



# EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS Y SU POTENCIAL USO EN ALIMENTACIÓN DE AVES DE CORRAL

## EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR GROWTH OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR POTENTIAL USE IN POULTRY FEEDING

<sup>1</sup>Ana Karen de la Rosa, <sup>2</sup>Andrea Vásquez García, <sup>3</sup>Sandra Patricia Betancourt, <sup>4</sup>Edgar Niño Andrade, <sup>5</sup>Diego Fernando Bermúdez Medina, <sup>6</sup>Keisy Stephani Diaz Arce <sup>7</sup>Juan Alberto Ascacio, <sup>8</sup>Liliana Londoño-Hernández

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, México

<sup>2,5,6,8</sup>Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

<sup>3</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

<sup>4</sup>Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA, Colombia

<sup>7</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, México

Recibido: 20/10/2023 Aprobado 20/11/2023

### RESUMEN

En Colombia la industria avícola ha mostrado un crecimiento constante en los últimos años, sin embargo, conforme con este aumento el uso de antibióticos para mantener la salud animal también se ha incrementado ocasionando la aparición de cepas resistentes tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* generando un problema de salud pública. Múltiples estudios han demostrado que el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) con capacidad antimicrobiana puede ser empleadas en alimentación animal, disminuyendo el uso de antibióticos. Para el uso industrial de BAL es necesario encontrar medios de cultivos económicos y adecuados para la recuperación y crecimiento de las cepas. Por lo cual, durante el presente estudio se buscará la concentración

*Citación: De La Rosa, A. K. ., Vasquez García, A. ., Betancourt , S. P. ., Andrade, E. N. ., Bermúdez Medina, D. F. ., Diaz Arce, K. S. ., Ascacio, J. A. ., & Londoño Hernández, L. . (2023). Evaluación de medios de cultivos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas y su potencial uso en alimentación de aves de corral. Publicaciones E Investigación, 17(4). <https://doi.org/10.22490/25394088.7507>*

<sup>1</sup>anaesteban@uadec.edu.mx / <https://orcid.org/0009-0001-8791-5777>

<sup>2</sup>andrea.vasquez@unad.edu.co / <https://orcid.org/0000-0002-6387-3269>

<sup>3</sup>sandra.patricia.betancourt@correounivalle.edu.co / <https://orcid.org/0000-0001-8323-6438>

<sup>4</sup>enino@sena.edu.co / <https://orcid.org/XXXXXXX>

<sup>5</sup>dfbermudezm@unadvirtual.edu.co / <https://orcid.org/XXXXXXX>

<sup>6</sup>ksdiaz@unadvirtual.edu.co / <https://orcid.org/0009-0008-6109-7877>

<sup>7</sup>alberto\_ascaciovaldes@uadec.edu.mx / <https://orcid.org/0009-0006-3544-6290>

<sup>8</sup>liliana.londono@unad.edu.co / <https://orcid.org/0000-0002-5288-5272>

<https://doi.org/10.22490/25394088.7507>



adecuada de los sustratos leche de soya, suero de leche, azúcar y salvado de trigo que permitan el crecimiento de BAL aisladas de intestino de gallinas para su posterior uso en alimentación animal. Para esto, se realizaron cinéticas de fermentación a 24 h, tomando la viabilidad de las BAL cada 6 h durante 24 h. Se encontró que la mejor concentración de los sustratos donde se alcanzó una viabilidad similar al medio de cultivo comercial fue 15,76 g/L azúcar, 14,24 g/L suero de leche y 10,00 g/L de leche de soya, lo cual muestra que el uso de sustratos alternativos para la elaboración de medios de cultivo puede ser factible en la producción de BAL.

