

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de forrajes (maíz, frijol calabaza y alfalfa)

POR:

BONIFACIO ANTONIO ANDRÉS

T E S I S

Presentado como requisito parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Febrero de 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

POR:
BONIFACIO ANTONIO ANDRES

Que se somete a la consideración del comité H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para Obtener el Título en:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por:


Dra. Ana Verónica Charles
Rodríguez
PRESIDENTE DEL JURADO


Dr. Heliodoro de la Garza Toledo
VOCAL I


Dr. Antonio Francisco Aguilera
Carbó
VOCAL II


Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
VOCAL III


Ing. José Rodolfo Peña Oranday
CORDINADOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México Febrero de 2010

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto **“Caracterización genética y molecular de cepas probióticas mexicanas con actividad antimicrobiana para el desarrollo de productos para la salud humana y animal”** con Clave 110020, elaborado en el programa de cooperación entre la empresa GBS Global S.A. de C.V. y las universidades UA DE C y UAAAN. El proyecto fue financiado El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de Estímulos a la Innovación.

Los evaluadores de esta investigación fueron los siguientes:

Dr. Heliodoro De La Garza Toledo

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Dr. Cristóbal Noé Aguilar

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez.

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a **Dios** la razón de mi existencia y por estar siempre a mi lado protegiéndome así como el que me permitiera culminar mi carrera profesional.

A mi **Alma Terra Mater**, por cobijarme en sus entrañas y por permitirme construirme como profesionista.

A la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por compartirme parte de su sabiduría, así como el tiempo y paciencia en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mis profesores del departamento de ciencia y tecnología de alimentos M.C. Xochitl Rúelas Chacón, M.C. María Hernández González, Q.F.B. Oscar Noé Reboloso Padilla, Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, Dra. Lourdes Caballero, Dr. Antonio Aguilera Carbó, Q.F.B. Carmen Julia, M.C. Carmen Pérez, por guiarme por el buen camino y compartirme conocimientos científicos y experiencias.

Al personal que laboran en la UAAAN por brindar sus servicios a beneficio de la formación de los estudiantes.

A los asesores de la U.A de C. Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, Dr. Cristóbal Noé Aguilar, Dr. Raúl Rodríguez Herrera por su colaboración en la realización de este proyecto incondicional y por sus conocimientos compartidos.

A la empresa Green Corp Biorganiks y al **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández** gracias a su apoyo incondicional por brindarme mucho de su tiempo en la parte experimental y la conclusión del proyecto.

DEDICATORIA

A mi padre **Sr. Pedro Antonio García** por orientarme y brindarme todo su apoyo para levantarme en los malos momentos de la vida, por todo su apoyo moral, y económico mil gracias, que todo esto lo llevó clavado en el alma, gracias por creer en mí nunca podre pagar todo su esfuerzo.

A mi **Señora Madre Petronila Andrés Laureano**, que descanse en paz aunque no está conmigo siento que está cerca de mí y que me está cuidando, gracias por darme la vida y guiarme por el buen camino, por ser la inspiración de lograr algo más en la vida.

A mis hermanos **José, Pedro Y Vicente** por brindarme su amistad y hermandad de toda la vida, pero en especial a José y Pedro por contar todo su apoyo incondicional en todos los sentidos durante mi formación profesional los quiero.

A mis hermanas **Manuela, Rosa, Dolores** por brindarme amistad, cariño.

A mis **cuñadas** por ser personas admirables y muy dedicadas, gracias por tenderme la mano cuando más las necesité y que nunca me dieron la espalda, gracias de todo corazón.

A **Rosalba Reyes del ángel** por compartirme el tiempo de su vida a mi lado, por regalarme momentos inolvidables en esta vida así como brindarme todo su apoyo incondicional y por ser la persona especial en mi vida.

A **María de los Ángeles García Suarez** por darme ánimos durante toda la carrera y por la conclusión de mi proyecto propuesto, gracias por pensar siempre en mí nunca olvidaré los momentos que vivimos.

A mis compañeros **Abel, Carolina, Laura, Maira, Marbella, Belén, Dolores y Clelita** que fueron mis amigos inseparables, nunca olvidaré los momentos inolvidables que vivimos durante toda la carrera profesional.

A mis **todos mis Compañeros de ICTA** de la Generación CVI, gracias por compartir momentos inolvidables dentro de la formación profesional y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Índice

AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
Índice.....	v
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
RESUMEN	xii
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
2. Revisión de literatura.....	5
2.1 Ensilado de plantas forrajeras	5
2.1.1 Fermentación láctica.....	7
2.1.2 Bacterias lácticas presentes en los ensilados	7
2.2 Bacterias lácticas	9
2.2.1 Importancia de las bacterias lácticas	10
Cuadro 1. Microorganismos empleados como probióticos	12
2.3 Alimentos funcionales	13
2.4 Probióticos	14

2.4.1	Prebióticos	15
2.4.2	Simbióticos	15
2.4.3	Característica de un probiótico	16
2.4.4	Aplicación de los microorganismos probióticos	16
2.4.5	Efectos benéficos de los microorganismos probióticos	18
2.4.6	Criterios para la evaluación de los probióticos	22
2.5	Microflora intestinal en el cuerpo humano.....	26
2.6	Género Bifidobacterium.....	29
2.6.1	Antecedentes históricos.....	29
2.6.2	Bifidobacterium bifidum	31
2.6.3	Características bioquímicas.....	32
2.7	Genero Lactobacillus.....	36
2.7.1	Lactobacillus acidophilus	38
2.7.2	Mecanismo de acción	39
2.7.3	Factores de crecimiento	39
2.8	Genero Streptococcus.....	40
3.	Materiales y métodos.....	40
3.1	Recolección de las muestras	41
3.1.1	pH de las muestras	41
3.1.2	Medición de humedad	41
3.1.3	Adaptación de anaerobiosis	41
3.2	Etapa I: Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos provenientes de forrajes de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.....	42
3.2.1	Obtención y procesamiento de la muestra (microsilos y tratamientos de forrajes ensilados).	42

3.2.2	Medios y condiciones de cultivo	42
3.2.3	Condiciones de cultivo.....	43
3.3	Etapa II: Caracterización macro-, microscópica y bioquímicamente de las cepas aisladas	44
3.3.1	Selección e identificación de cepas	44
3.3.2	Método API (Biomérieux).....	44
3.3.3	Preparación del inóculo	44
3.3.4	Preparación de la galería.....	45
3.4	ETAPA III: Estudio del efecto probiótico de las cepas aisladas de forraje ensilada de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.....	46
3.4.1	Resistentes de las cepas probióticas a pH bajo	46
3.4.2	Determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas probióticas a diferentes temperaturas.....	46
3.4.3	Selección de microorganismos probióticos con capacidad de coagulación de la leche	46
3.4.4	Crecimiento en medios hostiles.....	47
3.4.5	Inhibición de microorganismos patógenos por microorganismos probióticos	47
3.4.6	Prueba de sensibilidad de las cepas probióticas aisladas a los antibióticos.....	47
3.4.7	Estabilidad en el paso por el estomago	48
4.	Resultados y discusión.....	49
4.1	Obtención y procesamiento de las muestras	49
4.1.1	Selección e identificación de cepas	51
4.2	Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas....	53
4.2.1	Prueba de catalasa de las cepas aisladas.....	53
4.2.2	Pruebas mediante sistema api 20-A.....	54

4.3	Determinación de la capacidad de crecimiento de las bacterias aisladas a diferentes niveles de temperaturas.	57
4.3.1	Selección de microorganismos probiótico con capacidad de coagulación de la leche	58
4.3.2	Crecimiento de cepas aisladas en medios hostiles.....	59
4.3.3	Crecimiento de las cepas probióticas a bajo pH, estabilidad en el paso por el estomago y resistencia a sales biliares.....	60
4.3.4	Inhibición de microorganismos patógenos sobre cepas aisladas	62
4.3.5	Prueba de sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos	64
5.	Conclusiones.....	67
6.	Recomendaciones.....	68
7.	Bibliografía.....	69
8.	Anexos	79

Índice de cuadros

Cuadro 1. Microorganismos empleados como probióticos	12
Cuadro 2. Ventajas que se atribuyen al consumo de alimentos prebióticos	17
Cuadro 3. Efectos potenciales de las bacterias probióticas	20
Cuadro 4. Factores de estrés a los que están expuestas las bacterias probióticas	24
Cuadro 5. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana....	28
Cuadro 6: Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	30
Cuadro 7. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros <i>Aeriscardovia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Parascardovia</i> y <i>Scardovia</i> pertenecientes a la familia <i>Bifidobacteriaceae</i>	34
Cuadro 8. Técnicas empleadas para identificar las <i>Bifidobacterias</i> a nivel de género, especie y cepa.	35
Cuadro 9: Características del género <i>Lactobacillus</i>	37
Cuadro 10. Propiedades metabólicas de <i>Lactobacillus casei</i>	38
Cuadro 11. Identificación de cepas aisladas mediante códigos	51
Cuadro 12. Descripción morfológica de las colonias bacterianas aisladas	53
Cuadro 13. Prueba de catalasa de las cepas de los ensilados aislados.	54
Cuadro 14. Identificación de las cepas probióticas de las cepas aisladas mediante el sistema API 20 A	55
Cuadro 15: Crecimiento de las cepas aisladas a diferentes temperaturas.....	57
Cuadro 16: Crecimiento de cepas aisladas en medios hostiles	60
Cuadro 17. Resistencia de las cepas aisladas a diferente pH.	61
Cuadro 18. Estabilidad paso por el estomago por 90 minutos y resistencia a sales biliares de las cepas aisladas.....	61

Cuadro 19. Comparación de medias mediante la prueba de Tukey.....	62
Cuadro 20. Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos a concentraciones normales.....	64
Cuadro 21. Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos mediante diluciones seriadas.....	65

Índice de figuras

Fig. 1. Cultivo en medio líquido	43
Fig. 2. Cajas petri sometidos en anaerobiosis.....	43
Fig. 3. Contenido de humedad de las materias primas empleadas para el ensilado	49
Fig. 4. Comportamiento de pH de las materias primas ensiladas	50
Fig. 5. Morfología microscópica de cepas bacterianas seleccionadas mediante la técnica de tinción de Gram.....	52
Fig. 6: Identificación de las cepas aisladas mediante el sistema API 20 A	56
Fig. 7. Coagulación de la leche de las diferentes cepas probióticas aisladas	58
Fig. 8. Identificación microscópica de cepas resistentes en un medio a pH 3.....	59
Fig. 9. Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas	63
Fig. 10. Sensibilidades de los patógenos sobre las cepas aisladas.....	63

RESUMEN

En la presente investigación se aislaron cepas de microorganismos probióticos a partir de forrajes de maíz, frijol, calabaza y alfalfa. Se lograron aislar y mantener 3 cepas de bacilos Gram positivo, catalasa negativa e identificados a un 99.5 % mediante un sistema API 20 A, como *Bifidobacterium sp2* en maíz, calabaza y alfalfa. Mientras que en frijol se logró aislar y mantener una cepa cuyas características fueron: coco Gram positivos, catalasa negativa e identificado como *Bifidobacterium sp2* con una probabilidad de 99%.

