo X Valor Z para la cepa C7 a partir de todas las repeticiones.....	59
Anexo Y Valor Z para la cepa H7.1 a partir de todas las repeticiones.	60
Anexo Z Valor Z para la cepa H7.2 a partir de todas las repeticiones.	61
Anexo AA Valor Z para la cepa C1 y C5 de bacterias ácido lácticas a las diferentes temperaturas.	62
Anexo BB Curva de valor Z de cada repetición de la cepa H7.1 y H7.2.	63
Anexo CC Curva de valor Z de cada repetición de la cepa C2 y C7.	64
Anexo DD Curva de valor Z de cada repetición de la cepa C1 y C5.	65
Anexo EE Curvas constante de resistencia térmica (valor Z) de bacterias ácido láctica.	66
Anexo FF Recuentos de todas las cepas obtenidos a partir de las tres repeticiones de las pruebas de resistencia a pH.....	67
Anexo GG Análisis estadístico para comparación de la resistencia a acidez (expresado en Log UFC/ml) de las cepas bacterias ácido lácticas.....	68
Anexo HH Separación de medias Duncan del Log UFC/ml de la resistencia a acidez de cepas de bacterias ácido lácticas.	69

Anexo II Recuentos de todas las cepas obtenidos a partir de las tres repeticiones de las pruebas de resistencia a sales biliares.....	70
Anexo JJ Análisis estadístico para comparación de la resistencia a sales biliares (expresado en Log UFC/mL) de las cepas bacterias ácido lácticas.....	71
Anexo KK Separación de medias Duncan del Log UFC/mL de la resistencia a sales biliares de cepas de bacterias ácido lácticas.	72

Resumen

Se evaluó *in vitro* el potencial probiótico de cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) aisladas del ciego y las heces de pollos criollos del género *Lactobacillus* sp. Se determinó la actividad probiótica mediante pruebas de resistencia térmica (55, 60, 65 y 70 °C), sobrevivencia a pH 3.0, y sales biliares (concentración al 0.3%). Mediante la estimación del Valor D y el Valor Z, se interpretó la capacidad de tolerancia a las diferentes temperaturas para cada cepa. Se encontró que todas las cepas BAL son capaces de resistir estrés por tratamientos térmicos a temperaturas no mayores entre 65 °C. Las cepas C2, C7, H7.1 y H7.2 demostraron en promedio un valor D de 573, 335, 40 y 17 segundos a 55, 60, 65 y 70 °C, respectivamente. Así mismo, todas las cepas tuvieron un rango de valor Z entre 8.38 y 9.98 °C. El pienso típico para pollos de engorde se procesa a aproximadamente entre 72 a 85 °C durante 15-20 segundos. Los piensos avícolas comúnmente se acondicionan a temperaturas de 85 °C entre 30 a 60 segundos. A todas las cepas BAL a tales temperaturas, en promedio tendría un valor $D_{(85)}$ de 0.39 segundos, inactivando completamente el cultivo bacteriano. En un proceso, de acondicionamiento de 65 °C, todas las cepas tendrían un valor $D_{(50)}$ de 39.5 segundos en promedio. Por lo tanto, las cepas BAL podrán permanecer viables a dicho tratamiento térmico. Las bacterias demostraron una resistencia a pH 3.0 y una concentración de sales biliares de 0.3% garantizando su paso seguro a través del sistema gastrointestinal.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, potencial probiótico, sistema gastrointestinal, viabilidad.

Abstract

The probiotic potential of strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from the cecum and feces of Creole chickens, of the genus *Lactobacillus* sp. was evaluated *in vitro*. Probiotic activity was determined by tests of thermal resistance (55, 60, 65 and 70 °C), survival at pH 3.0, and bile salts (concentration at 0.3%). By estimating the D value and the Z value, it was inferred the tolerance capacity at different temperatures for each strain. It was determined that all LAB strains were capable of resisting stress by thermal treatments at temperatures no higher than 65 °C. Strains C2, C7, H7.1 and H7.2 showed on average a D value of 573, 335, 40 and 17 seconds at 55, 60, 65 and 70 °C, respectively. Likewise, all strains had a Z value range between 8.38 and 9.98 °C. Typical broiler feed is processed at approximately 72 to 85 °C for 15-20 seconds. Poultry feeds are commonly conditioned at temperatures of 85 °C for 30 to 60 seconds. To all the LAB strains at such temperatures, on average it would have a D Value₍₈₅₎ of 0.39 seconds, completely inactivating the bacterial culture. In a 65 °C conditioning process, all strains would have a D value₍₅₀₎ of 39.5 seconds, on average. Therefore, the LAB strains will be able to remain viable to such heat treatment. The bacteria demonstrated a resistance to pH 3.0 and a bile salt concentration of 0.3% guaranteeing their safe passage through the gastrointestinal system.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotic potential, gastrointestinal system, viability.

Introducción

En condiciones naturales, los pollos criollos poseen una gran variedad de microorganismos en su tracto gastrointestinal (TGI). De tal manera que los pollitos eclosionados obtienen los primeros cultivos de la boca, buche, excrementos de la madre y del medio ambiente (Lara Mantilla y Burgos Portacio 2012). Sin embargo, los pollos criados en granjas industriales eclosionan y se desarrollan en ambientes limpios, esto imposibilitan la colonización de un microbiota intestinal beneficiosa. En la actualidad, la avicultura moderna se caracteriza por la producción intensiva, donde los pollos están expuestos a condiciones estresantes, lo cual las vuelve muy vulnerables a los microorganismos patógenos que pueden ocasionar desbalances de la microbiota intestinal (Rondón et al. 2008). Estas constantes situaciones traen consigo la aparición frecuente de diversas enfermedades y la disminución de la producción de aves dando lugar a graves pérdidas económicas (Hernández García et al. 2019). Por tal razón, es común utilizar antibióticos de amplio espectro en la industria avícola para el control de enfermedades. Sin embargo, se ha cuestionado su utilidad debido a que ha provocado ciertos problemas con la resistencia microbiana y efectos residuales colocando en riesgo la inocuidad alimentaria. De otra manera, aumentan los costos de producción y una notable disminución en los índices productivos de la industria avícola (Lara Mantilla y Burgos Portacio 2012).

Por esta razón, la comunidad científica está considerando diversas alternativas, entre ellas sobresale la utilización de microorganismos probióticos (Hernández García et al. 2019). Los probióticos han sido definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped” (Mack 2005). Actualmente, existe un creciente interés y demanda de probióticos, debido a un mayor reconocimiento de los efectos beneficiosos en la salud de las aves (Fontana et al. 2013). Entre los cuales se encuentra la fortificación de la microbiota con bacterias benéficas, mejora la actividad metabólica, mantiene la salud intestinal, es fuente de enzimas digestivas, mejora la inmunidad y reduce la inflamación intestinal (Cifuentes

Orjuela 2018). Todos estos beneficios son posibles gracias a los distintos mecanismos de acción que los probióticos poseen cuando se encuentran en el tracto gastrointestinal tales como la producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de la fijación de patógenos, competencia por los nutrientes y modulación del sistema inmunitario (FAO 2006).

El probiótico a utilizar en pollos, debe ser un microorganismo nativo del tracto gastrointestinal del pollo en estado saludable (Lara Mantilla y Burgos Portacio 2012). Entre las cepas más utilizadas como probióticos se encuentra las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* debido a su capacidad para adaptarse y proliferar en las condiciones intestinales, lo que genera múltiples efectos positivos en la salud de los pollos (Díaz López et al. 2017). Estos microorganismos son Gram positivos y anaerobios facultativos (Ajcet Reyes y Alfaro Martínez 2020). Su actividad antagónica es el resultado de la formación de ácidos y la producción de bacteriocinas. El ácido láctico lleva a disminuir el pH del medio el cual inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores (Perez Chabela y Ramirez Chavarin 2007).

Estos microorganismos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo y tener la capacidad de colonizar y proliferar en este medio (Hernández García et al. 2019). Por tal razón, es de suma importancia realizar una adecuada evaluación *in vitro* de las cepas de acuerdo con diferentes criterios de selección, tales como resistencia a temperatura, sales biliares y acidez. De tal forma, que los microorganismos probióticos lleguen en un estado viable y en cantidades suficientes una vez que han superado las distintas barreras durante su trayectoria en el tracto gastrointestinal (Rondón et al. 2008). Así mismo, el probiótico debe tener un efecto beneficioso demostrado sobre el anfitrión, no patógeno, no tóxico y libre de efectos secundarios adversos significativos, ser capaz de sobrevivir a través del tracto gastrointestinal, estar presente en el producto en una cantidad adecuada de células viables para conferir el beneficio para la salud y ser compatible con la matriz del producto, las condiciones de procesamiento y almacenamiento para mantener las propiedades deseadas (Fontana et al. 2013). De ahí, el éxito del probiótico dependerá en gran medida de las pruebas y selección *in*

vitro de las cepas. Debido a que los resultados de estas pruebas *in vitro* predecirán e influirán en cierta medida en la capacidad *in vivo* de las cepas.

Para el presente estudio, se evaluó la caracterización parcial de las propiedades probióticas mediante la evaluación de pruebas *in vitro* a la resistencia a diferentes temperaturas, sales biliares y acidez de bacterias ácido lácticas que fueron aisladas del ciego y las heces de pollos criollos (Ajcet Reyes y Alfaro Martínez 2020). Con el objetivo de seleccionar aquellas cepas que presenten un mayor potencial probiótico y que puedan ser utilizadas para elaborar aditivos microbianos destinados a la dieta de polluelos o con posibilidad de usarse en humanos.

Entre los objetivos del estudio se estableció:

Definir valores D y valor Z para las cepas de bacterias ácido lácticas a distintas temperaturas.

Determinar la resistencia a sales biliares y pH *in vitro* de las cepas de bacterias ácido lácticas.

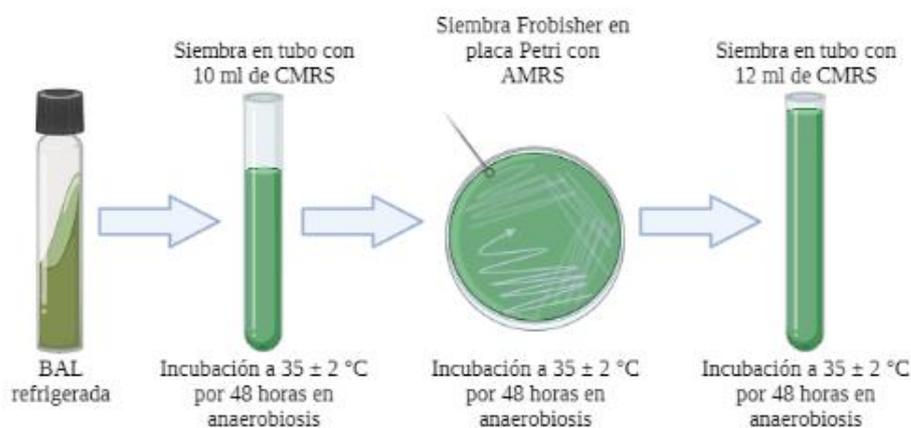
Materiales y Métodos

Reactivación y Crecimiento de Bacterias

Según la metodología de Ajcet Reyes y Alfaro Martínez (2020), para el estudio se utilizaron seis diferentes cepas de bacterias ácido lácticas (BAL). Para la reactivación, primero se tomó del cultivo que se encontraba en tubos inclinados en refrigeración y mediante el asa se inocularon 10 mL caldo Man Rogosa y Sharpe (CMRS) en tubos de rosca. Según las cepas se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 horas. Seguidamente, se tomó del cultivo en tubos de CMRS y mediante estriado de superficie con el asa se sembraron en platos Petri con agar Man Rogosa y Sharpe (AMRS). Se continuó la incubación a 35 ± 2 °C por 48 horas en condiciones anaerobias. Posteriormente, se tomó del cultivo de la placa Petri y se inoculó en tubos de 12 mL con medios de crecimiento CMRS mediante el asa de inoculación. Finalmente, se incubó nuevamente a 35 ± 2 °C durante un período de 24 horas en condiciones anaerobias (Figura 1).

Figura 1

Proceso de reactivación para una cepa de bacterias ácido lácticas.