**Palabras clave:** biotecnología, optimización, residuos agroindustriales.

## ABSTRACT

XIn Colombia, the poultry industry has shown a constant growth in recent years, however, in line with this increase, the use of antibiotics to maintain animal health has also been increasing, causing the appearance of resistant strains such as *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter*, generating a public health problem. Multiple studies have shown that the use of probiotic bacteria (LAB) with antimicrobial capacity can be used in animal feed, reducing the use of antibiotics. For the industrial use of LAB, it is necessary to find economical and adequate culture media for the recovery and growth of the strains. For this reason, during the present study, the adequate concentration of the substrate soy milk, whey, sugar, and wheat bran will be sought to allow the growth of LAB isolated from chicken intestine for their subsequent use in animal feed. For this purpose, 24 h fermentation kinetics were performed, taking the viability of LAB every 6 h during 24 h. It was found that the best substrate concentration where viability like the commercial culture medium was achieved was 15.76 g/L sugar, 14.24 g/L whey and 10.00 g/L soy milk, which shows that the use of alternative substrates for the elaboration of culture media can be feasible in the production of LAB.

**Keywords:** Agro-industrial waste, biotechnology, optimization.



## 1. INTRODUCCIÓN

En los procesos de cría de pollos, es común el uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Su uso, busca la reducción de la población microbiana que causa enfermedades en las aves, presentando beneficios para el avicultor. Entre estos beneficios incluyen la mejora en ganancia de peso, en el índice de conversión de alimento y la reducción de la morbilidad. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda no utilizar antibióticos en animales sanos para estimular su crecimiento. El uso indebido de los antibióticos en animales, es la causa de la antibiorresistencia, que pone en riesgo la salud humana y dificulta el control de las enfermedades (OMS, 2017).

Debido a lo anterior, en los últimos años se han buscado tratamientos alternativos que mantengan la salud de las aves, garantice su crecimiento y permitan tener un sistema productivo estable. Entre estos, el uso de microorganismos probióticos para el control de patógenos ha ganado importancia. Los probióticos son microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos beneficiando la microbiota que se encuentra en el intestino. Comúnmente la mayoría de las bacterias ácido lácticas (BAL) se reconocen como probióticos, sin embargo, se han encontrado propiedades similares en levaduras del género *Saccharomyces*. Estos microorganismos forman parte de la población beneficiosa del tracto digestivo,



participan en procesos fermentativos, mejorando la respuesta inmune y la asimilación de algunos compuestos como los minerales (Tripathi & Giri, 2014).

Para el crecimiento de las BAL se requiere una mezcla equilibrada de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno y azufre, y factores de crecimiento) que en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas permiten el adecuado crecimiento de los microorganismos (Caycedo *et al.*, 2021), entre esas condiciones se encuentran la temperatura, grado de humedad, presión de oxígeno, grado correcto de acidez o alcalinidad (García *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta los requerimientos de cada microorganismo en particular y de los fines del investigador, se ha desarrollado una gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y usos (Gómez & Batista, 2006).

También, es importante mencionar que después de obtener un medio de cultivo que permita el crecimiento de las BAL, es necesario proteger a los microorganismos del medio externo garantizando su disponibilidad, funcionalidad y liberación en el tiempo adecuado. Existen diversas técnicas usadas para la formación de las cápsulas entre las cuales se encuentran: spray drying, extrusión, lecho fluidizado, coaservación, cocrystalización, entre otras. Así mismo, existen diferentes materiales que pueden ser usados como encapsulantes (Đorđević *et al.*, 2014; Poshadri & Aparna, 2010). Por lo cual, durante el presente estudio se buscó la concentración adecuada de los sustratos leche de soya, suero de leche, azúcar y salvado de trigo que permitan el crecimiento de BAL aisladas de intestino de gallinas para su posterior uso en alimentación animal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivar las cepas BAL

Se usó la bacteria ácido láctica (BAL) F3G3M1-2 reconocida por pruebas bioquímicas API 50CHL (Biomérieux - Francia) como *Lactobacillus rhamnosus* aislada la fase anterior “Caracterización de microorganismos probióticos aislados de gallinas criollas (*Gallus*

*gallus domesticus*) para la producción de pollos de engorde en el Valle del Cauca”. Para la experimentación la BAL se inoculó en caldo de cultivo comercial MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h.