Los microorganismos seleccionados fueron capaces de promover la coagulación de la leche y resistieron temperaturas de 40, 50 y 60 °C durante 24 horas; así mismo, fueron resistentes a condiciones de pH 3.0 y 0.20 % de sales biliares, además de tolerar el pH de 2.5 por un periodo de 90 minutos.

La actividad antimicrobiana de las cepas probióticas contra: *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* fueron analizados mediante el sistema SAS, expresada como halos de inhibición. Se demostró que no existe diferencia significativa entre las cepas M-1 Y A-1 ya que tienen la misma actividad antimicrobiana pero si se observaron diferencias significativas entre estas dos cepas contra las cepas C-1 F-1. El *Staphylococcus auerus* resultó ser significativamente diferente entre las demás cepas patógenas, puesto que mostró más sensibilidad ante las cepas probióticas.

Se observó que la mayoría de las cepas aisladas presentó sensibilidad a los antibióticos (bencilpenicilina a una dosis normal de 600000 ul/ml, tetraciclina a una dosis normal de 250 mg/ml, ampicilina a una dosis normal de 500 mg/ml y trimetroprin-sulfametoxazol a una dosis normal de 160/800 mg/ml). La cepa A-1 presentó tolerancia a dosis normales a todos los antibióticos, las cepas F-1 y C-1 resistió a dosis bajas. Mientras que en la cepa M-1 fue sensible a todos los antibióticos.

Palabras claves: forrajes, aislamiento, probióticos, cepas.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

En los últimos veinte años, se han producido importantes avances en el campo de la nutrición debido, en parte, a su expansión hacia otras áreas científicas como la inmunología, y la ecología microbiana y genómica. La estrecha relación entre la dieta y el estado de salud se atribuye no sólo al valor nutritivo de la dieta, sino también a los efectos beneficiosos derivados de sus complejas interacciones con el huésped y la microbiota intestinal (Sanz y col. 2003).

En las últimas décadas la manipulación de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos ha adquirido un gran interés en el tratamiento y prevención de determinadas patologías infantiles (Villoslada y col. 2007).

La microflora intestinal normalmente entre otras funciones ejerce un efecto protector en el huésped contra la colonización del tracto intestinal por microorganismos extraños. El balance y la composición normal de la microflora intestinal pueden ser afectados por enfermedades, usos de antibióticos, situaciones de “estrés”, alimentación y otros (Suskovic y col.1997; Tourmut 1994; Holdeman y col. 1976), La flora microbiana del tracto gastrointestinal está constituida por diversos grupos bacterianos (Tourmut, 1994).

Actualmente existen multitud de estudios que demuestran que las bacterias probióticas pueden tener un papel importante en el desarrollo del sistema inmunitario. Estudios recientes sugieren que dos cepas probióticas, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT5714 mejoran la función intestinal de adultos sanos y potencian la respuesta inmunitaria (Villoslada y col. 2007). Estos microorganismos benéficos se puede encontrar en el ensilado que es un método mediante el cual se conservan forrajes mediante ácidos orgánicos producidos por microorganismos presentes en el forraje en ausencia de oxígeno (INIFAP-SAGARPA, 2010).

El éxito del proceso fermentativo que ocurre en los ensilajes depende, principalmente, de una cantidad suficiente de bacterias ácido lácticas y de una concentración adecuada de carbohidratos solubles en el forraje que genera el

ácido láctico. De esta manera, el pH se mantiene bajo y el ensilaje se preserva mejor (Jaster, 1995). El proceso de fermentación del forraje que se ensila se desarrolla bajo condiciones anaerobias (INIFAP, 2010).

El desarrollo de alimentos funcionales ejerce efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad. Los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. Son productos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microflora de un compartimento del huésped, ejerciendo así un efecto beneficioso sobre la salud de éste (Sanz y col., 2003).

Los seres vivos toman importante sobre los microorganismos probióticos y resulta insuficiente en la obtención de la misma. Para este caso particular, los microorganismos de ensilajes fueron seleccionados por el potencial que representan, por lo que se seleccionaron materiales abundantes considerados desecho que pueden ser sometidos al proceso de ensilado, tal como lo son los forrajes de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.

1.2 Justificación

La presente investigación se realizó con el fin de buscar nuevas fuentes de obtención de microorganismos probióticos ya que en la actualidad estos microorganismos son muy demandados en la industria alimentaria. Está comprobado que las bacterias probióticas, principalmente *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, ejercen efectos benéficos en la salud, mediante interacciones con el intestino y sus metabolitos.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad actuales, así como simplificar el ciclo de producción. Un gran aporte a la industria nacional, sería la producción de probióticos a partir de un medio no láctico para ampliar las aplicaciones a otros alimentos, ya sea para consumo humano o animal, con la correspondiente reducción de costos para los consumidores. Desde hace algún tiempo, la industria alimenticia se ha sumado a la producción de probióticos, lo cual ha permitido disminuir sus costos y facilitar su acceso por parte de los pacientes. Lo anterior, si bien supone un beneficio, también exige una revisión crítica que permita sustentar su efectividad en el tratamiento de ciertas patologías, y asegurar que su consumo no implique riesgos relevantes para la salud de la población.

Actualmente los seres vivos han tomado un papel muy importante sobre los microorganismos probióticos y resulta insuficiente en la obtención de la misma. Por esa razón se busca algo que supere esta situación; una nueva alternativa es la obtención y caracterización de cepas probióticas mexicanas con actividad antimicrobiana para desarrollar productos para la salud, para este caso particular, los microorganismos de ensilajes fueron seleccionados por el potencial que representan, por lo que se seleccionaron materiales abundantes considerados desecho que pueden ser sometidos al proceso de ensilado, tal como lo son los forrajes de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.

1.3 Hipótesis

Es posible aislar e identificar microorganismos probióticos a partir de forrajes ensilados (maíz, frijol, calabaza y alfalfa)

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Aislar e identificar microorganismos probióticos a partir de forrajes ensilados (maíz, alfalfa, frijol y calabaza).

1.4.2 Objetivos específicos

- Aislar los microorganismos de forrajes ensilados (maíz, alfalfa, frijol y calabaza).
- Identificar a los microorganismos microscópica, macroscópicamente y métodos bioquímicos.
- Evaluar la sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos, a pH ácido y sales biliares; temperaturas, paso por el estomago y capacidad de coagulación de la leche.
- Evaluar el efecto de inhibición de microorganismos patógenos por las cepas probióticas seleccionadas.

2. Revisión de literatura

2.1 Ensilado de plantas forrajeras

Ensilaje es el método para preservar o conservar los forrajes verdes, con alto contenido de humedad, y se basa en la fermentación (INIFAP-SAGARPA, 2010). El proceso implica almacenar pasturas verdes en depósitos de diferentes formas y materiales por un periodo mínimo de 20 días. El proceso de fermentación del forraje que se ensila se desarrolla bajo condiciones anaerobias (ausencia del aire), las cuales dan como resultado una pastura económica, de muy buena calidad y alta palatabilidad (INIFAP, 2010).

En el transcurso de poco tiempo (5-6 horas) casi todo el oxígeno ha sido consumido y debido a ello, no pueden desarrollarse microorganismos como mohos y levaduras, las cuales requieren necesariamente de oxígeno para vivir. La sustancia activa que provoca las transformaciones microbiológicas citadas son provocadas por el ácido D y L-láctico, el cual es producido por organismos del tipo *Lactobacillus plantarum*. Esta bacteria aumenta en número hasta el décimo séptimo día de ensilado el forraje y después de ese tiempo, las bacterias tienden a ser destruidas por el producto de su propio metabolismo, esto es, por el mismo ácido láctico. El proceso se lleva a cabo en temperaturas que oscilan de 18 a 62° centígrados. La acción de la fermentación láctica en la conservación de los forrajes frescos se conoce desde hace mucho tiempo. Sin embargo, el valor que tiene el grado de acidez en el proceso de fermentación fue advertido hasta hace 40 años (INIFAP, 2010).

Un buen ensilado debe reunir los siguientes requisitos: reducción de tamaño (trozos de 2 a 4 cm), tener alta proporción de grano, no presentar hongos o enmohecimientos, tener olor ácido (agradable), y color café olivo, tener entre 60 y 70% de humedad y que tenga un buen sabor (dulce y no agrio) (INIFAP, 2010).

Se debe considerar esta alternativa solo para la conservación de forrajes de alta calidad. El material debe ser cortado y picado uniformemente en trozos no mayores a los 2,5 cm confeccionando el silo con 65-70% de humedad. Sea cual fuere el silo que se realice en el mismo no debe entrar aire pues se busca que fermente y que se produzca ácido acético y láctico (característico olor a encurtidos) señal de que es un silo de calidad, desde este punto de vista las bolsas plásticas son las que dan mayor seguridad de fermentación (Curró y Bruno, 2008).

En muchos países, los forrajes ensilados son muy apreciados como alimento animal, el ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAL) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. La microflora del ensilaje juega un papel clave para el éxito del proceso de conservación. Puede ser dividida en dos grupos principales: los microorganismos benéficos y los microorganismos indeseables (Stefanie y col., 1999).

Los componentes bacterias ácido lácticas que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellos son mesófilos, o sea que pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre 5° y 50°C, con un óptimo entre 25° y 40°C. Son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje. Todos los miembros de bacterias ácido lácticas son aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaeróbica (Stefanie y col., 1999).

2.1.1 Fermentación láctica

Las bacterias ácido lácticas mediante su metabolismo fermentativo son muy útiles tecnológicamente y de gran ayuda para mejorar la calidad de la nutrición y salud de los consumidores. Las bacterias ácido lácticas son los microorganismos más utilizadas como probióticos en los productos lácteos. Además de las leches tradicionales fermentadas con probióticos, se está aplicando la fermentación con microorganismos seleccionados por sus beneficios a la leche de soja, leche de almendra, horchata e investigando en otras leches vegetales que pueden ser muy útiles en personas con intolerancia a la lactosa de la leche de vaca (Hortensia, 2004).

2.1.2 Bacterias lácticas presentes en los ensilados

Los *Lactobacilos* producen ácido láctico, que además de disminuir el pH del ensilaje (3,8 - 4,2) en las primeras 24 horas del proceso de fermentación, generan probióticos naturales que inhiben la proliferación de microorganismos indeseables, evitando pérdidas y mejorando la estabilidad y la calidad (Becker, 2005).