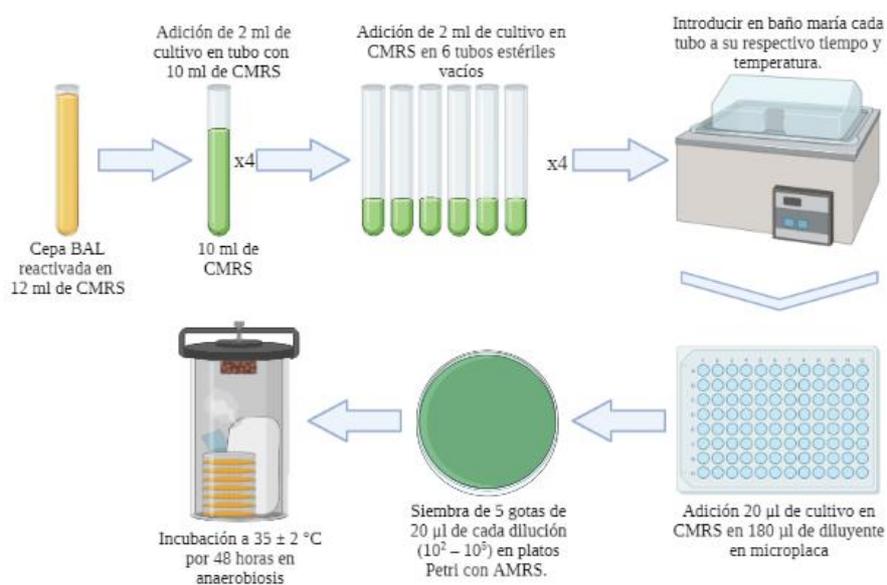
Resistencia Térmica

Se evaluó la resistencia térmica de las seis cepas de BAL a cuatro temperaturas diferentes (55, 60, 65 y 70 °C) a diferentes tiempos de exposición. A 55 y 60 °C hubo un tiempo de exposición a partir

de 5 a 30 minutos, en intervalos de 5 minutos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos). De otra manera, a 65 y 70 °C hubo un tiempo de exposición a partir de 30 a 180 segundos, en intervalos de 30 segundos (30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos). A partir del tubo de 12 mL con la suspensión bacteriana se transfirió 2 mL a cada uno de los seis tubos de los cuales cuatro tubos que representaron una muestra para cada temperatura. Cada uno de los cuatro tubos representó un tiempo de exposición diferente de cada muestra para cada temperatura. La prueba de resistencia térmica se realizó en baño maría a su respectivo tiempo y temperatura. Al finalizar el tiempo de exposición a la determinada temperatura, se colocó cada tubo por un minuto en agua con hielo para detener la exposición al calor. Seguidamente, mediante una micropipeta se tomó 20 µl de cultivo y se realizaron diluciones en 180 µl de diluyente en una microplaca. Se sembró cinco gotas de 20 µl de cada dilución ($10^2 - 10^5$) en platos Petri con AMRS. Seguidamente, las placas se incubo a 35 ± 2 °C por 48 horas (Figura 2). Todos los recuentos se expresaron en Log UFC/ml. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Figura 2

Proceso de prueba de resistencia térmica.



Estimación de Valor D

Mediante el programa ComBase, se generaron modelos lineales de inactivación de microorganismos para cada una de las cepas de BAL. El modelo es el resultado de la introducción de los logaritmos de UFC/ml de las bacterias sobrevivientes a cada temperatura en función del tiempo (en segundos) de exposición al tratamiento térmico. Se generaron las líneas de tendencia lineal en lo que representan la curva de tiempo de destrucción térmica (TDT) de las bacterias a cada una de las temperaturas a que fueron expuestas. A partir de esta curva de tiempo de destrucción térmica, se obtuvo la pendiente, el ajuste del modelo y el ajuste del modelo. Para estimar el valor D, se calculó el recíproco de la pendiente mediante la Ecuación 1 para conocer los segundos necesarios para reducir a un logaritmo de la carga bacteriana inicial.

$$\text{Valor D} = -\frac{1}{m} \quad [1]$$

Donde: m representa el recíproco de la pendiente obtenida a partir de la curva de tiempo de destrucción térmica.

Estimación de Valor Z

Se elaboró una gráfica en la cual se introdujeron las temperaturas utilizadas en el estudio en función de los logaritmos de los valores D. Se generaron las líneas de tendencia lineal en lo que se obtuvo la pendiente de la curva para y el ajuste del modelo. Para estimar el valor Z, se calculó el recíproco de la pendiente mediante la Ecuación 2 para conocer cuántos grados centígrados aumentar al tratamiento, para reducir el tiempo necesario para reducir a un logaritmo de la población bacteriana.

$$\text{Valor Z} = -\frac{1}{m} \quad [2]$$

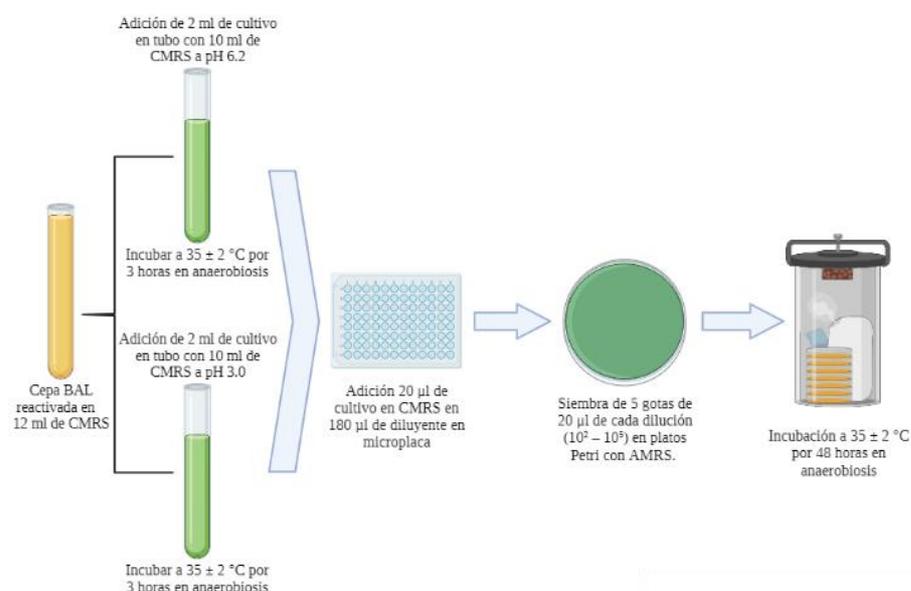
Donde: m representa el recíproco de la pendiente obtenida a partir de las curvas de tiempo de destrucción térmica.

Resistencia a pH Ácido

A partir del tubo de 12 mL con la suspensión bacteriana se transfirieron 2 mL para inocular un tubo con 10 mL de CMRS con pH ajustado de 3.0. La suspensión bacteriana se agitó en el vortex por un minuto para homogenizar la muestra. Seguidamente, se incubó la muestra a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por tres horas. Mediante una micropipeta se tomó 20 μl de cultivo a tiempo inicial ($t = 0 \text{ hrs}$) y tiempo final ($t = 3 \text{ hrs}$) y se realizó diluciones decimales en 180 μl de diluyente en una microplaca. Se sembró cinco gotas de 20 μl de cada dilución ($10^3 - 10^{10}$) en platos Petri con AMRS. Seguidamente, se incubaron las placas a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas en anaerobiosis (Figura 3). Todos los recuentos se expresaron en Log UFC/ml. Los experimentos se realizarán por triplicado.

Figura 3

Proceso de prueba de resistencia a pH ácido.



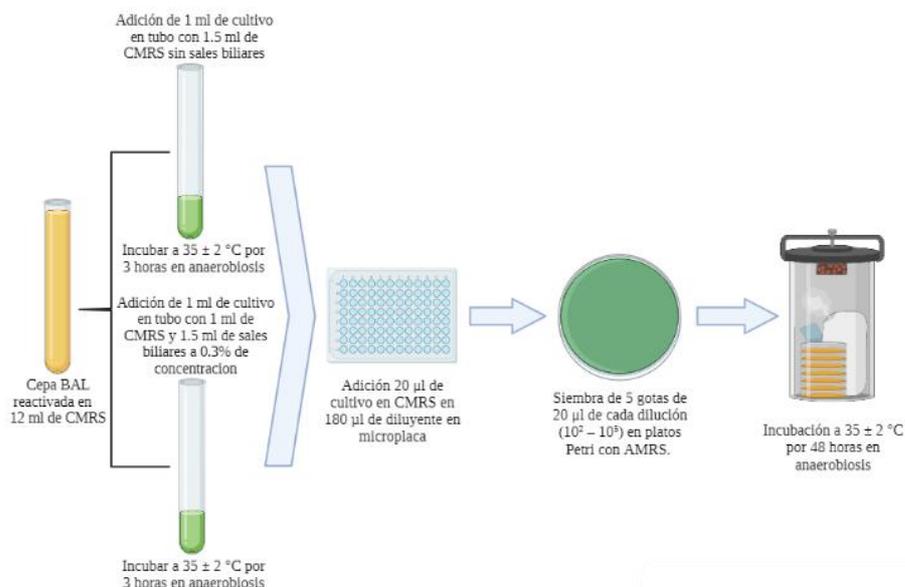
Resistencia en Sales Biliares

Se disolvió el extracto de bilis en polvo para obtener la solución bilis saturada. Seguidamente, se añadió a los tubos con CMRS a una concentración final del 0.3%. Seguidamente, a partir del tubo de 12 mL con la suspensión bacteriana se transfirió 1 mL para inocular un tubo con 1.5 mL de CMRS

con sales biliares. La suspensión bacteriana se agitó en el vortex por un minuto para homogenizar la muestra. Seguidamente, se incubó la muestra a 35 ± 2 °C por tres horas. Mediante una micropipeta se tomó 20 μ l de cultivo a tiempo inicial ($t = 0$ hrs) y tiempo final ($t = 3$ hrs) y se realizó diluciones decimales en 180 μ l de diluyente en una microplaca. Se sembró 5 gotas de 20 μ l de cada dilución ($10^2 - 10^5$) en platos Petri con AMRS. Seguidamente, las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 48 horas en condiciones anaerobias (Figura 4). Todos los recuentos se expresaron en Log UFC/ml⁻¹. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Figura 4

Proceso de prueba de resistencia a sales biliares.



Determinación del Porcentaje de Células Viables

El conteo de células viables se realizó por el método de conteo en placa en AMRS determinando el número de unidades formadoras de colonias. Se determinó el porcentaje de células viables de acuerdo con la Ecuación 3.

$$\text{Porcentaje de supervivencia (\%)} = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100 \quad [3]$$

Donde: N_1 representa las células viables total de cada uno de los tratamientos y N_0 representa el número inicial de bacterias ácido lácticas inoculadas (Cueto Vigil et al. 2010).

Diseño Experimental y Análisis Estadísticos

Resistencia a Temperatura

Los datos se tabularon y analizaron con el programa estadístico SAS® versión 9.3 (Statistical Analysis System). Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en un modelo lineal (GML) con una separación de medias Duncan. En la prueba de temperatura se evaluó seis tratamientos (C1, C2, C5, C7, H7.1 y H7.2) en cuatro temperaturas diferentes (55, 60, 65 y 70°C) en un total de tres repeticiones por tratamiento para tener 72 unidades experimentales por experimento. Los recuentos de las cepas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANDEVA) con una separación de medias Duncan, con un nivel de significancia de ≤ 0.05 .

Resistencia a pH y Sales Biliares

Los datos se tabularon y se analizaron con el programa estadístico SAS® versión 9.3 (Statistical Analysis System) A través de una prueba T. En el estudio de pH se evaluó los tratamientos de cuatro cepas en dos tiempos de exposición (0 – 3 horas). En sales biliares se evaluó los tratamientos de tres cepas en dos tiempos (0 -3 horas) y el control. Como variable dependiente fueron los recuentos que se expresarán en Log UFC/ml. Se realizo tres repeticiones para un total de 54 unidades experimentales por cada experimento.