### 2.2 Parámetros de selección del medio de cultivo

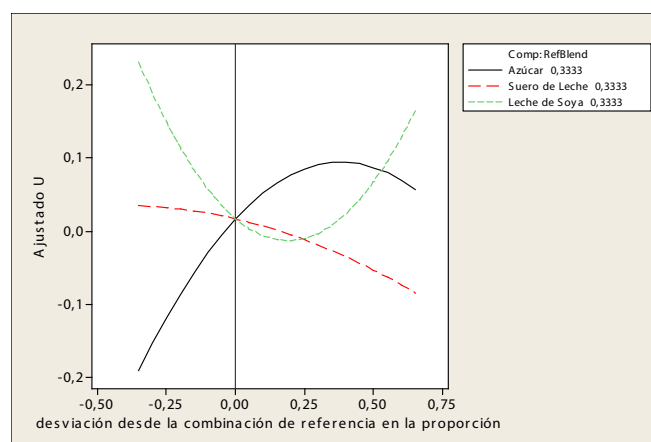
La cepa *L. rhamnosus* fue probada en tres medios de cultivo buscando encontrar las concentraciones adecuadas de sustrato para el crecimiento de los microorganismos. Las cinéticas de fermentación se efectuaron en Erlenmeyer con 200 mL de medio experimental a 37 °C, en agitación constante en Shaker. Durante la fermentación se midieron el pH, azúcares reductores y se realizó el conteo de células viables UFC/mL por diluciones sucesivas. Se tomaron muestras a las 0, 6, 12 y 24 h. Los datos se analizaron usando un diseño experimental de mezclas de tres componentes con tres réplicas, teniendo como variable respuesta la velocidad de crecimiento microbiano. Como medio de referencia se utilizó caldo MRS y para los demás medios se variaron las concentraciones de suero de leche, leche de soya y azúcar entre 10 – 20 g/L. La elección del sustrato se realizó comparando el medio patrón para el crecimiento de BAL (caldo MRS) con los resultados obtenidos en los ensayos de células viables y pH. Los rendimientos deben ser iguales o mayores a los que se observen en el medio patrón.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la metodología descrita se llevaron a cabo 30 experimentos de acuerdo con lo propuesto en el diseño de mezclas. Con los valores de viabilidad obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento microbiano encontrando que el valor más alto fue de 0.47 h<sup>-1</sup> en el medio con 15 g/L suero de leche, 10 g/L leche de soya y 15 g/L azúcar. A las 24 h el valor más bajo de pH fue 4.72 para el medio con 15 g/L suero de leche, 15 g/L leche de soya y 10 g/L de azúcar, mientras que la concentración más baja de azúcares reductores fue de 15.454 mg/L en el medio con 16,67 g/L suero de leche, 11,67 g/L leche de soya, y 11,67 g/L azúcar. En el medio de cultivo control se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0.30 h<sup>-1</sup>, un valor de pH 8.07 y azúcares reductores de 101.72 mg/L a las 24 h.

El análisis estadístico para la variable respuesta mostró diferencias significativas para la velocidad de crecimiento con valores entre  $-0.27 - 0.47$  h<sup>-1</sup>. El gráfico por componentes (Figura 1) muestra la tendencia generada por cada material utilizado en el medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento, encontrando que tanto el azúcar como el suero de leche tienen un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento del microorganismo, mientras que la leche de soja tiene un efecto negativo, esto puede deberse a que la bacteria *L. rhamnosus* es capaz de metabolizar la lactosa presente en el suero de leche y la sacarosa, sin embargo,