Tomando en cuenta el metabolismo de los azúcares, los miembros de bacterias ácido lácticas pueden ser clasificados como homofermentadores obligatorios, heterofermentadores facultativos o heterofermentadores obligatorios. Los homofermentadores obligatorios producen más de 85 % de ácido láctico a partir de hexosas (azúcares C₆) como la glucosa, pero no pueden degradar las pentosas (azúcares C₅) como la xilosa. Los heterofermentadores facultativos también producen principalmente ácido láctico a partir de hexosas, pero además pueden degradar algunas pentosas produciendo ácido láctico, ácido acético y/o etanol. Los heterofermentadores obligatorios degradan las hexosas y las pentosas, pero se distinguen de los homofermentadores en que degradan las hexosas en proporciones equimolares de ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o

etanol. Los homofermentadores obligatorios reúnen especies como *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus ruminis*. Los heterofermentadores facultativos incluyen a *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* y *Enterococcus faecium*. Los heterofermentadores obligatorios incluyen miembros del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* como *L. brevis* y *L. buchneri* (Stefanie y col., 1999).

2.2 Bacterias lácticas

La presencia de una cantidad elevada de ácido láctico en los productos de la fermentación anaerobia de los azúcares, es un carácter bioquímico importante que justifica la integración dentro de un mismo grupo de bacterias que acusan grandes diferencias en su morfología. Las bacterias lácticas esféricas se encuentran en la familia *Streptococcaceae*, y las bacterias en forma de bacilos en la de *Lactobacillaceae* (Alais, 1985).

Las bacterias lácticas agrupan a las especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*, que se caracterizan por producir importantes cantidades de ácido láctico. Se caracterizan por ser Gram positivas, no motiles, no esporógenas, no pigmentadas, catalasa negativa y no reducen nitratos. Son anaerobias pero aerotolerantes y requieren de numerosos factores de crecimiento (Garibay y col., 2004).

Las bacterias lácticas poseen proteasas ligadas a la pared que pueden hidrolizar parcialmente la caseína en péptidos asimilables que son degradados subsecuentemente por péptidasas de la membrana y el citoplasma. Las proteasas y péptidasas de las bacterias lácticas son liberadas por lisis celular al queso, esto tiene una influencia directa sobre la formación de sabor. La actividad lipolítica es muy limitada (Garibay y col., 2004).

La actividad de las bacterias lácticas limita el crecimiento de otras bacterias, tanto por el efecto de la baja en el pH como por ciertas sustancias inhibitoras producidas por algunas especies mencionadas anteriormente (Garibay y col., 2004).

2.2.1 Importancia de las bacterias lácticas

La importancia práctica de las bacterias pertenecientes a esta familia es considerable, por varias razones (Alais, 1985):

- Producción de ácido y descenso del pH:

La protección de las sustancias alimenticias es debida a la inhibición de las bacterias de la putrefacción en medio ácido y establecimiento de las condiciones fisicoquímicas favorables a diversas transformaciones en la industria láctea (desuerada de las cuajadas de quesería, elaboración de mantequilla) la fermentación láctica “aromatizante” permite la obtención de productos ácidos con un sabor deseado (nata, mantequilla, yogur, etc.).

- Otras actividades que pueden tener efectos útiles o perjudiciales:

Producción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas, en especial la caseína en el curso de la maduración de los quesos. Los disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa) son mejores alimentos que las hexosas de las que están formados (glucosa, Fructosa, galactosa). El ácido láctico producido en el curso de la fermentación no es del mismo tipo para las diferentes especies; algunas dan ácido dextrógiro, otras ácido levógiro y otras dan ácido racémico activo y las hexosas se transforman en ácido láctico, en una proporción igual o superior al 90 %, por la acción de las bacterias lácticas llamadas “homofermentativas” y al 50 % para las denominadas “heterofermentativas”; estas últimas forman, además, gas carbónico (alrededor del 25 % del azúcar) o productos neutros (alcohol y Glicerol) y otros ácidos, sobre todo ácido acético.

Algunas veces se observan variaciones de ciertas propiedades, que pueden ser consecuencia de cambios en las condiciones de cultivo o de la selección o mutación. La aptitud para atacar la caseína y fermentar los diferentes azúcares puede variar con la composición del medio. Sin embargo, es preciso señalar que

ciertas características bioquímicas parecen ser estables cuando los estudios se realizan en condiciones muy bien definidas, sobre todo para los *Lactobacillus*.

En la actualidad, la definición que se suele emplear es la elaborada por la FAO/OMS en 2002 con los siguientes términos: los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped. Entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentra las bacterias ácido lácticas que comprenden *Lactobacillus* y *Bífidobacterias*, pero también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* y levaduras no patógenas como *Saccharomyces boulardii* (Dunne, 2001) como se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Microorganismos empleados como probióticos

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>L.lactis</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B.longum</i>	<i>L.cremoris</i>	
<i>L.bulgaricus</i>	<i>B.breve</i>	<i>L.diacetylactis</i>	
<i>L.casei</i>	<i>B.lactis/animalis</i>		
<i>L.kefir</i>	<i>B.adolescentis</i>		
<i>L.brevis</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.helveticus</i>			
<i>L.plantarum</i>			
<i>L.salivarius</i>			
<i>L.johnsonii</i>			
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.		Otras especies
<i>E.faecium</i>	<i>B.subtilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>B.coagulans</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
			<i>Leuconostoc</i> spp.

Fuente:(Álvarez-Olmos y col.,. 2001)

2.3 Alimentos funcionales

En muchos países, especialmente Japón y los Estados Unidos, la investigación sobre alimentos funcionales se ocupa de los efectos fisiológicos y beneficios para la salud de los alimentos y componentes de alimentos, con el fin de autorizar demandas específicas de salud (Roberfroid, 2000).

Alimentos funcionales, alimentos de diseño y alimentos nutraceuticos, son expresiones que se usan indistintamente para referirse a alimentos o ingredientes de alimentos aislados y que proporcionan determinados efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, distintos a los efectos nutricionales. Los alimentos funcionales proporcionan una protección frente a las enfermedades más comunes, cardiovasculares, cáncer, trastornos digestivos y otros trastornos asociados con carencia o desequilibrio de nutrientes adecuados (Hortensia, 2004).

Los efectos positivos de un alimento funcional pueden ser el mantenimiento de un estado de bienestar y la salud o reducir el riesgo de consecuencias patológicas (Roberfroid, 2000).

El mercado de los alimentos funcionales se ve impulsado, en gran medida por las exigencias de los consumidores, su afán por consumir los alimentos que sean más beneficiosos para la salud, considerándolos como una alternativa segura y barata a los medicamentos o a las terapias tradicionales. Pero no es ese el fin que se busca con el consumo de alimentos funcionales o enriquecidos. Son alimentos con actividad beneficiosa para la salud, de manera preventiva, no curativa y a largo plazo (Hortensia, 2004).

2.4 Probióticos

Los probióticos son cultivos de microorganismos vivos que se aplican en los alimentos del hombre y animales y afectan beneficiando al huésped. Los probióticos mediante la producción de ácidos grasos, agua oxigenada, bacteriocinas y otros, pueden destruir a los otros microorganismos, adueñándose de los lugares donde crecen (Hortensia, 2004).

El yogur (obtenido de la fermentación de la leche por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) y otros derivados lácteos fermentados son los principales representantes de este grupo, al que también pertenecen algunos vegetales y productos cárnicos fermentados. Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus acciones beneficiosas no son bien conocidos, aunque se postulan como los más relevantes la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, la producción de sustancias antimicrobianas, la competición con microorganismos patógenos por sus receptores, lugares de unión y nutrientes precisos para su desarrollo, el estímulo del sistema inmune y la generación de citoquinas (Belén y col., 2003).

Es esencial que los probióticos permanezcan vivos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* potencian la inmunidad, favorecen el equilibrio de la microflora colónica, incrementan la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejoran el tránsito y la motilidad intestinal, estimulan la proliferación celular y elaboran ciertos productos fermentados beneficiosos. *L. casei* es el único que ha demostrado con evidencia científica prevenir y acortar las diarreas por rotavirus del lactante, *L. acidophilus* y *B. bifidum* estimulan de forma inespecífica la actividad fagocítica de granulocitos y la producción de citoquinas (Belén y col., 2003).

Los probióticos se comercializan como cultivos microbianos, congelados, deshidratados o en productos alimenticios fermentados. Mejoran la salud del hombre y animales incluyendo la promoción del crecimiento. Restauran la flora autóctona buena, cuando se ha destruido. Se aplican tras estrés por antibióticos, infecciones o radiaciones, en personas inmunológicamente deficientes y en neonatos con cuidados intensivos (Hortensia, 2004).

2.4.1 Prebióticos

Un prebiótico es el sustrato trófico del probiótico. Son sustancias no digeribles por el hombre que forman parte de los alimentos. Benefician al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias intestinales. Todavía hay poca experiencia en su empleo; por el momento los únicos datos relevantes se refieren a los fructanos tipo inulina (oligosacáridos no digeribles: inulina, hidrolizados enzimáticos de la inulina, oligofruetosacáridos, fructosacáridos sintéticos de cadena larga). De forma natural están presentes en el trigo, la cebolla, los plátanos, el ajo y los puerros. Las principales acciones de los prebióticos ocurren a nivel gastrointestinal (Belén y col., 2003).

2.4.2 Simbióticos

La asociación de un probiótico con un prebiótico se denomina simbiótica. Un ejemplo son los preparados lácteos ricos en fibra fermentados por *Bifidobacterias*. Se supone que dicha asociación proporciona efectos sinérgicos. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios relevantes con simbióticos, por lo que los aparentes beneficios son por el momento especulativos (Belén y col., 2003).

2.4.3 Característica de un probiótico

Según Fuller (1989) un cultivo microbiano con actividad de probiótico deberá poseer las siguientes características específicas:

- Deberá ser una cepa o especie que tenga un efecto benéfico sobre el animal.
- No debe ser patógeno ni tóxico.
- Debe sobrevivir bajo condiciones del tracto gastrointestinal.
- Debe pertenecer viable por periodos largos bajo condiciones de almacenamiento (Gilliland y Speck., 1977).

2.4.4 Aplicación de los microorganismos probióticos

El uso de antibióticos puede alterar el equilibrio de la flora intestinal y producir infecciones oportunistas como *Clostridium difficile*. En niños alrededor de un tercio de los que reciben antibióticos de amplio espectro pueden desarrollar diarrea. El uso de probióticos se ha convertido en una alternativa beneficiosa para evitar o minimizar el efecto de los antibióticos sobre la flora. Estudios bien controlados en niños de 6 meses a 10 años tratados con antibióticos por infecciones agudas respiratorias, urinarias, de tejidos blandos y piel y a los que se administran en capsulas *Lactobacillus* GG, presentaron menos episodio de diarrea, menos recurrencia, menos frecuencia de deposiciones y más consistencia de las mismas. El mismo efecto beneficioso que con la administración de *Lactobacillus casei* (LGG) se ha demostrado al administrar *Saccharomyces boulardii* y también en la administración en el uso de probióticos en adultos (Hernández y col., 2001).