Resultados y Discusión

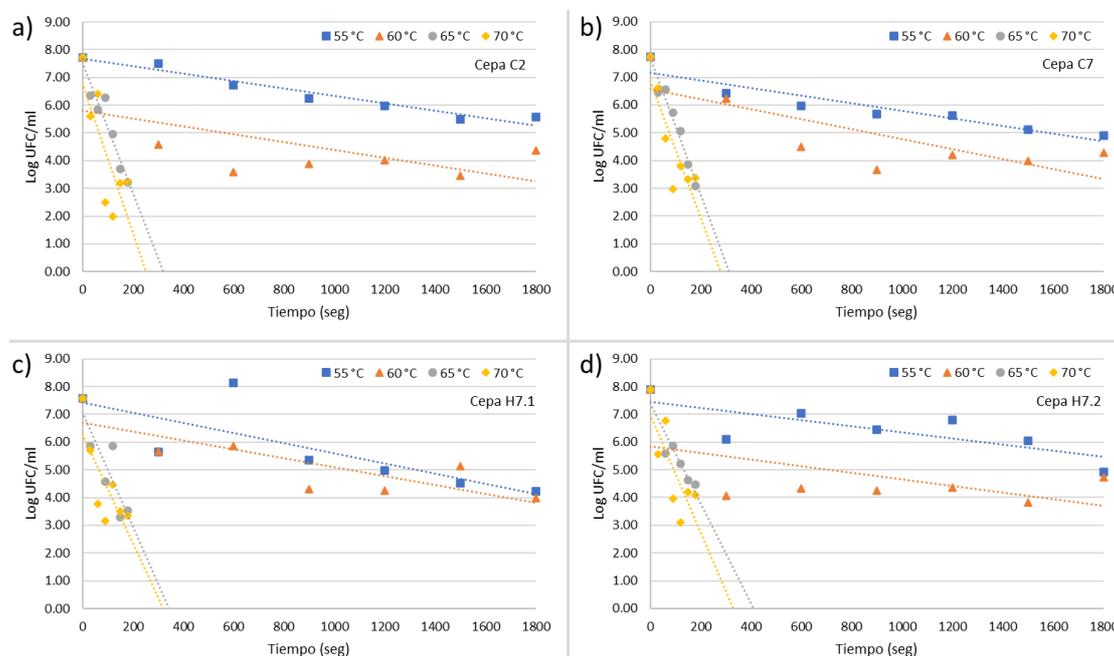
Análisis de Resistencia Térmica

Para el estudio, se utilizaron cuatro cepas procedentes del ciego (C1, C2, C5, C7) y dos procedentes de heces (H7.1, H7.2) de pollos criollos. En el estudio Ajcet Reyes y Alfaro Martínez (2020), aislaron y evaluaron parcialmente las características *in vitro* de las cepas a través de la revisión de morfología (baciliformes), tinción Gram (positiva) y prueba de Catalasa (negativa). Como resultado, las bacterias se identificaron como Bacterias Ácido Lácticas (BAL) del género *Lactobacillus*. Las cuales se presentan en la Figura 5 con su curva de tiempo de destrucción térmica.

En promedio todas las cepas tuvieron una carga inicial de 7.52 Log UFC/ml en todas las temperaturas el cual se puede ver los recuentos de las tres repeticiones en los Anexos A-F. Luego de pasar por el tratamiento térmico de 30 minutos a 55 y 60 °C, se obtuvo una carga final de 4.96 y 4.10 Log UFC/mL, respectivamente. Lo que implica una reducción de 2.56 Log₁₀, y 3.42 Log₁₀ de la suspensión bacteriana, respectivamente. Para 65 y 75 °C, las cuales son las temperaturas altas temperaturas en el estudio, se obtuvo una carga final de 3.19 y 3.39 Log UFC/mL, respectivamente. Lo que implica una reducción de 4.33 Log₁₀, y 4.13 Log₁₀ de la suspensión bacteriana, respectivamente. Se puede observar que cuando las cepas de BAL se calentaron a 65 y 75 °C, presentaron reducciones mayores en el número de bacterias en la suspensión en comparación a los tratamientos térmicos a 55 y 60 °C. Esto es debido que a medida que se aumenta la temperatura y el tiempo de exposición, mayores reducciones en la carga bacteriana se tendrán. Se puede ver todas las repeticiones realizadas para las cepas C1, C5, C2, C7, H7,1 y H7.2 en los Anexos G-I y en el Anexo J el promedio de las dos únicas repeticiones que se pudieron realizar en las cepas C1 y C5.

Figura 5

Curvas de sobrevivencia de bacterias ácido lácticas a diferentes temperaturas.



Nota. Cepas aisladas de ciego: (a) C2, (b) C7. Cepas aisladas de heces: (c) H7.1 y (d) H7.2.

En comparación con los resultado del estudio de Jordan y Cogan (1999), se demuestra la termorresistencia de otras bacterias del género *Lactobacillus* tales como *L. paracasei* y *L. plantarum*. Estas mostraron muy poca reducción en el número de células incluso después de 2 horas y 15 minutos al tratamiento térmico a 55 y 60 °C, respectivamente. Por otra parte, según León et al. (2006) consideraron en su estudio como cepas termorresistentes a todas aquellas que presentaran un crecimiento abundante igual o mayor que 300 UFC/mL a un tratamiento térmico a diferentes temperaturas (50, 60 y 70 °C), durante 30, 45 y 60 min. Las cepas *L. alimentarius*, *L. lactis* y *L. piscicola* reportaron conteos mayores a 300 UFC/mL, el resto de las cepas no sobrevivieron al tratamiento térmico.

Estimación de Valor D

Se evaluó la viabilidad y resistencia térmica de las seis cepas a distintas temperaturas, mediante la estimación del valor D en los Anexos de K - Q se encuentra el valor D de cada repetición por cepa. Este valor D, se refiere al periodo de tiempo necesario en segundos para lograr reducir 10

veces o en un ciclo logaritmo (90%) el número de microorganismos de una población dada, lo que se le denomina el tiempo de reducción decimal (Gomez Sanchez AI 2007). El valor D dependerá del tipo de microorganismo, de la temperatura y de las condiciones del medio (composición y pH) (Vázquez Aguilar 2007). Entre más alta sea la temperatura, más rápido será la destrucción de los microorganismos por lo tanto menor será el tiempo de tratamiento para lograr la destrucción de cierto cantidad de microorganismo (Pérez-Chabela et al. 2008). En otras palabras, entre más termotolerante sea un microorganismo, más elevado será el valor D y, por lo tanto, se requiere mayor tiempo para alcanzar una reducción del 90% de la población bacteriana. En el Cuadro 1 se muestra los valores D obtenidos de todas las cepas BAL. En los Anexos R y S se presenta más específico la resistencia térmica de las cepas C1 y C5.

Cuadro 1

Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.

Temperatura (°C)	Cepa	Pendiente	Valor D (seg.) ^{NS}	ES	R ²
55	C2	-0.0020	500	0.983	0.362
	C7	-0.0026	386	1.606	0.161
	H7.1	-0.0020	513	2.477	0.084
	H7.2	-0.0011	893	0.602	0.544
60	C2	-0.0107	93	1.479	0.444
	C7	-0.0055	183	1.034	0.649
	H7.1	-0.0033	300	2.391	0.118
	H7.2	-0.0013	763	1.450	0.209
65	C2	-0.0273	37	0.974	0.727
	C7	-0.0285	35	0.767	0.818
	H7.1	-0.0240	42	1.530	0.469
	H7.2	-0.0226	44	0.676	0.769
70	C2	-0.0685	15	1.114	0.759
	C7	-0.0735	14	0.846	0.811
	H7.1	-0.0673	15	1.316	0.574
	H7.2	-0.0423	24	0.847	0.775

Nota. Cepas aisladas de ciego: C2, C7. Cepas aisladas de heces: H7.1 y H7.2. R²: R-cuadrado. ES: Error Estándar. NS: No Significativa (Pr >

0.05). Se estimó en tres repeticiones independientes mediante el programa de combase.

El valor D, es un parámetro que nos indica la sensibilidad de un microorganismo al efecto de la temperatura. Se puede observar el análisis estadístico de la resistencia térmica expresada como valor D en el Anexo T. Se determinó mediante el análisis de varianza de los valores D para cada temperatura por medio de SAS 9.4 (Statistical Analysis System) utilizando la separación de medias

Duncan que todas las cepas BAL son estadísticamente igualmente resistentes en comparación entre cada una de las cepas. Se observó que no hubo diferencias estadísticas según la separación de medias Duncan en el Anexo U. En caso de utilizar la cepa H7.1, se obtuvo un valor $D_{(70)}$ fue de 15 segundos. Por lo cual, define que se requiere un tratamiento térmico a 70 °C durante 15 segundos para lograr que población microbiana de la cepa se reduzca en un 90% o en un ciclo logarítmico. Este valor incrementara a medida que se reduzca el tiempo del tratamiento térmico y viceversa (Capra et al. 2004). Estos valores D, brindan información útil para diseñar tratamientos térmicos para su aplicación en procesos industriales para la elaboración de alimentos (Angelis et al. 2004).

Estimación de Valor Z

La sensibilidad de los microorganismos a la temperatura se mide por el parámetro valor Z o constante de resistencia térmica. En los Anexos V-Z se muestra los valores Z de cada repetición por cepa que se realizó y en el Anexo AA el promedio de la C1 y C5 que solo obtuvieron dos repeticiones. El valor Z, se determina como el recíproco de la pendiente de la curva de tiempo de destrucción térmica en relación con el logaritmo de valor D y la temperatura. Se conoce como valor Z, es el cambio de temperatura en grados Celsius (°C) requeridos para modificar el valor D por un factor de 10 (un ciclo logarítmico). Los valores Z grandes, indican que se necesitan cambios grandes en la temperatura para afectar algún microorganismo o componente, esto define una alta resistencia térmica. Como muestra los resultados en el Cuadro 2 del valor Z para todas las cepas.

Cuadro 2

Valor Z para todas las cepas de bacterias ácido-lácticas.

Cepa	Pendiente	Valor Z (°C)
C2	-0.1002	9.98
C7	-0.1015	9.85
H7.1	-0.1094	9.14
H7.2	-0.1194	8.38

Nota. Cepas aisladas de ciego: C2, C7. Cepas aisladas de heces: H7.1 y H7.2. Se estimó con los datos de valor de 50 a 70 °C del promedio de tres repeticiones para cada cepa.

Para la incorporación del probiótico a la alimentación animal como un aditivo puede realizarse durante o después del procesamiento. La fabricación de los piensos implica procesos tales como peletización y extrusión que requiere altas temperaturas que pueden afectar la viabilidad de los probióticos (Nowroozi et al. 2004). El pienso típico para pollos de engorde se procesa a aproximadamente entre 72 a 85 °C durante 15-20 segundos (Kosin y Rakshit 2006). Aplicando el valor Z obtenido de la cepa H7.1, para un tratamiento térmico a 70 °C se requiere un tiempo de 15 segundos para reducir en un ciclo logarítmico la carga bacteriana. Sin embargo, con un valor Z de 9.14 °C, se debe de aumentar la temperatura a 79.14 °C para reducir el tiempo a emplear en el tratamiento térmico a 1.5 segundos. En resumen, al igual que un tratamiento a 70 y 79.14 °C, se obtendrá la misma destrucción de microorganismos a ambas temperaturas. En general, todas las cepas aisladas de heces (H7.1 y H7.2) con la curva de valor Z de estas dos cepas que se muestra en el Anexo BB y algunas de ciego (C2 y C7) que estén expuestas a tratamientos térmicos cercanos a 80 °C tendrían una reducción de un ciclo logarítmico entre los 1.4 y 2.4 segundos de tratamiento ilustrado en la curva del valor Z de estas dos cepas en el Anexo CC. Por lo tanto, dichas cepas reducirían su viabilidad por lo menos seis ciclos logarítmicos (99.9999%) no se determinó las de la cepa C1 y C5 debido a que solo se lograron dos repeticiones mostradas en el Anexo DD. En el Anexo EE se muestra las curvas constante de resistencia térmica para cada valor.

Para la elaboración de un pienso peletizados se requiere un proceso de molienda de la materia prima. Se colocan en una mezcladora y se transporta al acondicionador donde el alimento es sometido a un proceso térmico antes de ser peletizados (FAO 2003). Los piensos avícolas acondicionado a temperaturas de 85 °C por 20 segundos (Arencibia Arrebola et al. 2008). En caso de exponer a todas las cepas BAL a tales temperaturas, tendría un Valor $D_{(85)}$ de 2.70 segundos. Dicho proceso térmico sería capaz de inactivar completamente el cultivo bacteriano con una reducción de 7.5 logaritmos a los 20 segundos del tratamiento térmico. Por tal razón, que en este caso se recomienda que línea de

producción vaya orientada en agregar los cultivos bacterianos luego del acondicionamiento. Sin embargo, la mezcla final deberá someterse a un segundo acondicionamiento entre 60 – 65 °C por 20 segundos antes de ser peletizados (Kosin y Rakshit 2006). En tal caso, todas las cepas tendrían un Valor $D_{(65)}$ de 39.5 segundos, en promedio. Por lo tanto, las cepas BAL reducirían su viabilidad por lo menos dos ciclos logarítmicos (99%). Estas no se verían seriamente afectada, evitando la destrucción por completo del microorganismo. Por lo tanto, según los resultados obtenidos se podría definir a todas las cepas como termotolerante a temperaturas máximas de 65 °C. Por lo cual, deben de permanecer viables en los piensos por lo menos seis meses en vida anaquel (Kosin y Rakshit 2006). Así mismo, mantener su viabilidad por lo menos entre 10^6 UFC/g - 10^7 UFC/g (Maïmouna et al. 2005).