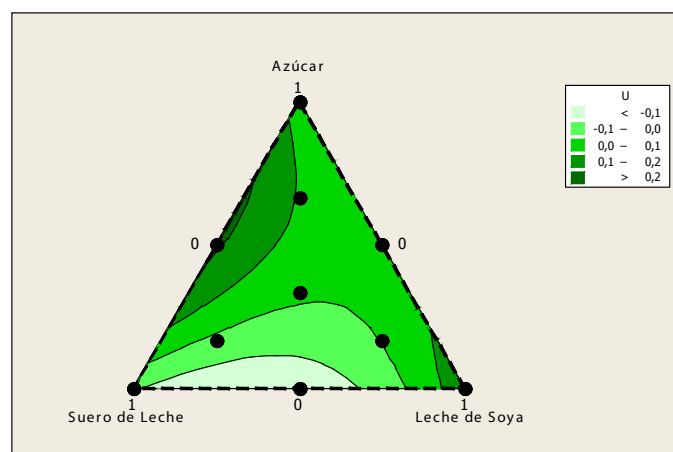
no es capaz de metabolizar las fuentes de carbono tales como rafinosa y estaquiosa presentes en la leche de soja (Capurso, 2019; Petrut *et al.*, 2019). Así mismo, el microorganismo puede usar las proteínas del suero de leche como fuente de nitrógeno. Resultados similares encontraron Wang *et al.* (2020) quienes desarrollaron un medio de cultivo para *Lactobacillus rhamnosus* LS-8, indicando que a una concentración de 62.5 g/L de suero de leche, 50 g/L de jarabe de maltosa, 55 g/L de licor de maíz, 1 g/L de NaCl y 0.05 g/L de lisina se alcanza una concentración de  $4.5 \times 10^9$  UFC/mL a una velocidad de  $0.345$  h<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Gráfica de rastreo de respuesta viabilidad ajustada vs. componentes del medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Así mismo, para conocer el comportamiento de los componentes del medio de cultivo sobre la viabilidad del microorganismo, se realizó un gráfico de contorno (Figura 2) donde las regiones en verde oscuro denotan

la mayor velocidad de crecimiento encontrando que a una concentración alta de azúcar y concentración media de suero de leche y leche de soja se encuentran los mayores valores de velocidad de crecimiento.



**Figura 2.** Gráfica de contorno para la velocidad de crecimiento vs. componentes del medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Aplicando la función de deseabilidad, para alcanzar un valor óptimo de velocidad de crecimiento microbiano del medio de cultivo comercial ( $0.30 \text{ h}^{-1}$ ), se encontró que la concentración adecuada de los componentes es  $15,76 \text{ g/L}$  azúcar,  $14,24 \text{ g/L}$  suero de leche y  $10,00 \text{ g/L}$  de leche de soya, obteniendo una velocidad de crecimiento estimada de  $0.22 \text{ h}^{-1}$  y un ajuste del 74 %.

#### 4. CONCLUSIONES

El uso de fuentes no convencionales para el desarrollo de medios de cultivos industriales para el crecimiento de bacterias ácido lácticas es posible, logrando valorizar y aprovechar subproductos generados en la agroindustria. Durante esta investigación se optimizó un medio de cultivo para el desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus* lo cual muestra el potencial para la producción de probióticos que puedan ser usados en la alimentación animal.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Sennova por la financiación del proyecto “Aplicación de microorganismos probióticos aislados de gallinas criollas en la producción de pollos de engorde en el Valle del Cauca – Fase 2”, a la Universidad Autónoma de Coahuila y a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia –UNAD– por su apoyo científico.

#### REFERENCIAS

- Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53, S1-S41.
- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452-490.
- García, C., Arrázola Paternina, G., & Durango, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2), 9-26. <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>
- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24.
- OMS (2017). Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animals-effectiveness/es/>
- Petrut, S., Rusu, E., Tudorache, I. S., Pelinescu, D., Sarbu, I., Stoica, I., & Vassu, T. (2019). Influence of various carbon sources on growth and biomass accumulation of some lactic acid bacteria strains. *Revista de Chimie*, 70(7), 2434-24-38. <https://doi.org/10.37358/RC.19.7.7356>
- Poshadri, A., & Aparna, K. (2010). Microencapsulation technology: a review. *Journal of Research ANGRAU*, 38(1), 86-102.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225-241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Wang, T., Lu, Y., Yan, H., Li, X., Wang, X., Shan, Y., ... & Lü, X. (2020). Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 515-528.