La hipersensibilidad inducida por alimentos produce una permeabilidad aumentada de la barrera intestinal. Para el manejo de la hipersensibilidad a las proteínas de la dieta se realiza, por una parte y hasta donde sea posible, la eliminación de los alimentos que contienen la proteína y la administración de

formulas elementales con hidrolizados de proteínas o formulas con aminoácidos. Sin embargo, existe evidencia creciente de que los prebióticos pueden representar un importante papel en la prevención de la alergia o en la disminución de la sintomatología clínica (cuadro 2). Los *Lactobacillus* y las *Bifidobacterias* reducen la respuesta inflamatoria, la concentración de factor necrosis tumoral (TNF α), limita la absorción de macromoléculas, modifican la estructura de los antígenos, limitando su capacidad antigénica, favoreciendo una microflora con predominio de agente no patógenos, mayor generación de Ig A secretora y linfocitos T-helper, por tanto, el uso de probióticos ya desde los primeros meses de vida en lactantes con alto riesgo de alergia podría convertirse en una nueva estrategia preventiva, terapéutica a la respuesta inflamatoria intestinal y a la sintomatología (Hernández y col., 2001).

Cuadro 2. Ventajas que se atribuyen al consumo de alimentos prebióticos

Mejor absorción de calcio y magnesio
Mantenimiento de la salud de huesos y dientes
Mejora del sistema inmunitario
Mantenimiento de la integridad intestinal y restricción de las bacterias patógenas
Ayuda a disminuir las concentraciones de colesterol (incrementa el colesterol eliminado en las heces)

Fuente: Gimeno, 2009.

2.4.5 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos

Propiedades antimicrobianas: La microflora intestinal ejerce una barrera importante frente a las infecciones. Los mecanismos de acción son muy variados:

- a) Modificando los niveles de adhesión celular,
- b) Produciendo sustancias antimicrobianas o
- c) La estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal (Marquina y col., 2002).
- d) Colonización competitiva (que priva a los patógenos de nutrientes de nichos de implantación,
- e) Inhibición de adhesión y crecimiento de patógenos, que resulta de la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono y sustancias antimicrobianas conocidas como bacteriocinas (Héller y col., 2001).

Los ácidos orgánicos disminuyen el pH del contenido intestinal y ejercen una acción tóxica directa sobre la flora patógena. Los ácidos láctico y acético penetran la membrana celular, ocasionando la inhibición del transporte de nutrientes y actividad de ATPasa. El peróxido de hidrogeno inactiva biomoléculas esenciales por reacción en cadena del anión superóxido. El dióxido de carbono, además de hacer el medio más anaerobio, inhibe la descarboxilación enzimática y rompe la membrana celular por acumulación gaseosa. Las bacteriocinas, en su mayoría identificadas en cepas de *Lactobacillus*, son un grupo heterogéneo de compuestos proteicos con actividad, modo de acción, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas variables (Héller y col., 2001). Muchas especies diferentes de bacterias actúan de forma conjunta en el intestino humano para mantener su funcionamiento normal. Sin embargo, factores como el estrés, sustancias tóxicas o un tratamiento con antibióticos pueden alterar el equilibrio bacteriano natural produciendo una disminución del número de organismos beneficiosos. Esta alteración hace que la persona sea vulnerable a las infecciones de origen alimentario como las causadas por *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria*; y puede

predisponer a padecer trastornos intestinales como el cáncer de intestino y la colitis ulcerativa. Aquí es donde los probióticos pueden intervenir (Gibson, 2002).

La cepa CRL-431 de *Lactobacillus casei* ha mostrado su capacidad para eliminar microorganismos patógenos del intestino, como cepas enterotoxigenicas de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sunnei* y *Salmonella typhimurium* (Marquina y Santos, 2002). Las bacterias probióticas muestran propiedades contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* (Shah, 2001).

Propiedades anti-carcinogénicas: Las bacterias ácido lácticas y los productos fermentados hechos de ellas tienen una actividad potencial anticarcinogénica. *B. longum* y *B. infantis* son agentes efectivos contra los tumores. Su mecanismo de acción se debe a la supresión de las enzimas bacterianas, a la activación del sistema inmune del huésped y a la reducción del pH intestinal. Las bacterias probióticas pueden remover las fuentes procarcinogénicas o las enzimas que desarrollan la formación de carcinógenos (Shah, 2001).

Otros estudios epidemiológicos aportan evidencias de que el consumo probióticos pueden reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Nagendra, 2001).

Reducción del colesterol: Estudios han mostrado que el consumo de ciertos cultivos de productos lácteos puede reducir el nivel de colesterol en la sangre. El consumo de leches fermentadas conteniendo un gran número de bacterias probióticas (10^9) por personas hipercolestéremicas pueden reducir los niveles de colesterol de 3.0 a 1.5 g/L (Shah, 2001).

Alergias: Se han reportado estudios preliminares de la modulación de ciertas reacciones alérgicas debido a los probióticos. El rompimiento de las mucosas intestinales permitiendo el intercambio de antígenos puede ser un factor para desencadenar ciertas reacciones alérgicas.

La intervención de los probióticos puede ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias alimentarias mediante la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la flora intestinal (Mattila y col., 2000).

Reducción de la intolerancia a la lactosa: La intolerancia a la lactosa es un problema que padecen un gran porcentaje de la población (50-70%) y se debe a la indigestión de productos que contiene lactosa y los bajos niveles de beta-D-galactosidasa intestinal. La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en el intestino ocasiona la salida de fluidos o iones de la mucosa intestinal hacia el exterior hasta alcanzar el equilibrio osmótico, provocando diarrea profusa (Marquina y col., 2002).

Mejoramiento del valor nutricional de un alimento: Los efectos nutricionales de probióticos han sido muy estudiados en las leches fermentadas con *Lactobacillos*. Estos productos tienen un menor contenido de lactosa y un alto contenido de aminoácidos libres y ciertas vitaminas, que otros productos fermentados. Se ha reportado que los *Lactobacillos* y *Bifidobacterias* producen ácido fólico, niacina, tiamina, rifloflavina, piridoxina y vitamina K (O'Sullivan y col., 1992). Los efectos benéficos que un determinado microorganismo probiótico puede provocar en el huésped se presentan en el (cuadro 3) con una posible explicación de su mecanismo de acción.

Cuadro 3. Efectos potenciales de las bacterias probióticas

Beneficio en la salud	Mecanismo postulado
Ayuda en la digestión de la lactosa	La lactasa bacteriana hidroliza la lactosa
Resistencia a las bacterias patógenas	Alteración de las condiciones intestinales para ser menos favorable para patogenicidad. Influencia en las poblaciones de la flora intestinal. Fijación a la mucosa intestinal
Efectos contra el cáncer en el colon	Inhibición de productos enzimáticos carcinogénicos de los microbios colónicos Respuesta inmune
Crecimiento de las bacterias del intestino delgado	Influencia en la concentración de las sales biliares. Influencia en la actividad de crecimiento de la flora, disminuyendo la producción de metabolitos tóxicos.
Modulación del sistema inmune	Efectos coadyuvantes en respuestas inmunes antígenas específicas
Alergias	Prevención de la translocación de antígenos dentro del torrente sanguíneo
Lípidos en la sangre, enfermedades del corazón	Asimilación del colesterol dentro de células bacterianas. Efectos antioxidativos
Efectos antipertensivos	Los componentes de la pared celular actúan como inhibidores enzimáticos.
Infecciones urogenitales	Fijación a las células del tracto urinario y vaginal
Infecciones causadas por <i>Helicobacter pylori</i>	Producción de inhibidores de <i>H. pylori</i> (ácido láctico y otros)

Fuente: Sanders y col. 1999.

2.4.6 Criterios para la evaluación de los probióticos

El establecimiento de criterios de selección y controles de calidad para productos probióticos se considera una prioridad debido a la rápida incorporación de estos productos al mercado y su distribución en el ámbito internacional sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada. En concreto, la FAO/OMS, en mayo de 2002, hizo pública una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos; dicha guía incluye los siguientes aspectos:

- ✓ Identificación del género, la especie y la cepa probiótica:

Los *Lactobacillus* y las *Bifidobacterias* incorporados a estos productos se consideran seguros según su clasificación taxonómica. Por ello, es necesaria una correcta identificación a nivel de género y especie, para garantizar que se trata de microorganismos presumiblemente inocuos y de grado alimentario (GRAS). Por otro lado, los efectos beneficiosos no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que son dependientes de cepa. Por eso, es necesario profundizar en su identificación a nivel intraespecífico, mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica, a fin de asociar un determinado efecto con una cepa concreta, y poder realizar su seguimiento en estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos (FAO/OMS, 2003).

- ✓ Estudios «in vitro» para la selección de probióticos de uso en humanos

Dentro de estas pruebas de selección *in vitro* se incluyen: i) la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, que constituyen unas condiciones limitantes para la supervivencia a través del tracto gastrointestinal, de lo contrario los microorganismos probióticos no llegarían viables al final del intestino para ejercer su acción beneficiosa para la salud, ii) la adherencia a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, ya que se consideran propiedades que deben de poseer para ejercer efectos inmunomoduladores.

También, se incluyen ciertas habilidades para la reducción de la adhesión de la flora competitiva y actividad microbiana que favorezca el desplazamiento de patógenos; y por último el análisis de la capacidad de hidrolizar las sales biliares (Shah, 2001).

✓ Seguridad de los probióticos:

Las cepas utilizadas pertenecen, en su mayoría, a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son comensales humanos que han sido aplicados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos. Éstos son aspectos que garantizan a priori su inocuidad, aunque teóricamente su uso en alimentación podría tener efectos colaterales.

Por ello, y pese a que las bacterias utilizadas se consideran seguras, se recomienda que sean sometidas a las siguientes pruebas de caracterización: i) resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles (Danielsen y col., 2003); ii) actividades metabólicas perjudiciales (producción de ácido D-láctico); iii) estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores; iv) determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora, y v) ausencia de inefectividad en animales inmunodeprimidos.

✓ Estudios «*in vivo*» utilizando animales y humanos:

Estos estudios están destinados a demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos en relación con el bienestar y calidad de vida, la mejoría de una condición clínica y/o síntomas, la reducción del riesgo y rapidez en la recuperación de enfermedades (FAO/OMS, 2002).

✓ Etiquetado:

Se ha recomendado la incorporación en el etiquetado de los siguientes aspectos: i) género, especie y nombre de la cepa, para evitar confusiones sobre su funcionalidad; ii) mínimo número de viables de la cepa probiótica al final de la vida útil (10⁶ células viables por ml); iii) ingestión recomendada para que la dosis del probiótico sea efectiva en relación con la mejora de salud declarada; iv) efectos beneficiosos que puede proporcionar a la salud; v) condiciones adecuadas de almacenamiento, y vi) dirección de contacto con centros de información al consumidor (FAO/OMS, 2002).