A partir de algunos estudios como el de Quinto et al. (2014), demuestran que las bacterias ácido lácticas termófilas han desarrollado sistemas de detección y defensas contra el estrés, lo que les permite soportar condiciones adversas y cambios ambientales repentinos (Alta y bajas temperaturas, acidez, salinidad, entre otras) En general, las bacterias pueden activar su respuesta al estrés por choque térmico es en cuestión de minutos (Mills et al. 2011). Debido a que, durante los tratamientos térmicos, la reducción en la población microbiana para temperaturas de 65 °C y ligeramente superior ocurre la desnaturalización del ribosoma y sitios clave en la síntesis de proteínas. Además, los daños causados en la pared celular pueden provocar la muerte de los microorganismos (León et al. 2006). Tal como explica Kim JAe et al. (2019) lo que sucede con el *Lactobacillus spp.* al exponerse a altas temperaturas. Para BAL, se han identificado la producción de proteínas extracelulares como mecanismo de regulación del estrés en la cual dan protección del ARNm de la degradación, protección a la pared celular y otras macromoléculas (Prasad et al. 2003).

Análisis de Resistencia a pH Ácido

Se desarrollaron pruebas de pH 3.0 a cuatro de las seis cepas evaluadas en resistencias térmicas debido a que lograron crecer y se pudieron hacer las tres repeticiones para su experimento. Las cuatro cepas fueron codificadas como C2, C7, H7.1 y H7.2, las distintas cepas de bacterias ácido

laticas fueron probadas a un pH 3.0 por un tiempo de exposición máximo de tres horas para evaluar su desempeño. La resistencia a pH 3.0 se evaluó con la disminución de las células bacterianas. Las cuatro cepas demostraron resistencia a pH 3.0, garantizando un paso seguro a través del sistema gastrointestinal. Específicamente las bacterias probióticas para poder llegar al sitio de acción y mantenerse viables, deben ser capaces de resistir el pH ácido y la presencia de sales biliares en el duodeno (Landa Salgado et al. 2019).

El Cuadro 3 muestra los resultados obtenidos del experimento en promedio y en el Anexo FF se muestra los resultados de cada repetición por cepa. Se sugiere que un buen probiótico debe tener la habilidad de soportar al menos un pH de 3.0 porque es un estándar común usado para examinar la tolerancia ácida de un probiótico (Kim JAe et al. 2019)

Cuadro 3

Sobrevivencia de bacterias ácido lácticas en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) a un pH ajustado de 3.0 con porcentaje de supervivencia.

Cepa	Media \pm D.E Log UFC/ml Inicial	Media \pm D.E Log UFC/ml Inicial	Probabilidad (P > F)	Porcentaje de supervivencia (%)
C2	7.7433 \pm 1.1346	7.6800 \pm 0.9777	0.8523	99.18%
C7	7.9800 \pm 0.2500	6.8400 \pm 1.7760	0.0389	85.71%
H7.1	7.2067 \pm 1.3159	7.5567 \pm 0.7316	0.4722	104.85%
H7.2	8.0333 \pm 0.4193	8.0267 \pm 0.6700	0.5629	99.92%

Nota. C: Cepas aisladas de ciego. H: Cepas aisladas de heces. D.E: Desviación Estándar.

De las cuatro cepas evaluadas la C7 fue la única que presentó una diferencia estadística comparada a las otras tres. Las cepas C2, H7.1 y H7.2 no presentaron diferencias estadísticas significativas dando a conocer su alta resistencia a un pH ácido. Como se puede observar en el Anexo GG que se compara la media inicial y final para saber si hubo o no diferencias estadísticas. Comparando los resultados entre las cepas, aunque la C7 presentó diferencias significativas no significa que no sea un probiótico, debido a que según el microorganismo de que sea, es posible que su pH óptimo estuviera más lejano del pH inicial con el que inicio su crecimiento (Kashket 1987). Por otro lado, otros autores reportan que la cepa P26 mostró menor tolerancia al pH ácido, presentando

un crecimiento bajo y similar a los pH de 4 y 5. Demostrando la baja capacidad de estas bacterias de ser probióticas debido a su baja tolerancia a pH ácidos (Ávila J et al. 2010). Debido a que son evaluadas diferentes tipos de cepas se puede asumir que entre ellas tiene un pH óptimo de crecimiento que varía y además el factor tiempo de tres horas influyó en su crecimiento. En condiciones normales el tiempo de tránsito gastrointestinal comprende de 2 a 4 horas y varía según el individuo (Cueto Vigil et al. 2010). Dando esto la razón del porque se evaluó la resistencia en un tiempo determinado de tres horas que es lo que generalmente tarda en transitar el tracto gastrointestinal. Se realizó una determinación del porcentaje de células viables de cada una de las cepas estudiadas para determinar el número de unidades formadoras de colonia. En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos de las seis cepas inicialmente seleccionadas que lograron pasar las tres repeticiones exitosamente.

La cepa H7.1 fue la que mostro el mayor porcentaje de supervivencia con 104.85% pero estadísticamente todas las cepas mostraron el mismo nivel de supervivencia debido a que no hubo diferencia estadística significativa como se puede observar en el Anexo II. A contrario de la cepa C7 que fue la bacteria que demostró el menor porcentaje de supervivencia con 85.71%. Según Rendón et al. (2008), se establece como criterio escoger aquellas cepas que resistan a un pH ácido por encima del 50% de porcentaje de supervivencia para pasar a la siguiente prueba de resistencia de sales biliares. Según los criterios establecidos, las cuatro cepas pudieron pasar a la siguiente prueba de sales biliares para determinar si podrían o no ser probióticas.

Las cepas C2, C7 demostraron una disminución en el recuento de log UFC/ml final comparado a la inicial. La cepa C7 fue la única que demostró una disminución de 1 Log UFC en comparación con las demás. Mientras que las demás cepas mostraron un aumento en su recuento demostrando que no solamente sobreviven por el contrario pueden crecer a un pH bajo. Esto se puede deber a que el pH no es el óptimo para el crecimiento de dicha cepa, pudiendo ser un pH más alto (> 3.0) más favorable para su crecimiento.

Existe una cantidad de propiedades que debe de presentar los microorganismos para que sean considerados como probióticos. Estos microorganismos deben de presentar un alto número de células viables, capaz de aportar un efecto beneficioso a su huésped. Adicionalmente no debe de ser patógena, no toxica, no mutagénica y no carcinogénica. Debe de ser capaz de sobrevivir y metabolizar en el sistema gastrointestinal. Debe de ser genéticamente estable, sin transferencia mecánica de plásmidos. Así mismo, debe ser fácil de reproducir y establecer en condiciones de campo y almacenamiento. Las cepas estudiadas demostraron un crecimiento o tolerancia apta a bajas condiciones de acidez, garantizando en este aspecto tu paso a través del sistema gastrointestinal.

Análisis de Resistencia en Sales Biliares

Debido a que no todas las cepas seleccionadas en el estudio inicial se reactivaron, se realizó la prueba a tres de ellas codificadas como C2, H7.1 y H7.2. La tolerancia a sales biliares fue estimada por medio de una comparación de células viables en MRS con y sin sales biliares. La resistencia a sales biliares es de suma importancia en la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal, por lo que es considerado un parámetro de importancia para poder evaluar si una bacteria ácido láctica es posiblemente probiótica. Se realiza con análisis de resistencia a pH y sales biliares debido a que son las condiciones que afectan la supervivencia bacteriana durante su paso a través de un modelo in vitro del trago gastrointestinal durante las dos horas que tarda la comida en atravesar el sistema (Cueto y Aragón 2012).

El Cuadro 4 muestra los resultados promediados de la resistencia de las tres cepas a una concentración de 0.3% de sales biliares en caldo MRS. En el Anexo II se muestra el recuento por cada repetición de cada cepa en su resistencia a sales biliares. En el estudio se tomó en cuenta la concentración en tiempo cero y en tiempo tres de incubación, ya con su recuento final. Por cada cepa se tomó un control el cual solo era caldo MRS con la cepa y otro de caldo MRS, cepa y la concentración de 0.3% de sales biliares. La tolerancia a los ácidos y la bilis es el primer criterio para la selección de bacterias probióticas (Nawong 2015). Existen bacterias que normalmente no se pueden adaptar a las

condiciones gastrointestinales debió a que no se logran adaptar resistir las condiciones extremas de sales biliares. Por eso mismo, es esencial que el potencial probiótico de las bacterias de *Lactobacillus* debe de ser capaces de crecer entre 0.15-0.3 de sales biliares a un pH entre 5-3 (Nawong 2015).

Cuadro 4

Resistencia de bacterias ácido lácticas en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) a una concentración de sales biliares de 0.03% con porcentaje de supervivencia.

Cepa	Media ± D.E Log UFC/ml Inicial	Media ± D.E Log UFC/ml Inicial	Probabilidad (P > F)	Porcentaje de supervivencia (%)
C2 Control	5.9400 ± 0.6161	6.6500 ± 0.1400	0.0982	111.95 %
C2 SB	5.9533 ± 0.1762	4.1667 ± 0.3215	0.4619	69.99 %
H7.1 Control	6.4200 ± 0.3936	6.5900 ± 0.1015	0.1247	102.64 %
H7.1 SB	5.0700 ± 0.6509	3.6300 ± 0.5484	0.8302	71.60 %
H7.2 Control	6.8467 ± 0.1436	7.9267 ± 0.0651	0.3405	115.77 %
H7.2 SB	5.9167 ± 0.9372	4.8600 ± 1.8749	0.3999	82.14 %

Nota. C: Cepas aisladas de ciego. H: Cepas aisladas de heces. D.E: Desviación Estándar

De las tres cepas expuestas a concentraciones de 0.3% ninguna de ellas mostró diferencia estadística significativa demostrando en si su tolerancia a sales biliares debido a que tuvieron una $P > 0.05$. El control de las tres cepas demostró sobrevivir y mantenerse debido a que no estuvieron expuestas a una ninguna concentración, se mantuvieron bajo sus condiciones normales de crecimiento como se puede ver en el análisis estadístico individual de cada cepa en el Anexo JJ. Las tres cepas fueron previamente estudiadas en un análisis de resistencia a pH de 3.0, e igualmente demostraron sobrevivir a estas concentraciones de sales biliares.

De las tres cepas expuesta la que tuvo un mayor porcentaje de supervivencia en presencia de sales biliares fue la cepa H7.2 con un porcentaje de supervivencia de 82.14% pero estadísticamente ninguno de ellas demostró diferencias estadísticas significativas demostrando todas ser capaz de sobrevivir una concentración de 0.3% de sales biliares. Lo cual se puede observar en el anexo KK la separación de medias Duncan de las cepas. Por el contrario de la cepa C2 la cual fue la que demostró un menor porcentaje de supervivencia con un 69.99%. Como reporto Rondón et al 2008 en su estudio que también todas las cepas fueron capaces de resistir y crecer en presencia de las sales biliares.

Demostrando que las cepas seleccionadas de *Lactobacillus* pueden ser capaces de desconjugar las sales biliares y así poder pasar por el tracto gastrointestinal. Garantizando de esta manera su paso seguro, pero tomando en cuenta también otros factores como lo es la temperatura y la baja acidez en pH.

Conclusiones

Las cuatro cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de ciegos y heces de pollos criollos del género *Lactobacillus* sp. mostraron la misma tolerancia a tratamientos térmicos, a una temperatura máxima de 65 °C para ser utilizados como aditivo microbiano en la elaboración de piensos de consumo avícola. Por ende, se concluye que las cepas son capaces de resistir tratamientos térmicos industriales de acondicionamiento para peletizado.

Las cepas demostraron una capacidad de resistencia a pH 3.0 y una resistencia a exposiciones de sales biliares con 0.3% de concentración demostrando su paso seguro a través del tracto gastrointestinal.

Recomendaciones

Se recomienda realizar más estudios *in vitro* para extender los criterios de preselección de cepas potencialmente probióticas, tales como producción de compuestos inhibitorios, cuantificación de ácido láctico y resistencia a antibióticos comerciales.

Adicionalmente, se deberían realizar evaluaciones *in vivo* del potencial probiótico, tales como la eficacia de las cepas, inhibición de patógenos, capacidad de colonización y aumento de peso, demostrando así la proliferación contra cepas patógenas.