✓ Viabilidad e identidad de cepas declaradas en productos probióticos comerciales:

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos (yogures, leche, quesos, etc.); las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila, etc.), y los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas. La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables. Para promover beneficios en la salud, las bacterias probióticas deben ser viables y disponibles en altas concentraciones, típicamente 10⁶-10⁷ UFC/g del producto (Sanders y col., 1999). Así mismo los probióticos del cual están expuestos a diferentes factores de estrés (cuadro 4).

**Cuadro 4. Factores de estrés a los que están expuestas las bacterias
probióticas**

Durante su producción
Grandes concentraciones de los productos de la fermentación (ej. Acido láctico en el medio de cultivo). Congelación Secado Exposición al oxígeno Presiones osmóticas (sales)
En el tracto gastrointestinal
Rehidratación en un ambiente ácido Largos periodos de tiempo de exposición a la acidez del estómago Compuestos antimicrobianos Ácidos biliares Exposición al oxígeno

Fuente: Siuta-Cruce y Goulet, 2001.

2.5 Microflora intestinal en el cuerpo humano

Los microorganismos probióticos se pueden encontrar en la boca y las vías respiratorias superiores, tal vez se origina en el aparato respiratorio de la madre y de la persona que atiende al parto. Cuando comienza la erupción de los dientes se establecen espiroquetas anaeróbicas junto con algunos vibriones anaeróbicos y *Lactobacilos*. Para la producción de caries tal vez sea la formación de grandes cantidades de ácido (pH<5.0) por los *Streptococos* y *Lactobacilos* de la placa a partir de carbohidratos. Las concentraciones grandes de ácido desmineralizan el esmalte adyacente e inician la caries (Brooks, 2008).

Al nacer el intestino es estéril, pero pronto se introducen microorganismos junto con los alimentos. En los niños alimentados al seno materno en el intestino aumenta el número de *Streptococos* y *Lactobacilos*, estos son aeróbicos y anaeróbicos Gram positivos, sin motilidad (p.e: especies de *Bifidobacterium*) producen ácido a partir de carbohidratos y toleran un pH de 5.0. En niños alimentados con biberón existen una flora normal más variada en el intestino y los *Lactobacilos* son menos abundantes. Conforme los hábitos alimentarios se desarrollan, la flora intestinal cambia (Brooks, 2008).

La población microbiana de la vagina es muy heterogénea y se ve influida en gran medida por diversos factores hormonales. Las recién nacidas están colonizadas ya por *Lactobacilos* desde su nacimiento, los cuales predominan durante aproximadamente 6 semanas. Después de ese periodo, los valores de estrógenos maternos han disminuido y la flora vaginal se incluye otras bacterias diferentes. Cuando en la pubertad se inicia la producción de estrógenos, se produce otro cambio de la flora microbiana. Los *Lactobacilos* reaparecen como microorganismos predominantes y se aíslan también muchas otras bacterias y diversas bacterias anaeróbicas (Patrick y col., 2007).

Los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, Se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. Para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de protección tiene que poseer características tales como: ser capaz de sobrevivir a la acidez del estómago, tolerar la acción detergente de la bilis, ser fenotípica y genotípicamente estable, conocer su patrón de resistencia a antibióticos, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino (Varo y col., 2005).

La cantidad y composición de la flora bacteriana varía según la región anatómica del tubo digestivo. En la cavidad oral del adulto existen 10^7 bacterias por gramo de saliva, predominado especies *Lactobacillus*, *Coliformes*, *Veillonella* y *Enterococcus*. El ácido presente en el estomago reduce la cantidad de estas especies a 10^2 - 10^3 bacterias por gramo de jugo gástrico. En intestino delgado proximal el número de bacterias varía entre 10^3 - 10^4 (Héller y col., 2001).

A lo largo del intestino se encuentran alrededor de 100 trillones de bacterias viables de 100 especies diferentes. Flora principalmente de bacterias acidolácticas: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*; bacterias anaerobias, *Bacteroidaceae*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y levaduras (Héller y col., 2001). En el cuadro 5 se muestran los microorganismos que se encuentran en la vía gastrointestinal humana.

Cuadro 5. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana.

	Estómago	Yeyuno	Íleon	Materia fecal
Total de bacterias	1-10 ³	0-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Anaerobias o anaerobias facultativas				
Bacterias entéricas	1-10 ²	1-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ⁴ -10 ¹⁰
<i>Streptococos</i>	1-10 ³	1-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
<i>Estafilococos</i>	1-10 ²	1-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ⁴ -10 ⁷
<i>Lactobacillus</i>	1-10 ³	1-10 ⁴	10 ² -10 ⁵	10 ⁶ -10 ¹⁰
Hongos	1-10 ²	1-10 ²	10 ² -10 ³	10 ² -10 ⁶
Bacterias anaerobias	1			
Bacteroides	Raras	1-10 ²	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Bacterias bífidas	Raras	1-10 ³	10 ³ -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹²
Cocos gram-positivos	Raras	1-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹¹
<i>Clostridia</i>	Raras	Raras	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
<i>Eubacteria</i>	Raras	Raras	Raras	10 ⁹ -10 ¹²

Fuente: Centro de investigación Nestle Laussane (Suiza).

Los microorganismos presentes en el estomago son los que únicamente toleran los ácidos, como las bacterias productoras de ácido láctico género *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Patrick y col., 2007).

2.6 Género *Bifidobacterium*

2.6.1 Antecedentes históricos

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de bebés una bacteria con una morfología inusual y desconocida, en forma de Y. Entonces se planteó el problema de la ubicación de esta bacteria en la clasificación contemporánea. A principios de siglo, la taxonomía estaba basada por completo en el criterio morfológico y Tissier, (1900) denominó a esta bacteria "*Bacillus bifidus*". En ese mismo tiempo, en Italia, Moro descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la que Tissier había observado, y la identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*.

A pesar de las diferencias entre esas dos bacterias, Holland en 1920, propuso un nombre común "*Lactobacillus bifidus*", que fue desarrollándose y ganando precisión a lo largo del tiempo en paralelo con el progreso científico. Orla-Jensen, 1924 fue el responsable de la dirección en la historia de la taxonomía de las *Bifidobacterias* y reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* como un taxón separado, pero con muchas similitudes al género *Lactobacillus*, al que las *Bifidobacterias* fueron incluidas en la 7ª edición del Manual Bergey (cuadro 6).

Cuadro 6: Taxonomía del género *Bifidobacterium*

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidocacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies) <i>Gardnerella</i> (1 especie) <i>Aeriscardovia</i> (1 especie) <i>Parascardovia</i> (1 especie) <i>Scardavia</i> (2 especies)

La clasificación e identificación de los microorganismos que se basaba en la morfología cambió su criterio; así la fisiología, los requerimientos nutricionales y las características metabólicas y enzimáticas pasaron a tomar una mayor relevancia.

Actualmente la familia *Bifidobacteriaceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*. La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son Gram positivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO₂, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, catalasa y oxidasa negativas. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35–39°C (Collins y col., 1991).

2.6.2 *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium es un género microbiológico de bacterias Gram positiva, anaeróbicos, no móvil, con frecuencia ramificado. Es uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la flora intestinal y las bacterias que residen en el colon. Ayudan en la digestión, y están asociadas con una menor incidencia epidemiológica de alergias, además, previenen algunas formas de crecimiento de tumores (Singh y Drake, 2003). Las cepas del género *Bifidobacterium* son integrantes mayoritarios de la microbiota intestinal de los niños alimentados con leche materna y uno de los principales grupos de probióticos. Son capaces de ejercer *in vitro* efectos antagónicos frente a importantes patógenos gastrointestinales pertenecientes a los géneros: *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia* y *Candida*. Los mecanismos de acción de las *bifidobacterias* frente a los patógenos gastrointestinales mejor caracterizados incluyen la competición por los sitios de adhesión, la inmunomodulación y la síntesis de compuestos antimicrobianos (Taranto y col., 2005).

La prueba más concluyente de los efectos beneficiosos de determinadas cepas de probióticos se ha establecido utilizando *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium bifidum* BB-12 con fines de prevención de la diarrea aguda, causada principalmente por rotavirus en niños (Parvez y col., 2006).

En otros estudios clínicos con lactantes alérgicos a la leche de vaca, se alivió la dermatitis atópica mediante la ingestión de cepas probióticas *L. rhamnosus* GG y *B. bifidum* BB-12 (Parvez y col., 2006).

2.6.3 Características bioquímicas

En este sentido se han desarrollado diversos métodos para la identificación de cepas probióticas que incluyen el análisis morfológicos de las colonias, el análisis bioquímicos por medio de pruebas de fermentación de carbohidratos (cuadro 7) y actualmente el análisis genético para la diferenciación de especies. Se ha descrito que algunas técnicas moleculares pueden ser de utilidad en la identificación de los microorganismos en cuestión (cuadro 8), entre las que destacan aquellas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que resultan extremadamente valiosos tanto para la caracterización específica como para la detección de tales cepas (Theunissen y col., 2005).

Las *Bifidobacterias* difieren del resto de bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. No producen CO₂ ni los ácidos butíricos y propiónico. En el género *Bifidobacterium*, las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato descrita por Scardovi y col., (1965). Las enzimas aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa están ausentes mientras que la fructosa-6-fosfato es la enzima característica del metabolismo de azúcares del género *Bifidobacterium*. (De Vries y col., 1967). Generalmente son microorganismos catalasa negativos, no reducen los nitratos y emplean amonio como fuente de nitrógeno. No licuan la gelatina, no fermentan el glicerol, no atacan las proteínas coaguladas y no forman indol.

Producen la rápida y completa coagulación de la leche sin formación de gas. La fermentación de la glucosa, lactosa, levulosa, fructosa y galactosa está marcada por la acidificación de la leche. No producen ácidos a partir de rhamnosa, glicerol, eritriol, adonitol (Deguchi y col. 1985) se interesaron en la síntesis de vitaminas por las bifidobacterias de origen humano: tiamina (B1), riboflavina (B2), B6, ácido fólico (B9), B12 y ácido nicotínico. Cinco de esas vitaminas (con la

excepción de la riboflavina) son sintetizadas por muchas especies y en gran cantidad, sobre todo B6, B9 y B12. Algunos autores sostienen que *B. bifidum* y *B. infantis* son muy buenos productores de vitaminas, mientras que *B. breve* y *B. longum* sintetizan pequeñas cantidades y *B. adolescentis* no sintetiza ninguna de esas vitaminas (B6, B9 y B12).

La producción de vitaminas B2 y B6 por *B. longum* es elevada. *B. breve* y *B. infantis* se caracterizan por su elevado nivel de producción de ácido nicotínico y biotina, respectivamente.

Cuadro 7. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium*, *Pariscardovia* y *Scardovia* pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae*.

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pariscardovia</i>	<i>Scardovia</i>
	<i>a</i>	<i>m</i>	<i>ia</i>	<i>a</i>
Crecimiento en anaerobiosis	+	(+)	-	-
Temperaturas de crecimiento (°C)	30-46	25-46	27-44	27-44
Alargamiento de las células después de exposición al oxígeno	+	D	+	+
Arabinosa	+	D	D	-
Celobiosa	-	D	+	-
Lactosa	-	D	+	D
Maltosa	+	D	+	+
Mannitol	-	D	-	-
Mannosa	(+)	D	-	-
Melézitosa	D	D	-	D
Rafinosa	+	D	D	D
Sacarosa	D	+	+	+
Salicina	+	D	+	D
Sorbitol	-	D		
Trehalosa	-	D	D	-
Xylosa	D	D	-	+

+: Respuesta positiva; (+): Respuesta débilmente positiva; -: Respuesta negativa; d: Respuesta variable.

Fuente: Simpson y col. 2004.

Cuadro 8. Técnicas empleadas para identificar las *Bifidobacterias* a nivel de género, especie y cepa.

Identificación a nivel género
Test de la Fructosa-6-fosfato fosfocetolasa
Cromatografía (gas-liquido) de los productos de fermentación
PCR específica de género
Identificación a nivel especie
Morfología celular
Tests de fermentación, Test enzimáticos
Perfiles de proteínas (SDS PAGE)
Estructura de la pared celular
Técnicas moleculares
Hibridación <i>in situ</i> FISH
Identificación a nivel cepa
Campo Pulsado (PFGE); Ribotipado; RAPDs

2. 7 Genero *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* está comprendida por bacterias en forma bacilar de 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10,0 µm, comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas ó microaerófilas, catalasa y citocromo negativos (cuadro 9) (Foo y col. 1993). Excepcionalmente pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos peritricos. Los *Lactobacillus* son auxótrofos quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato (cuadro 10). La temperatura óptima de crecimiento de los *Lactobacillus* está entre 30 – 40 °C (Foo y col., 1993; Morishita y col. 1981). Su hábitat natural es variado pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen alimentos de origen vegetal y animal (Callon y col., 2004; Holt y col., 1998).

La presencia de magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) en el medio facilitan el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*.

Cuadro 9: Características del género *Lactobacillus*

Características	GRUPO I Homofermentativ o Obligado	GRUPO II Heterofermentativo Facultativo	GRUPO III Heterofermentativo Obligado
Fermentación de pentosas.	-	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa.	+	+	-
Presencia de fosfocetolasa	-	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

Fuente: Axelsson, 1998.

El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa. El problema de este medio es que con frecuencia se suelen presentar contaminantes, con lo cual se precisa una mayor selectividad y por ello se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo (De Man, y col., 2009).

Cuadro 10. Propiedades metabólicas de *Lactobacillus casei*

Taxonomía anterior	Taxonomía reciente	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcares
<i>L. casei subsp. Casei</i>	<i>L. casei</i>	10-40 °C	Ribosa, Sacarosa
<i>L. casei Subsp. Paracesei</i>	<i>L. paracasei Subsp. paracasei</i>	10-40°C	Metaboliza gran variedad de azúcares
<i>L. casei subsp. Tolerans</i>	<i>L. paracasei subsp. Tolerans</i>	10-37°C resiste hasta 72°C, 40minutos	Metaboliza gran variedad de azúcares
<i>L. casei subsp. ramnosus</i>	<i>L. ramnosus</i>	15-45°C	Ramnosa

Fuente: DANONE world newsletter 7

2.7.1 *Lactobacillus acidophilus*

El término *Lactobacillus* es la unión de: Lacto que significa leche y bacillus que quiere decir en forma de barra o vara. *Acidophilus* quiere decir con afinidad por los ácidos. Crece fácilmente en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y a unos 45 °C. De manera natural se encuentra en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. No sólo están presente en los intestinos de los animales y en el del propio hombre, sino también en la boca y la vagina. *Lactobacillus acidophilus* absorbe la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentativas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos (Tenney, 1996).

Lactobacillus acidophilus es considerado un microorganismo benéfico por su producción de vitamina K, y sustancias antimicrobiológicas como: *Acidolina*, *acidophilina*, *lactocidina*, y bacteriocinas. Durante la digestión, también ayuda en la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B₆ (piridoxina) (Astiazaran y col., 2003).

Un estudio controlado randomizado de 367 recién nacidos de muy bajo peso, recibieron leche materna más *L. acidophilus* y *B. infantis* o sólo leche materna dos veces al día. La incidencia de enterocolitis necrotizante (ECN) fue baja en el grupo con organismos probióticos, 1.1% vs. 5.3% respectivamente ($p < 0.05$). Estos datos sugieren que la baja colonización de *L. acidophilus* y *B. infantis* en recién nacidos de muy bajo peso al nacer puede ser un factor de riesgo en la infección bacteriana y plantean la administración de probióticos como una estrategia adicional en la prevención de ECN (Parvez y col., 2006).

2.7.2 Mecanismo de acción

La forma de acción que se ha detectado en las bacterias lácticas del género *Lactobacillus* es la capacidad de desconjugar ácidos biliares, mediante un sistema enzimático que permite la transformación a formas no conjugadas de sales biliares, a las que se atribuye un mayor efecto inhibitor sobre algunos gérmenes. Esta acción también tiene relación con un incremento en el catabolismo del colesterol, debido el aumento en la excreción de sales biliares (Gilliland y col., 1977).

2.7.3 Factores de crecimiento

Las diferentes especies microbianas varían ampliamente en sus requerimientos de factores de crecimiento, lo que refleja las diversidades en sus capacidades sintéticas. Algunas especies no necesitan factores de crecimiento en tanto que en otras, como algunos de los *Lactobacillus*, han perdido durante la evolución su capacidad de sintetizar de 30 a 40 compuestos esenciales y, en consecuencia, los requieren del medio de cultivo. Se llama factor del crecimiento a un compuesto orgánico que debe tener una célula para poder crecer, pero que es incapaz de sintetizar (Brooks, 2008).

2.8 Genero *Streptococcus*

Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*, pero la única especie de estreptococos que está asociada a la tecnología alimentaria es *Streptococcus thermophilus*, que se emplea en la fabricación del yogur (junto con *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y con otros microorganismos *L. casei*; *L. acidophilus*; *Bifidobacterium*). *Streptococcus thermophilus* fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919. Su nombre procede del término griego “*therme*” que significa calor y del término “*philus*” que significa afinidad. Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9 µm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4%. No crece a pH superiores a 9,6 ni en leche que posea un 0,1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. La resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos. *S. thermophilus* está incluido dentro del grupo "otros estreptococos" (Schleifer y col., 1987).

El medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17 (Teragazhi y col., 1975).

3. Materiales y métodos

Este proyecto se realizó en el laboratorio de la empresa mexicana GBS Global S.A. de C.V., así como en laboratorios de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila ubicados todos en la Ciudad de Saltillo Coahuila, México.

3.1 Recolección de las muestras

La recolección de cuatro forrajes fue en el mes de agosto 2009. La recolección de forrajes de maíz, frijol y calabaza las cuales fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mientras que el forraje de alfalfa fue en el Rancho Mundo Verde (carretera Saltillo a Monclova kilometro 27).

3.1.1 pH de las muestras

A cada uno de los forrajes se les determinó el pH mediante una tira reactiva (HACH), o bien el uso de potenciómetro (HACH SensION 3), calibrado con una solución buffer pH 4.0, pH 7.0 y 10.0.

3.1.2 Medición de humedad

La medición de humedad de forrajes se llevó a cabo mediante el empleo de una balanza de humedad (OHAUS MB 200) a 110°C por 30 minutos.

El cálculo de humedad fue mediante la ecuación regla de tres (simple directo).

3.1.3 Adaptación de anaerobiosis

Se adaptaron dos tipos de reactores anaeróbicos; uno con capacidad de 275 mL y otro de 3 L. Se emplearon tapas de aluminio perforadas por donde se les colocaron tapones de plástico, cerrándolos herméticamente mediante el empleo de silicón.

3.2 Etapa I: Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos provenientes de forrajes de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.

3.2.1 Obtención y procesamiento de la muestra (microsilos y tratamientos de forrajes ensilados).

Se utilizó cuatro tipos de forrajes que es de maíz, frijol, calabaza y alfalfa.

El ensilado natural se llevó a cabo mediante la disminución de tamaño de partícula del forraje y se colocaron en frascos en condiciones anaeróbicas. Las muestras fueron incubadas en un horno (Shel Lab) a 37°C (6 días).

Durante el ensilaje se midió el pH de cada una de las materias primas con una tira reactiva marca (HACH) antes y después de incubación. La medición de humedad de las materias primas se llevó a cabo mediante el empleo de una balanza de humedad (OHAUS MB 200) a 110°C por 30 minutos, y se calculó la humedad mediante la ecuación anterior.

3.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Todos los microorganismos aislados en este estudio fueron directamente crecidos en medios MRS (De Man, col., 2009).

Se disolvió 61 g del medio en 1 L de agua destilada y se añadió 1 mL de Tween 80 (Fluka n ° 93.780). Se esterilizó en autoclave marca (HACH) a 121 ° C durante 15 minutos.

También se preparó caldo MRS de la siguiente manera: se disolvió 51 g del medio en 1 L de agua destilada y añadió 1 ml de Tween 80 (Fluka n ° 93.780). Posteriormente se esterilizó en autoclave marca (HACH) a 121 ° C durante 15 minutos.

3.2.3 Condiciones de cultivo

Las bacterias aisladas se cultivaron en caldo MRS (Den Man, y col., 2009). Los cultivos bacterianos se realizaron en los frascos reactores (fig. 1) en donde se suministró nitrógeno para sustituir el oxígeno y así llevar a cabo la anaerobiosis y por último se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez turbio el caldo MRS se cultivó en cajas Petri ocupando Agar MRS y se colocó en las jarras reactores (fig. 2), igualmente se incubó a 37 °C durante 24 horas.



Fig. 1. Cultivo en medio líquido

Fig. 2. Cajas petri sometidos en anaerobiosis

3.3 Etapa II: Caracterización macro-, microscópica y bioquímicamente de las cepas aisladas

3.3.1 Selección e identificación de cepas

Las cepas aisladas se purificaron por estría continua y se observó al microscopio óptico para la identificación morfológica y se realizó coloración de Gram, prueba de catalasa y otras pruebas bioquímicas mediante el método de sistema API.

3.3.2 Método API (Biomérieux)

La galería API 20 A incluye 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los microtubos fueron inoculados con una suspensión bacteriana que reconstituyen los medios.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La interpretación de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación, y el reconocimiento se consigue mediante el software de identificación API.

3.3.3 Preparación del inóculo

Con un asa bacteriológica se extrajeron todas las colonias obtenidas sobre el MRS. Se utilizó cultivos puros y jóvenes de (18-24 horas) y posteriormente se suspendió las celular bacterianas frotando el asa estéril mediante rotaciones contra la pared de la ampolla hasta ver turbidez de la suspensión.

3.3.4 Preparación de la galería

Se reunió el fondo y la tapa de la galería y se colocó en una cámara de incubación y se esparció aproximadamente 5 ml de agua destilada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda. La referencia de las cepas se etiqueta la lengüeta lateral de la galería con la referencia de las cepas.