Una vez seleccionado la cepa probiótica, se recomienda que se realicen pruebas de identificación de la especie de las bacterias mediante PCR y también, realizar una evaluación de costos.

Referencias

- Ajcet Reyes MI, Alfaro Martínez KE. 2020. Evaluación del crecimiento de bacterias ácidolácticas aisladas de un gallo criollo en biopreparado y análisis de su actividad probiótica *in vitro*. [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 41 p; [consultado el 5 de may. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6916/1/AGI-2020-T002.pdf>.
- Angelis M de, Di Cagno R, Huet C, Crecchio C, Fox PF, Gobbetti M. 2004. Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 70(3):1336–1346. doi:10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004.
- Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LA, Gámez Menéndez R. 2008. Métodos generales de conservación de microorganismos. Cuba: Finlay Ediciones. ISBN: 978-959-7076-20-9.
- Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H. 2010. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica*; [consultado el 27 de may. de 2021]. 20(2):161–169. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95912322007.pdf>.
- Capra ML, Quiberoni A, Reinheimer JA. 2004. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in applied microbiology.* 38(6):499–504. eng. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01525.x.
- Cifuentes Orjuela G. 2018. Aislamiento, identificación y caracterización de nuevos probióticos con propiedades funcionales para su aplicación en alimentación. [Tesis]. España: Gloria Cifuentes Orjuela, Universidad Autónoma de Barcelona; [consultado 12 de sept. de 2020]. https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2018/hdl_10803_664178/gco1de1.pdf.
- Cueto C, Aragón S. 2012. Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*; [consultado el 5 de may. de 2021]. 1:45–50. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5113786.pdf>.
- Cueto Vigil M, Acuña Monsalve Y, Valenzuela Riaño J. 2010. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol*; [consultado el 5 de may. de 2021]. 32(93):129–138. <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v32n93/v32n93a1.pdf>.
- Díaz López EA, Isaza JA, B DA. 2017. Probióticos en la avicultura: una revisión. *Rev. Med. Vet.* 1(35):175–189. doi:10.19052/mv.4400.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2003. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma (Italia); [consultado 23/05/21]. <http://www.fao.org/3/Y1390S/y1390s0k.htm>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2006. Probióticos en los alimentos: propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma (Italia): FAO. 46 p.
- Fontana L, Bermudez Brito M, Plaza Diaz J, Muñoz Quezada S, Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr.* 109(2):35-50. doi:10.1017/S0007114512004011.
- Gomez Sanchez AI. 2007. Microorganismos de importancia en el tratamiento termico de alimentos acidos y alta acidez. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*; [consultado el 2 de dic. de 2021]. 1:24–32. http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/lapb/Tratamiento_termico_.pdf.

- Hernández García SF, Rodríguez Fernández JC, Valdez Paneca G, Virginia Zbrun M, Calero Herrera I. 2019. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista de Salud Animal*; [consultado el 23 de ago. de 2020]. 41(1):1–13. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1008>.
- Jordan KN, Cogan TM. 1999. Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in applied microbiology*. 29(2):136–140. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00607.x.
- Kashket ER. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*. 46(3):233–244. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02463.x.
- Kim JA, Bayo J, Cha J, Choi YJ, Jung MY, Kim DH, Kim Y. 2019. Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry. *PLoS One*. 14(6):e0218922. doi:10.1371/journal.pone.0218922.
- Kosin B, Rakshit SK. 2006. Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technol. Biotechnol*; [consultado el 6 de abr. de 2021]. 44(3):371–379.
- Landa Salgado P, Caballero Cervantes Y, Ramírez Bribiesca E, Hernandez Anguiano AM, Ramírez Hernández LM, Espinosa Victoria D, Hernández Sánchez D. 2019. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10(1):68–83. doi:10.22319/rmcp.v10i1.4512.
- Lara Mantilla C, Burgos Portacio Á. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev. Colomb. Biotechnol*; [consultado el 5 de may. de 2021]. 14(1):31–40. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotechnologia/article/view/31697>.
- León V, Totosaus A, Guerrero I, Pérez Chabela ML. 2006. Efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(2):135–141. doi:10.1080/11358120609487684.
- Mack DR. 2005. Probiotics. *Canadian family physician*; [consultado el 23 de may. de 2021]. 51(11):1455–1464. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479485/>.
- Maïmouna D, Dauphin RD, Roblain D, Guiro AT, Thonart P. 2005. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*. 4(5):409–421.
- Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. 2011. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microb Cell Fact*. 10 Suppl 1:S19. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S19.
- Nawong S. 2015. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from cassava pul for cholesterol lowering property [Thesis Ph.D]. Thailand: Suranaree University of Technology; [consultado 4 de junio de 2021]. <http://203.158.7.72/jspui/bitstream/123456789/6134/1/Fulltext.pdf>.
- Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M. 2004. Study of lactobacillus as probiotic bacteria. *J Publ Health*; [consultado 12 de sept. de 2020]. 2(1):1–7. https://www.researchgate.net/publication/237806792_Study_of_Lactobacillus_as_Probiotic_Bacteria.
- Perez Chabela ML, Ramirez Chavarin NL. 2007. Utilización de bacterias lácticas termorresistentes como probióticos en productos cárnicos cocidos. *NACAMEH*; [consultado el 9 de dic. de 2020]. 1(2):87–96.

- Pérez-Chabela ML, Totosa A, Guerrero I. 2008. Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(1):132–138. doi:10.1590/S0101-20612008000100019.
- Prasad J, McJarrow P, Gopal P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* 69(2):917–925. doi:10.1128/AEM.69.2.917–925.2003.
- Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *FNS.* 05(18):1765–1775. doi:10.4236/fns.2014.518190.
- Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, Laurencio M, Pérez M. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria.* 6(1):56–63. doi:10.1080/11358120809487628.
- Vázquez Aguilar MM. 2007. Fundamentos de la determinación de parámetros cinéticos para microorganismos de interés en un tratamiento térmico de alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*; [consultado el 6 de mar. de 2021]. 5(1):1–14. <https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No1-Vol-1/TsIA-1%281%29-Vazquez-Aguilar-2007.pdf>.

Anexos

Anexo A

Recuentos de la cepa C1 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	2.36	2.36	0	2.36	2.36
2	0	6.85	6.85	0	6.85	6.85
3	0	NE	NE	0	NE	NE
1	300	4.59	ND	30	ND	0.52
2	300	6.64	3.70	30	4.54	6.54
3	300	NE	NE	30	NE	NE
1	600	4.44	ND	60	ND	0.52
2	600	6.17	2.28	60	5.58	6.77
3	600	NE	NE	60	NE	NE
1	900	4.20	ND	90	ND	1.00
2	900	6.16	5.98	90	ND	3.98
3	900	NE	NE	90	NE	NE
1	1200	4.04	1.12	120	ND	1.60
2	1200	6.06	2.34	120	5.46	3.89
3	1200	NE	NE	120	NE	NE
1	1500	3.79	ND	150	ND	ND
2	1500	5.58	3.21	150	2.49	3.96
3	1500	NE	NE	150	NE	NE
1	1800	3.33	0.82	180	ND	ND
2	1800	5.44	4.25	180	5.66	5.36
3	1800	NE	NE	180	NE	NE

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo B

Recuentos de la cepa C2 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	6.50	6.50	0	6.50	6.50
2	0	8.49	8.49	0	8.49	8.49
3	0	8.17	8.17	0	8.17	8.17
1	300	6.35	2.22	30	6.35	5.60
2	300	ND	6.48	30	ND	ND
3	300	8.67	5.07	30	ND	ND
1	600	5.73	2.67	60	5.83	6.40
2	600	ND	4.82	60	ND	ND
3	600	7.71	3.30	60	ND	ND
1	900	5.33	2.10	90	6.26	ND
2	900	6.64	5.84	90	6.30	3.35
3	900	6.74	3.70	90	ND	1.65
1	1200	5.12	2.59	120	4.62	ND
2	1200	6.79	5.44	120	5.24	2.97
3	1200	6.04	ND	120	5.04	1.00
1	1500	5.11	2.09	150	2.45	3.50
2	1500	6.77	4.82	150	2.76	3.19
3	1500	4.59	ND	150	5.86	2.88
1	1800	4.73	2.62	180	2.67	3.65
2	1800	6.72	5.20	180	3.21	3.67
3	1800	5.28	5.31	180	3.76	2.45

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo C

Recuentos de la cepa C5 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	6.35	6.35	0	6.35	6.35
2	0	7.58	7.58	0	7.58	7.58
3	0	NE	NE	0	NE	NE
1	300	5.55	6.69	30	ND	2.65
2	300	6.87	4.10	30	ND	ND
3	300	NE	NE	30	NE	NE
1	600	5.54	6.18	60	ND	ND
2	600	6.71	4.13	60	6.53	6.86
3	600	NE	NE	60	NE	NE
1	900	5.55	5.81	90	ND	ND
2	900	5.86	4.17	90	6.25	3.74
3	900	NE	NE	90	NE	NE
1	1200	5.47	5.59	120	ND	ND
2	1200	6.37	3.95	120	4.32	4.77
3	1200	NE	NE	120	NE	NE
1	1500	5.49	5.64	150	ND	ND
2	1500	5.98	5.54	150	5.69	6.22
3	1500	NE	NE	150	NE	NE
1	1800	5.34	5.55	180	ND	ND
2	1800	6.08	4.04	180	3.29	ND
3	1800	NE	NE	180	NE	NE

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo D

Recuentos de la cepa C7 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	7.44	7.44	0	7.44	7.44
2	0	7.66	7.66	0	7.66	7.66
3	0	8.13	8.13	0	8.13	8.13
1	300	ND	5.02	30	6.45	6.66
2	300	4.72	6.25	30	ND	6.55
3	300	8.13	7.44	30	ND	ND
1	600	6.47	3.71	60	6.53	4.30
2	600	3.54	5.31	60	6.59	5.30
3	600	7.90	ND	60	ND	ND
1	900	5.35	5.28	90	6.52	3.14
2	900	4.06	2.08	90	4.94	3.87
3	900	7.63	ND	90	ND	1.92
1	1200	5.03	4.67	120	4.10	3.89
2	1200	4.62	4.68	120	4.47	3.73
3	1200	7.22	3.30	120	6.59	3.79
1	1500	4.37	4.61	150	2.69	2.65
2	1500	3.32	3.35	150	4.51	4.27
3	1500	7.64	ND	150	4.34	3.07
1	1800	4.05	2.99	180	2.85	ND
2	1800	3.78	4.14	180	3.52	4.91
3	1800	6.87	5.74	180	2.84	1.85

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo E

Recuentos de la cepa H7.1 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	8.53	8.53	0	8.53	8.53
2	0	5.79	5.79	0	5.79	5.79
3	0	8.42	8.42	0	8.42	8.42
1	300	ND	3.54	30	ND	ND
2	300	2.96	ND	30	5.87	5.71
3	300	8.35	7.80	30	ND	ND
1	600	ND	3.95	60	ND	4.87
2	600	ND	ND	60	ND	2.69
3	600	8.15	7.77	60	ND	ND
1	900	6.58	3.37	90	ND	2.58
2	900	1.85	1.90	90	2.54	1.48
3	900	7.64	7.63	90	6.61	5.39
1	1200	5.60	3.16	120	5.28	4.31
2	1200	1.70	2.04	120	ND	ND
3	1200	7.67	7.57	120	6.42	4.64
1	1500	4.55	2.68	150	3.18	4.43
2	1500	1.60	ND	150	2.15	3.17
3	1500	7.43	7.58	150	4.56	2.95
1	1800	3.19	3.31	180	3.14	4.16
2	1800	2.52	1.70	180	2.57	1.48
3	1800	7.00	6.93	180	4.89	4.40