Con una pipeta estéril, se inoculó la galería con la suspensión API 20 A Médium preparada, evitando la formación de burbujas al inclinar ligeramente la galería.

3.4 ETAPA III: Estudio del efecto probiótico de las cepas aisladas de forraje ensilada de maíz, frijol, calabaza y alfalfa

3.4.1 Resistentes de las cepas probióticas a pH bajo

Las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a pH 6,5 y 37 °C durante 24 hrs. Posteriormente, se inocularon 0.1ml cultivo de 24 h en un medio líquido en 20 ml a pH (2.5, 3, 4) ajustados con HCl 2.2 normal. Por últimos se incubaron a 37° C en anaerobiosis durante 24 horas.

3.4.2 Determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas probióticas a diferentes temperaturas.

Las bacterias aisladas en este trabajo se cultivaron en caldo MRS los cultivos se realizó en los frascos reactores en donde se suministró nitrógeno para sustituir el oxígeno y así llevar a cabo la anaerobiosis, se incubó a 40, 50 y 60 °C durante 24 horas.

3.4.3 Selección de microorganismos probióticos con capacidad de coagulación de la leche

Para la selección de microorganismos con capacidad de coaguló de la leche se tomó 10 ml de leche normal (marca Lala) estéril pH 6.4, los cuales fueron inoculados con las cepas de forrajes ensilados de maíz, alfalfa, calabaza y frijol para ello se uso un volumen de 1 % v/v de cultivo de cada una de las cepas a ensayar. Se incubaron a 37° C, sin agitación durante 3 días. Después de tres días de incubación se observó la formación o no de un coagulo uniforme.

3.4.4 Crecimiento en medios hostiles

Los ensayos se realizaron modificando el método propuesto por Suscovic y col. (1997) para ello las cepas se cultivaron en caldo MRS acidificado hasta pH 3 con HCl a 2.2 normal. También se preparo caldo verde brillante para la prueba de bilis de buey 0.20%. En las jarras fue suministrado nitrógeno para llevar acabó la anaerobiosis e incubadas a 37 °C, sin agitación durante 24 horas.

3.4.5 Inhibición de microorganismos patógenos por microorganismos probióticos.

El ensayo se realizó modificando el método propuesto por Suscovic y col. (1997). Para ello cada una de las cepas probióticas seleccionadas se cultivó en caldo MRS y se suministro nitrógeno a las jarras para llevar a cabo la anaeróbico y se incubó a 37 °C, sin agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se sembró los microorganismos patógenos siguientes: *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* (obtenidos del banco de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila) en agar nutritivo.

La actividad antimicrobiana se determino mediante la técnica de difusión en agar utilizando discos de papel filtro con un diámetro de 5.0 mm impregnados con las cepas aisladas, colocando con una pinza sobre los patógenos y por último se incubaron a 37° C bajo condiciones aeróbicas por 24 horas.

3.4.6 Prueba de sensibilidad de las cepas probióticas aisladas a los antibióticos

Cada una de las cepas probióticas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS y se suministro nitrógeno para llevar a cabo la anaerobiosis además fueron incubadas a 37° C, sin agitación durante 24 horas, después de las 24 horas se sembró en cajas Petri. Por último se preparó los cuatro antibióticos (bencipenicilina 600000 ul/ml), ampicilina 500 mg/ml, tetraciclina 250 mg/ml y trimetoprim-sulfametazol 160mg/ml y 800 mg/ml.), en diluciones 10^1 10^2 10^3 . Para

esta prueba se utilizó el método la técnica de difusión en agar utilizando discos de papel filtro con un diámetro de 5.0 mm, impregnados con los antibióticos, colocada con una pinza sobre las cepas aisladas las cajas se acomodaron en jarras e incubaron a 37° C bajo condiciones anaeróbicas por 24 horas.

3.4.7 Estabilidad en el paso por el estomago

Para este prueba en el medio de cultivo MRS se ajustó el pH a 2.5 con acido acético, se evaluó la viabilidad sometiendo las cepas aisladas a esta acidez durante cuatro horas, de la misma manera se evaluó la resistencia de los microorganismo probióticos a sales biliares a concentraciones de 0.20% y se observaron si después de esto hay crecimiento.

4. Resultados y discusión

4.1 Obtención y procesamiento de las muestras

Para llevar una buena fermentación en el proceso del ensilado mediante la acción de bacterias lácticas es necesario tener un control sobre la cantidad de agua libre presente en las muestras. La figura 3 nos muestra el comportamiento del contenido de humedad de las materias primas (frijol, calabaza, alfalfa y maíz), observándose que la cantidad de agua en las muestras de maíz y frijol tienen resultados similares (55-58%); mientras que la muestra de calabaza presentó un contenido bajo de humedad (31%); sin embargo, la muestra de alfalfa fue la que presentó un mayor contenido de humedad. Cada una de las muestras fueron ajustadas a una humedad del 70 % ya que reportes en la literatura mencionan que para obtener un buen ensilado el contenido de humedad debe de oscilar entre 60 y 70% (INIFAP, 2010).

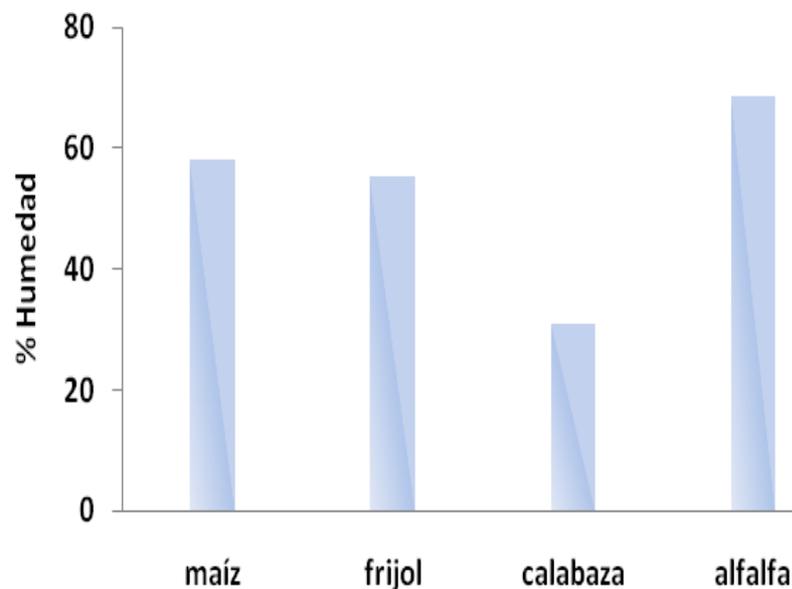


Fig. 3. Contenido de humedad de las materias primas empleadas para el ensilado

Con la humedad proporcionada se logró una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas durante periodo de 6 días. El proceso fermentativo se lleva a cabo mediante la acción de algunos microorganismos dentro de los cuales destacan los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Stefanie, 1999).

Durante proceso de fermentación también es necesario llevar un control del pH de cada muestra de la materia a ensilar. De acuerdo a la composición de carbohidratos simples. En la figura 4 se observa el comportamiento de pH de las materias primas; frijol de (7-6), calabaza de (8) y alfalfa (6-7) no hay disminución rápida de pH debido al bajo contenido carbohidratos simples, sin embargo en la muestra de maíz presentó una disminución más rápido el pH por el contenido rico en carbohidratos ya que reportes en la literatura mencionan que las bacterias ácido láctica enzimas que atacan principalmente materias ricas en carbohidratos (Estrada, 2004).

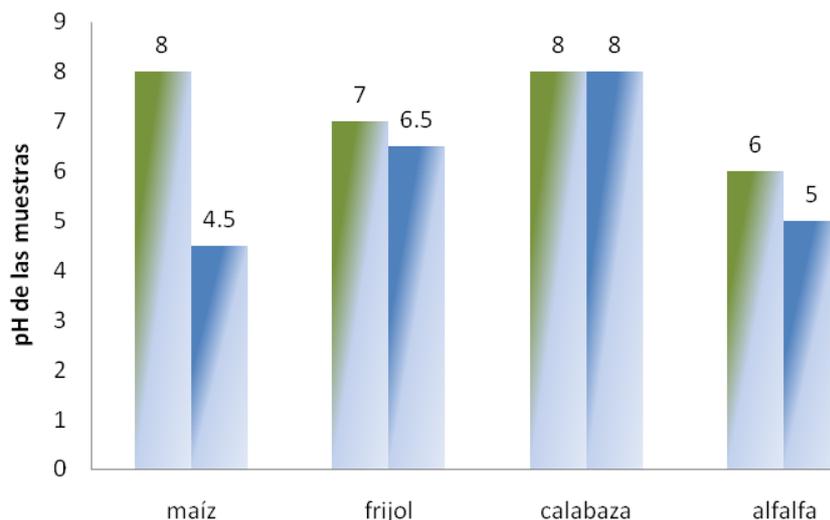


Fig. 4. Comportamiento de pH de las materias primas ensiladas

4.1.1 Selección e identificación de cepas

Para la selección de cepas se observó la morfología microscópica y macroscópicamente de las bacterias seleccionadas.

Inicialmente se aislaron 12 colonias bacterianas. Luego de observaciones al microscopio se hizo una selección descartándose 8 colonias Gram negativas, conservándose 1 cepa de Coco y 3 de Bacilos; las que presentaron morfologías Gram positivas, los reportes de la literatura indican que las cepas probióticas son Gram positiva (Suarez y Hernández, 2008). Las cepas seleccionadas fueron identificadas mediante los códigos siguientes presentados en el cuadro 11.

Cuadro 11. Identificación de cepas aisladas mediante códigos

Tipo de muestra	Procedencia	Código
alfalfa	Rancho Mundo Verde (carretera Saltillo a Monclova)	A-1
maíz	Invernaderos de la UAAAN	M-1
frijol	Invernaderos de la UAAAN	F-1
calabaza	Invernaderos de la UAAAN	C-1

En la figura 5 se observa las cepas M-1 y C-1 (fig. 6 B y C), las cuales presentan una morfología microscópica de bacilos cortos, delgados, formando cadenas largas, separadas entre unas y otras, color purpura, mientras que la cepa A-1 (fig. 6 A) se observaron como bacilos largos, delgados color purpura y separadas entre ellos; y en la cepa F-1 (fig. 6 D) se clasificaron las cepas como cocos pequeños formando colonias entre ellos color purpura. Reportes en los estudios realizados mencionan que en las bacterias ácido lácticas presentan una morfología de bacilos y cocos Gram positivos (Suarez y Hernández., 2008).