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo F

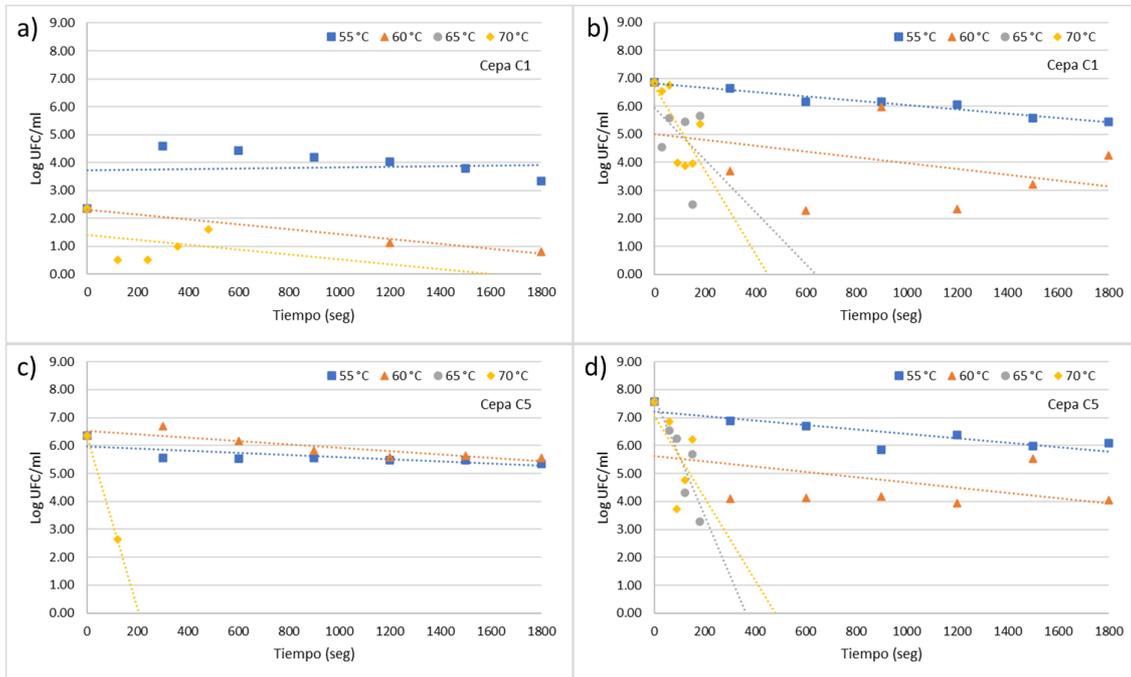
Recuentos de la cepa H7.2 obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	Seg.	55°C Log UFC/ml	60°C Log UFC/ml	Seg.	65°C Log UFC/ml	70°C Log UFC/ml
1	0	8.09	8.09	0	8.09	8.09
2	0	8.36	8.36	0	8.36	8.36
3	0	7.21	7.21	0	7.21	7.21
1	300	ND	4.50	30	ND	ND
2	300	6.10	3.64	30	ND	ND
3	300	ND	ND	30	ND	5.56
1	600	6.85	5.75	60	ND	6.77
2	600	ND	2.44	60	ND	ND
3	600	7.20	4.77	60	5.60	ND
1	900	6.77	4.46	90	6.58	3.89
2	900	ND	3.68	90	ND	4.66
3	900	6.14	4.65	90	5.15	3.30
1	1200	6.55	ND	120	5.72	3.66
2	1200	6.66	3.30	120	5.91	2.52
3	1200	7.21	5.44	120	4.02	3.11
1	1500	5.92	3.47	150	4.82	5.06
2	1500	6.59	3.46	150	5.05	4.13
3	1500	5.62	4.52	150	3.97	3.38
1	1800	ND	3.50	180	4.79	4.19
2	1800	4.92	4.73	180	4.30	4.60
3	1800	ND	5.93	180	4.33	3.46

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo G

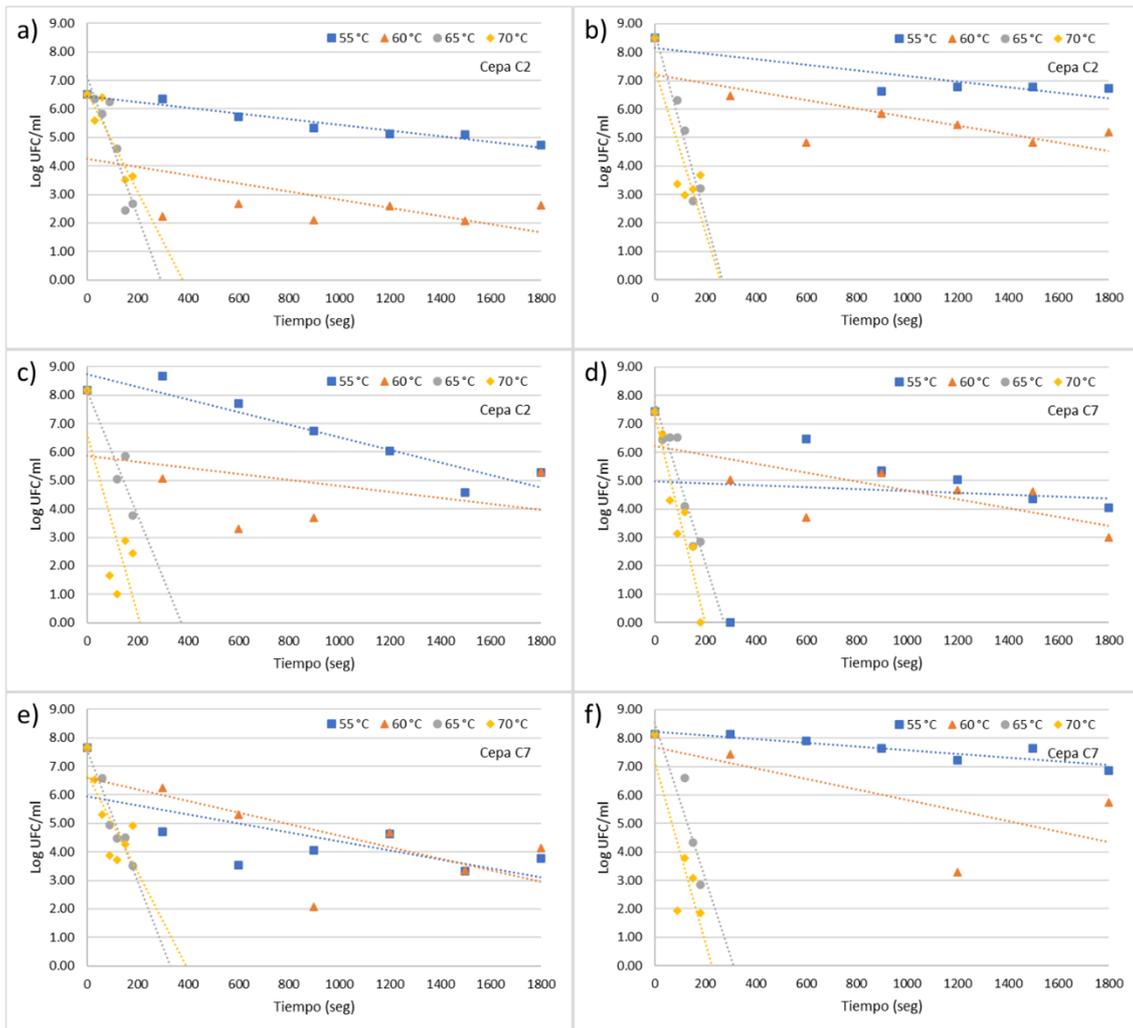
Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa C1 y C5.



Nota. (a) primera repetición C1, (b) segunda repetición C1, (c) primera repetición C5, (d) segunda repetición C5.

Anexo H

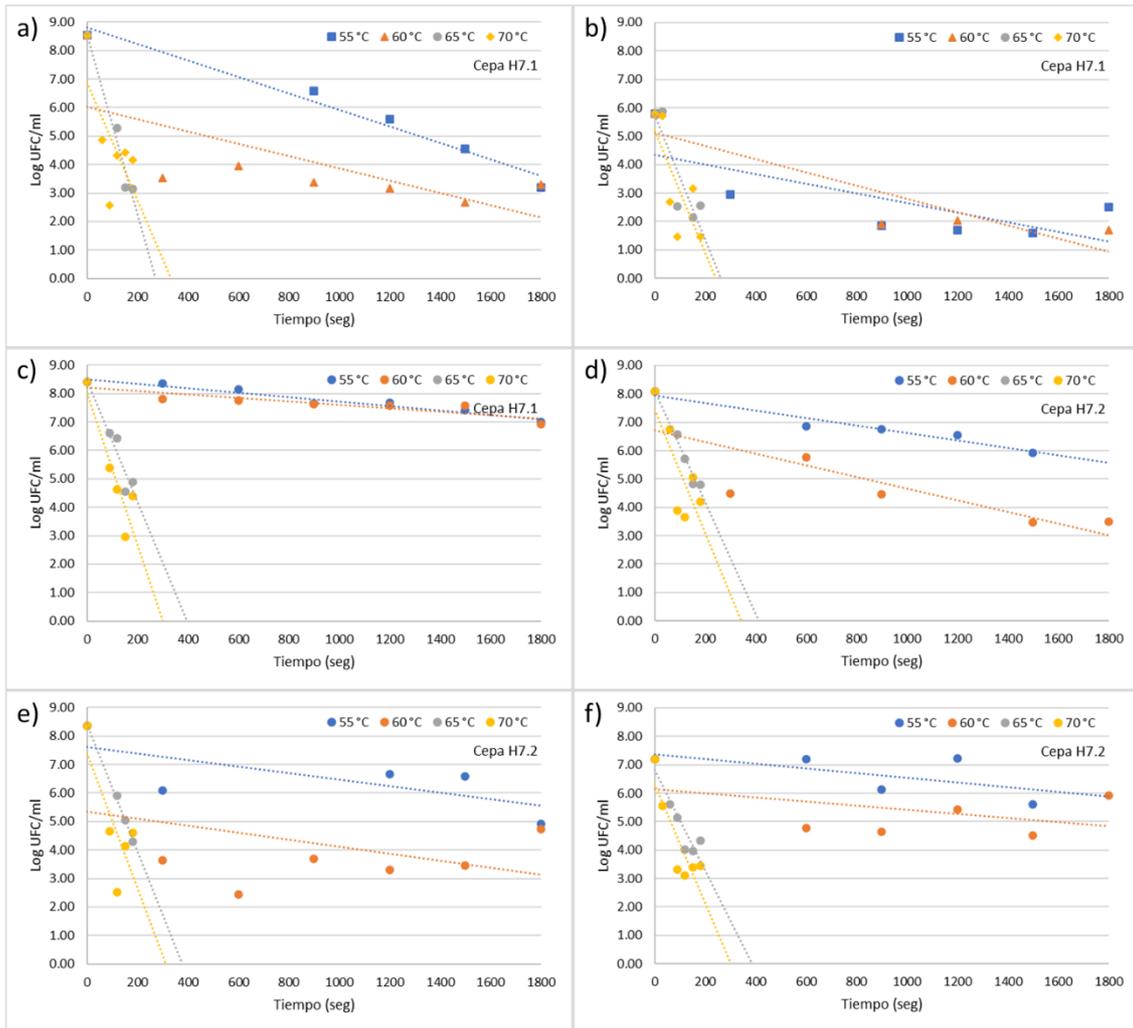
Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa C2 y C7.



Nota. (a) primera repetición C2, (b) segunda repetición C2, (c) tercera repetición C2, (d) primera repetición C7, (e) segunda repetición C7, (f) tercera repetición C7.

Anexo I

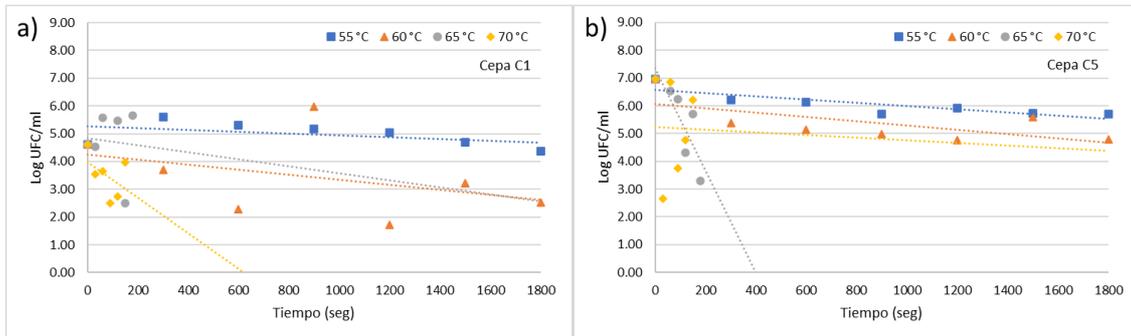
Curva de sobrevivencia térmica de cada repetición de la cepa H7.1 y H7.2.



Nota. (a) primera repetición H7.1, (b) segunda repetición H7.1, (c) tercera repetición H7.1, (d) primera repetición H7.2, (e) segunda repetición H7.2, (f) tercera repetición H7.2.

Anexo J

Curvas de sobrevivencia de la cepa C1 y C5 de bacterias ácido láctica a diferentes temperaturas.



Nota. Cepas aisladas de ciego: (a) C1, (b) C5.

Anexo K

Valor D para la cepa C1 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0001	9259	3.97
1	60	-0.0009	1135	3.06
1	65	ND	ND	ND
1	70	-0.0009	1153	3.06
2	55	-0.0016	637	2.80
2	60	-0.0121	83	1.92
2	65	-0.0129	78	1.89
2	70	-0.0279	36	1.55

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo L

Valor D para la cepa C2 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0018	562	2.75
1	60	-0.0014	699	2.84
1	65	-0.0423	24	1.37
1	70	-0.0187	53	1.73
2	55	-0.0010	1021	3.01
2	60	-0.0069	145	2.16
2	65	-0.0616	16	1.21
2	70	-0.0698	14	1.16
3	55	-0.0037	268	2.43
3	60	-0.0105	95	1.98
3	65	-0.0218	46	1.66
3	70	-0.0316	32	1.50

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo M

Valor D para la cepa C5 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0028	353	2.55
1	60	-0.0016	613	2.79
1	65	ND	ND	ND
1	70	ND	ND	ND
2	55	-0.0017	592	2.77
2	60	-0.0009	1060	3.03
2	65	-0.0239	42	1.62
2	70	-0.0309	32	1.51

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo N

Valor D para la cepa C7 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0025	403	2.61
1	60	-0.0082	122	2.09
1	65	-0.0394	25	1.40
1	70	-0.0846	12	1.07
2	55	-0.0100	101	2.00
2	60	-0.0061	164	2.22
2	65	-0.0545	18	1.26
2	70	-0.0503	20	1.30
3	55	-0.0013	800	2.90
3	60	-0.0038	260	2.42
3	65	-0.0629	16	1.20
3	70	-0.0317	32	1.50

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo O

Valor D para la cepa H7.1 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0038	265	2.42
1	60	-0.0183	55	1.74
1	65	-0.0327	31	1.49
1	70	-0.0653	15	1.19
2	55	-0.0095	105	2.02
2	60	-0.0054	186	2.27
2	65	-0.0390	26	1.41
2	70	-0.1330	8	0.88
3	55	-0.0009	1156	3.06
3	60	-0.0021	483	2.68
3	65	-0.0224	45	1.65
3	70	-0.0432	23	1.36

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo Q

Valor D para la cepa H7.2 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
1	55	-0.0013	752	2.88
1	60	-0.0034	297	2.47
1	65	-0.0333	30	1.48
1	70	-0.0421	24	1.38
2	55	-0.0012	870	2.94
2	60	-0.0182	55	1.74
2	65	-0.0269	37	1.57
2	70	-0.0458	22	1.34
3	55	-0.0013	794	2.90
3	60	-0.0007	1408	3.15
3	65	-0.0284	35	1.55
3	70	-0.0553	18	1.26

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo R

Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de la cepa C1 de bacterias ácido lácticas.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
55	-0.0020	495	2.69
60	-0.0011	926	2.97
65	-0.0025	400	2.60
70	0.0205	49	1.69

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo S

Resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de la cepa C5 de bacterias ácido lácticas.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (seg)	Log Valor D
55	-0.0015	658	2.82
60	-0.0054	187	2.27
65	-0.0252	40	1.60
70	-0.0272	37	1.57

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Seg: Segundos.

Anexo T

Análisis estadístico para comparación de la resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.

R ²	C.V. (%)	Raíz MSE	MEDIA (VD)
0.648408	119.4461	290.5776	243.2708

Nota. R²: R-cuadrado. C.V. (%): Coeficiente de variación. Raíz MSE: Raíz cuadrado medio del error. VD: Valor D (segundos).

Source	Mean Square	Pr > F
REP	126070.271	0.2448
TEMPERATURA	895075.910	0.0001
REP*TEMPERATURA	46260.660	0.7667
CEPA	89315.410	0.3854
CEPA*TEMPERATURA	28256.539	0.9543

Nota. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

Anexo U

Separación de medias Duncan del Valor D de la resistencia térmica (expresado como valor D en segundos) de cepas de bacterias ácido lácticas.

Cepa	Media (VD)	Separación Duncan
H7.2	361.83	A
C2	247.92	A
H7.1	199.83	A
C7	163.50	A

Nota. ^{ab}: medias con letras minúsculas iguales en la misma fila indican que no existen diferencias significativas entre los valores D de cada cepa de bacterias ácido lácticas ($Pr > 0.05$).

Anexo V

Valor Z para la cepa C1 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	-0.0516	19.38
2	-0.0755	13.24
3	NE	NE

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo W

Valor Z para la cepa C5 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	-0.0479	20.87
2	-0.1038	9.63
3	NE	NE

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo X

Valor Z para la cepa C7 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	-0.1056	9.47
2	-0.0613	16.32
3	-0.1085	9.21

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo Y

Valor Z para la cepa H7.1 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	-0.0794	12.60
2	-0.0859	11.64
3	-0.1226	8.16

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo Z

Valor Z para la cepa H7.2 a partir de todas las repeticiones.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	-0.1099	9.10
2	-0.0994	10.06
3	-0.1306	7.66

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo AA

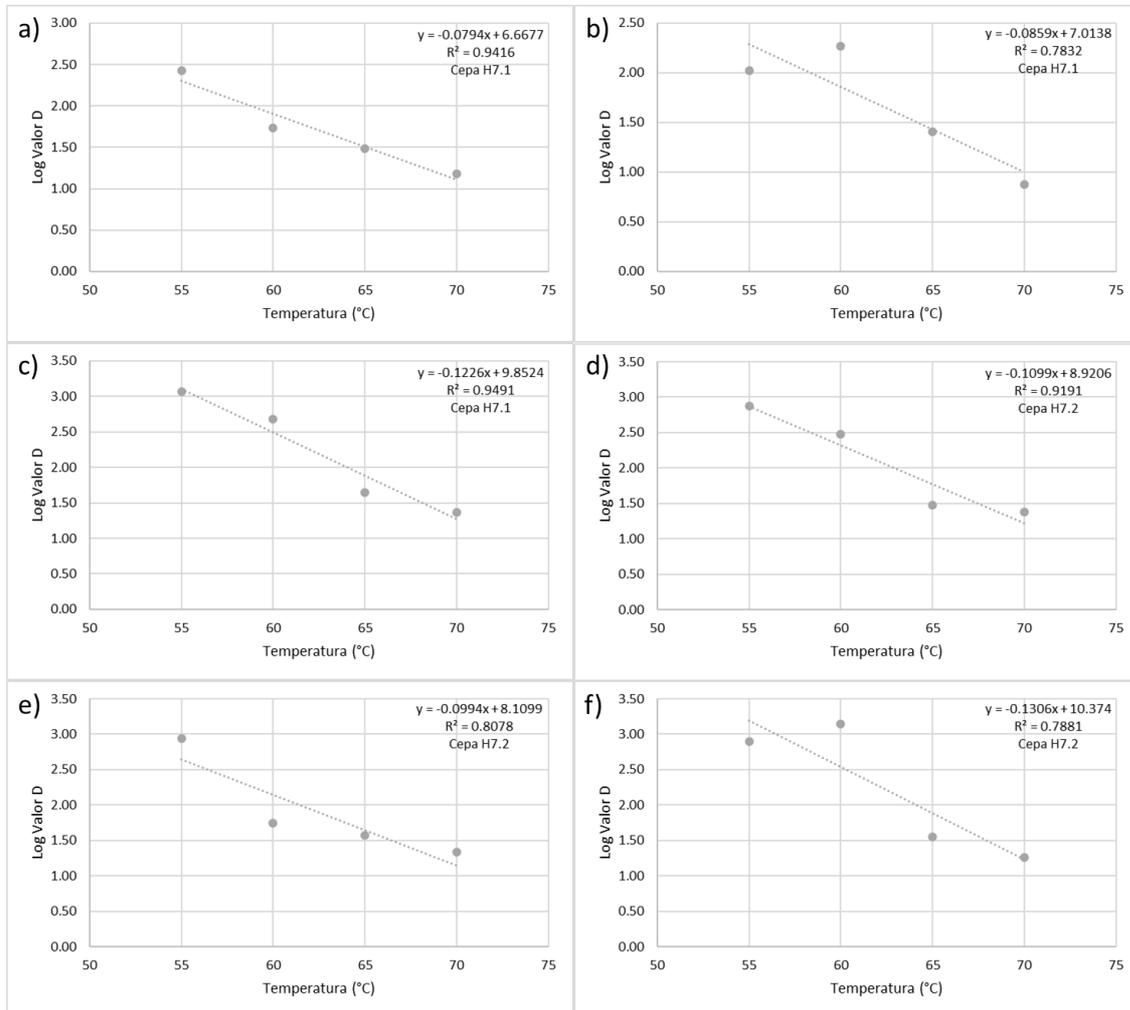
Valor Z para la cepa C1 y C5 de bacterias ácido lácticas a las diferentes temperaturas.

Cepa	Pendiente	Valor Z (°C)
C1	-0.0677	14.78
C5	-0.0886	11.28

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. °C: Grados Celsius.

Anexo BB

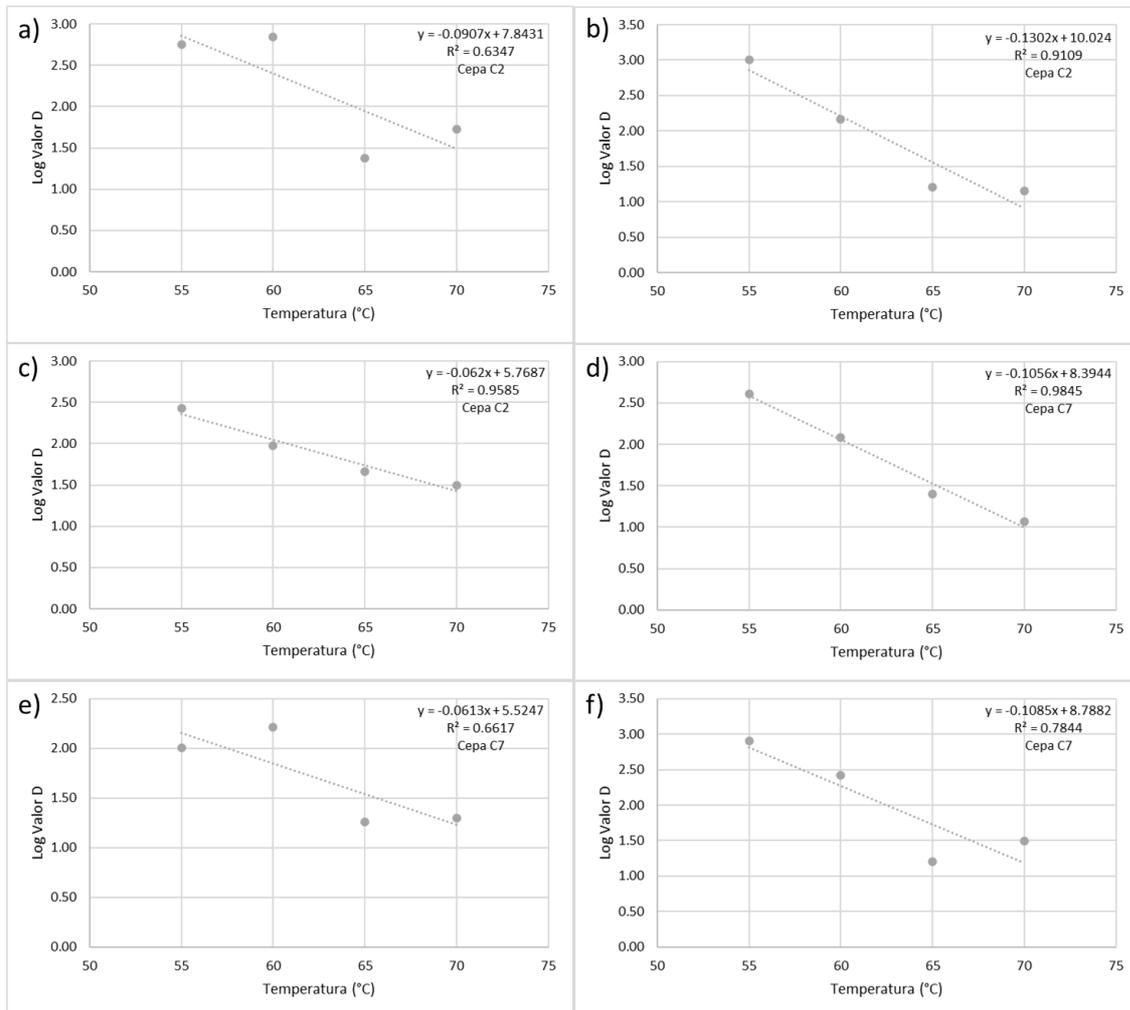
Curva de valor Z de cada repetición de la cepa H7.1 y H7.2.



Nota. (a) primera repetición H7.1, (b) segunda repetición H7.1, (c) tercera repetición H7.1, (d) primera repetición H7.2, (e) segunda repetición H7.2, (f) tercera repetición H7.2.

Anexo CC

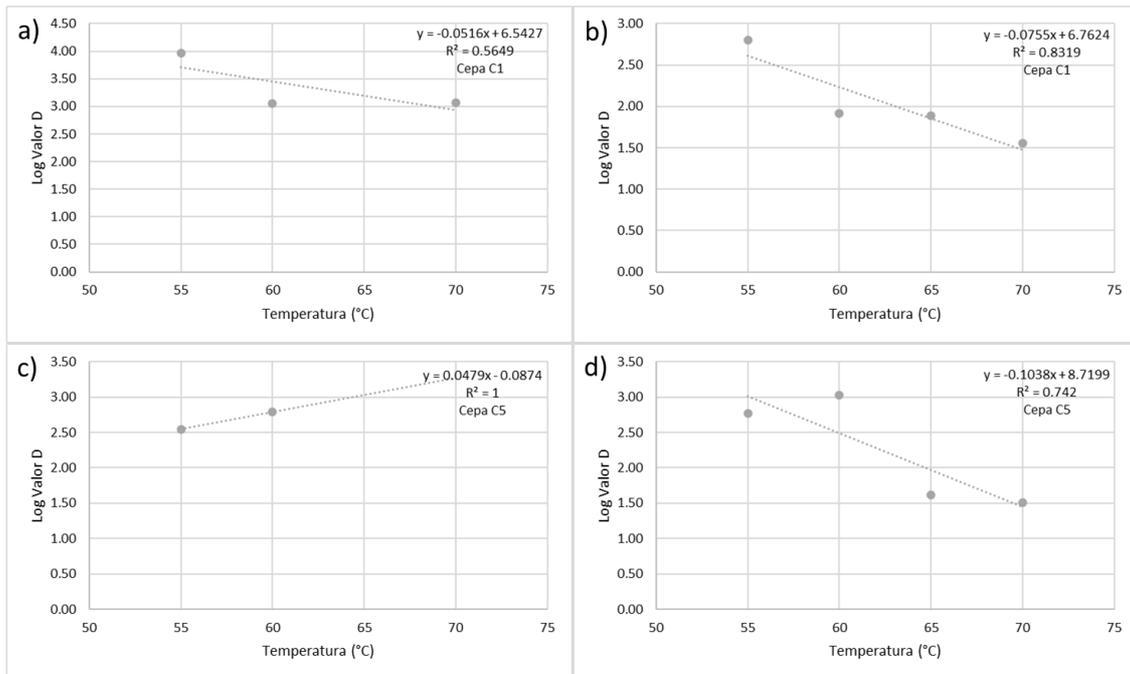
Curva de valor Z de cada repetición de la cepa C2 y C7.



Nota. (a) primera repetición C2, (b) segunda repetición C2, (c) tercera repetición C2, (d) primera repetición C7, (e) segunda repetición C7, (f) tercera repetición C7.

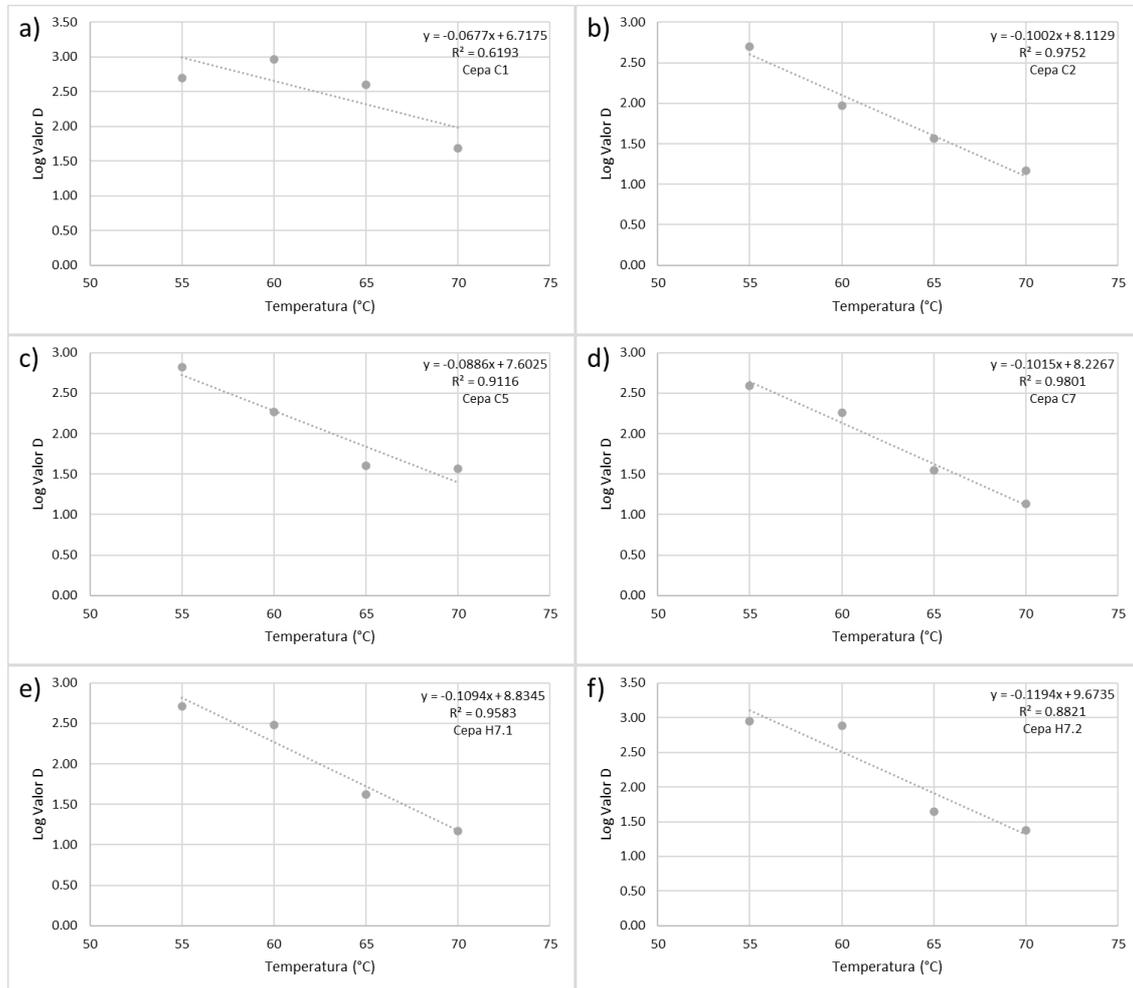
Anexo DD

Curva de valor Z de cada repetición de la cepa C1 y C5.



Nota. (a) primera repetición C1, (b) segunda repetición C1, (c) primera repetición C5, (d) segunda repetición C5.

Anexo EE

Curvas constante de resistencia térmica (valor Z) de bacterias ácido láctica.

Nota. Cepas aisladas de ciego: (a) C1 (b) C2 (c) C5 (d) C7. Cepas aisladas de heces: (e) H7.1 y (f) H7.2.

Anexo FF

Recuentos de todas las cepas obtenidos a partir de las tres repeticiones de las pruebas de resistencia

a pH.

Rep.	Tiempo (hrs)	C1 Log UFC/ml	C2 Log UFC/ml	C5 Log UFC/ml	C7 Log UFC/ml	H7.1 Log UFC/ml	H7.2 Log UFC/ml
1	Inicial	2.06	6.44	6.33	7.68	8.55	8.25
1	Final	2.48	6.58	ND	6.77	8.39	8.71
2	Inicial	ND	8.51	8.15	7.73	5.92	8.30
2	Final	7.54	8.45	8.15	8.65	7.26	8.02
3	Inicial	NE	7.52	NE	7.53	6.45	6.86
3	Final	NE	7.31	NE	6.20	6.32	6.66

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Hrs: Horas. Inicial: 0 hrs. Final: 3 hrs.

Anexo GG

Análisis estadístico para comparación de la resistencia a acidez (expresado en Log UFC/ml) de las cepas bacterias ácido lácticas.

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
C2 FINAL	6.8400	1.7760	0.8523
C2 INICIAL	7.9800	0.2500	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
C7 FINAL	7.5567	0.7316	0.0389
C7 INICIAL	7.2067	1.3159	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.1 FINAL	7.5567	0.7316	0.4722
H7.1 INICIAL	7.2067	1.3159	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.2 FINAL	8.0267	0.6700	0.4722
H7.2 INICIAL	8.0333	0.4193	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

Anexo HH

Separación de medias Duncan del Log UFC/ml de la resistencia a acidez de cepas de bacterias ácido lácticas.

Cepa	Media (Log UFC/ml)	Separación Duncan
H7.1	106.31	A
H7.2	99.85	A
C2	97.96	A
C7	86.23	A

Nota. ^{ab}: medias con letras minúsculas iguales en la misma fila indican que no existen diferencias significativas entre los valores D de cada cepa de bacterias ácido lácticas ($Pr > 0.05$).

Anexo II

Recuentos de todas las cepas obtenidos a partir de las tres repeticiones de las pruebas de resistencia

a sales biliares.

Rep.	Prueba	Tiempo (hrs)	C1 Log UFC/ml	C2 Log UFC/ml	C5 Log UFC/ml	C7 Log UFC/ml	H7.1 Log UFC/ml	H7.2 Log UFC/ml
1	Control	Inicial	NE	6.04	NE	NE	6.14	6.74
1	Control	Final	NE	6.75	NE	NE	6.68	7.86
2	Control	Inicial	NE	5.28	NE	NE	6.25	7.01
2	Control	Final	NE	6.49	NE	NE	6.48	7.99
3	Control	Inicial	NE	6.50	NE	NE	6.87	6.79
3	Control	Final	NE	6.71	NE	NE	6.61	7.93
1	SB	Inicial	NE	5.79	NE	NE	5.59	5.50
1	SB	Final	NE	4.40	NE	NE	3.00	3.30
2	SB	Inicial	NE	5.93	NE	NE	4.34	5.26
2	SB	Final	NE	3.80	NE	NE	3.89	4.34
3	SB	Inicial	NE	6.14	NE	NE	5.28	6.99
3	SB	Final	NE	4.30	NE	NE	4.00	6.94

Nota. ND: Datos fuera de rango. NE: Datos no evaluados. Rep: Repetición. Hrs: Horas. Inicial: 0 hrs. Final: 3 hrs.

Anexo JJ

Análisis estadístico para comparación de la resistencia a sales biliares (expresado en Log UFC/mL) de las cepas bacterias ácido lácticas.

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
C2 CONTROL FINAL	6.6500	0.1400	0.0982
C2 CONTROL INICIAL	5.9400	0.3557	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
C2 SB FINAL	4.1667	0.3215	0.4619
C2 SB INICIAL	5.9533	0.1762	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.1 CONTROL FINAL	6.5900	0.1015	0.1247
H7.1 CONTROL INICIAL	6.4200	0.3936	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.1 SB FINAL	3.6300	0.5484	0.8302
H7.1 SB INICIAL	5.0700	0.6509	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.2 CONTROL FINAL	7.9267	0.0651	0.3405
H7.2 CONTROL INICIAL	6.8467	0.1436	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

TRT	Mean (Log UFC/ml)	Std Dev	Pr > F
H7.2 SB FINAL	4.8600	1.8749	0.3999
H7.2 SB INICIAL	5.9167	0.9372	

Nota. TRT: Tratamiento. Mean: Media. Std Dev: Desviación estándar. Pr > F: Probabilidad (Pr > 0.05).

Anexo KK

Separación de medias Duncan del Log UFC/mL de la resistencia a sales biliares de cepas de bacterias ácido lácticas.

Cepa	Media (Log UFC/ml)	Separación Duncan
H7.2 Control	115.79	A
C2 Control	112.63	A
H7.1 Control	12.89	A B
H7.2 Sales Biliares	80.59	C B
H7.1 Sales Biliares	72.01	C
C2 Sales Biliares	70.03	C

Nota. ^{ab}: medias con letras minúsculas iguales en la misma fila indican que no existen diferencias significativas entre los valores D de cada

cepa de bacterias ácido lácticas ($Pr > 0.05$).