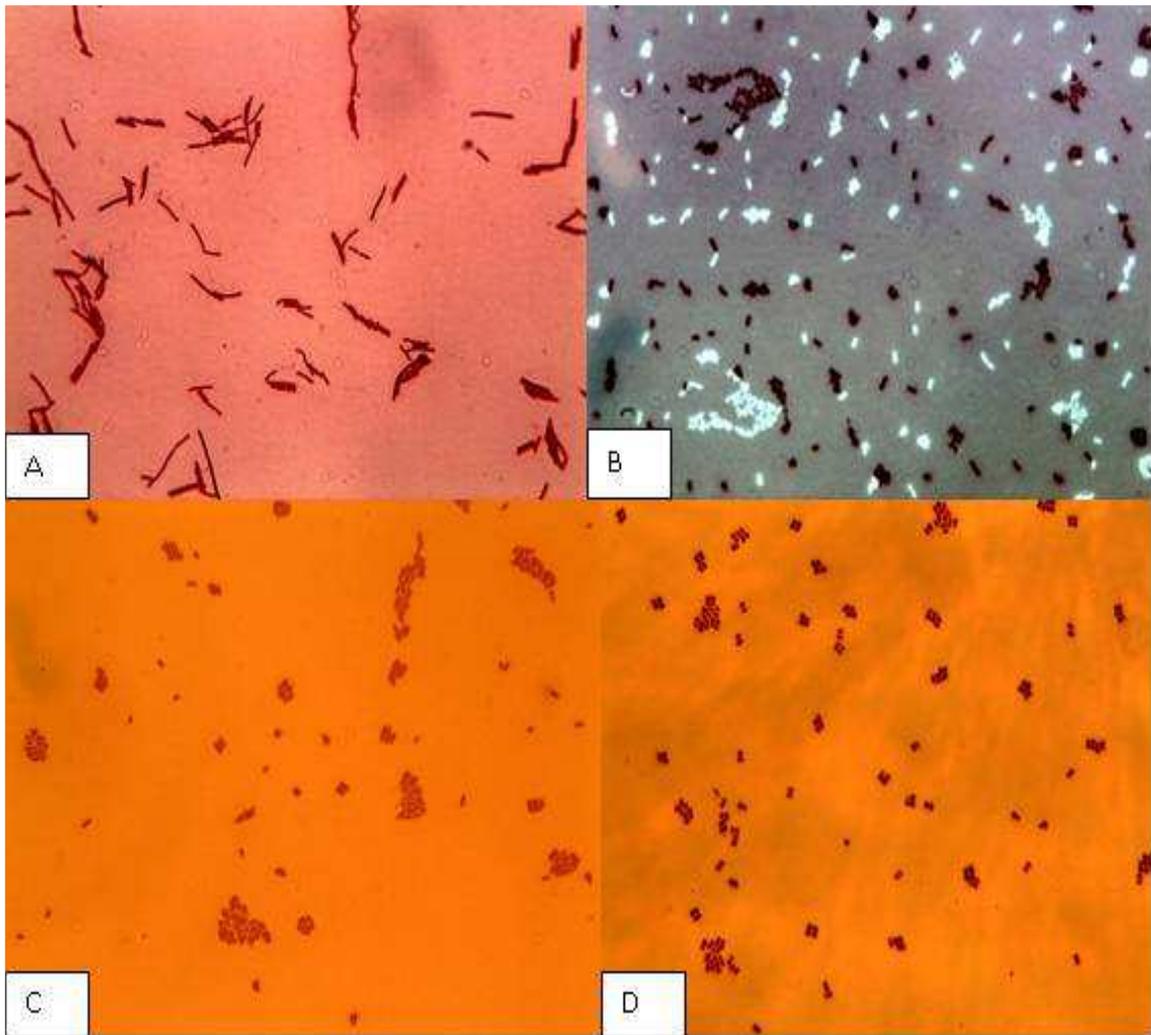


Fig. 5. Morfología microscópica de cepas bacterianas seleccionadas mediante la técnica de tinción de Gram

La morfología de las colonias de las cepas aisladas se observan en el cuadro 12). Las cepas A-1 y F-1 presentaron una morfología similar (tamaño pequeño, forma circular, borde redondo, elevación plana, olor leche ácida y color blanco), en la cepa C-1 su morfología fue de tamaño grande, forma circular, borde redondo, elevación plana, olor leche ácida y color cremoso; y en la cepa M-1 presentó un tamaño grande, forma circular, borde redondo, elevación plana, olor leche ácida y color cremoso; ambas cepas muestran diferencias en tamaño, elevación y color.

Las colonias aisladas presentaron características similares a las descritas en la literatura, los probióticos como *Streptococcus thermophilus* presentan colonias en forma redondas blancas y pequeñas mientras *Lactobacillus delbrueckii sbsp. Bulgaricus* forman colonias irregulares y blancas, *Lactobacillus acidophilus* forman colonias redondas verdes con halo amarillo, *Lactobacillus casei* redondas verdes pequeñas de acuerdo al tipo de medio de cultivo también pueden ser colonias cremosas blancas e irregulares y las *Bifidobacterias* forman colonias redondas cremosas grandes (Reinheimer y Salazar, 2006).

Cuadro 12. Descripción morfológica de las colonias bacterianas aisladas

Cepa	Tamaño	Forma	Borde	Elevación	Olor	Color
M-1	Grandes	Circular	Redonda	Convexa	Leche ácida	Blanca
C-1	Grandes	Circular	Redonda	plana	Leche ácida	Cremosa
A-1	Pequeños	Circular	Redonda	Plana	Leche ácida	Blanco
F-1	Pequeños	Circular	Redonda	Plana	Leche ácida	Blanca

4.2 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas

4.2.1 Prueba de catalasa de las cepas aisladas

Una vez concluido la etapa anterior se realizó la identificación de una enzima típica de las bacterias aerobias que tienen un metabolismo oxidativo que descomponen un producto toxico en agua y oxígeno (Macarulla, col., 1994).

El cuadro 13 se observa que las cepas aisladas (M-1, C-1, A-1 y F.1) presentan ausencia de esta enzima, por lo cual se considera bacterias ácido lácticas ya que estudios similares realizados reportan catalasa y oxidasa negativa (Suarez y Hernández., 2008).

Cuadro 13. Prueba de catalasa de las cepas de los ensilados aislados.

M-1	C-1	A-1	F-1
+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

4.2.2 Pruebas mediante sistema api 20-A

Se realizaron pruebas bioquímicas por el sistema API- 20 A, en donde se realizó un estudio de fermentaciones de 20 azúcares que posee la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH, pasando el medio de color violeta a color amarillo (prueba positiva). Con respecto a la identificación de los microorganismos aislados en este estudio, el sistema API- 20 A, (BioMérieux) permite la identificación de bacterias lácticas mediante la determinación del perfil de fermentación de carbohidratos característico para cada bacteria.

En la figura 6 y el cuadro 14 se observan los resultados del sistema api de las cepas aisladas. La mayoría de las cepas aisladas fueron identificados a nivel de género como *Bifidobacterium spp 2* con una probabilidad de 99.5 % en las cepas A-1, M-1, y C-1 fig. 4 (a, c, d) donde la mayor parte resultó positivo los azucares presentes en la galería y en la cepa F-1 dio negativo en manitol y sacarosa lo cual resultó como *Bifidobacterium spp 2* con una probabilidad de 99%.

En la literatura reportan que se han identificado a nivel de género bacterias probióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica usando el sistema API CHL50 y mencionan que ante sistema no es capaz de diferenciar a nivel especie (Córdoba y col., 2009).

**Cuadro 14. Identificación de las cepas probióticas de las cepas aisladas
mediante el sistema API 20 A**

CHO	C-1	A-1	F-1	M-1
IND	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	-	+
LAC	+	+	+	+
SAC	+	+	-	+
MAL	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+
GLY	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+
MLZ	+	+	+	+
RAF	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+

+ Positivo, - negativo



Fig. 6: Identificación de las cepas aisladas mediante el sistema API 20 A

También se indica que las diferencias se deben a que la base de datos del método API no esté actualizada con respecto a la taxonomía más reciente lo que conducirá a una errónea identificación o resultados confusos (Nigatu, 2000)

4.3 Determinación de la capacidad de crecimiento de las bacterias aisladas a diferentes niveles de temperaturas.

Los microorganismos se clasifican de acuerdo a las temperaturas óptimas de crecimiento. En este estudio es necesario identificar de acuerdo a la capacidad de crecimiento a temperaturas de 40° C, 50° C y 60° C.

En el cuadro 15 se observa el crecimiento de las cepas (M-1, C-1, A-1 y F.1) a temperaturas de 40° C, 50° C y 60°, en los estudios reportados en la literatura, las bacterias probióticas como *Lactobacillus salivarius* con un aumento discreto de la población a 37° C- 45° C, son considerados microorganismos mesófilos (Rondón y col., 2008). Otros como León y col., (2006) observo crecimiento microbiano a temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C con bacterias ácido lácticas donde tuvo supervivencia adecuada a los tratamientos térmicos. *L. alimentarius*, *L. lactis* y *Enterococcua sp* tuvieron conteos mayores a 300 UFC después de ser sometidas a las temperaturas.

En esta investigación las cepas aisladas M-1, C-1, A-1 y F.1 se consideran como microorganismos termófilos ya que resistieron a temperaturas de 40, 50 y 60° C., por lo tanto se puede deducir que tiene posibilidades para ser utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados, (Knut, 2008) se deben considerar además varios factores que pueden influir en la capacidad de los probióticos para sobrevivir en el producto y volverse activos cuando entran al tracto gastrointestinal del consumidor. Las cepas de probióticos no solo deben cumplir con el criterio de supervivencia sino también con el criterio de fermentación y tener una interacción armoniosa con las demás bacterias probióticas.

Cuadro 15: Crecimiento de las cepas aisladas a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	M-1	C-1	A-1	F-1
40	+	+	+	+
50	+	+	+	+
60	+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

4.3.1 Selección de microorganismos probiótico con capacidad de coagulación de la leche

En la aplicación de los microorganismos probióticos en los alimentos fermentados y elaboración de quesos deben de coagular la leche para ser utilizadas como un probiótico con potencial aplicación. En la fig. 7 se observa la coagulación uniforme después de una incubación de 3 días de las cepas A-1, M.1, C-1 y F-1, lo cual coincide los estudios reportados en la literatura identificados como *Lactobacillus* 22 cepas esta propiedad (Mejía y col., 2007).



Fig. 7. Coagulación de la leche de las diferentes cepas probióticas aislada

4.3.2 Crecimiento de cepas aisladas en medios hostiles

Para mejor actividad de los probióticos en el tracto intestinal es necesario que sobrevivan al paso a través del medio ácido del estómago, resistan la bilis presente en el intestino delgado y logren la colonización transitoria del tracto gastrointestinal. Estos son los requisitos esenciales para que una bacteria sea considerada probiótica.

En la figura 8 se muestra las cepas bacterianas aisladas en un medio de cultivo con un pH 3, las cuales conservan su morfología presentada de las pruebas anteriores; la cepa A-1 bacilos largos, delgados Gram positivo, la cepa C-1 y M-1 Gram positivo, bacilos cortos y delgados y la cepa F-1 cocos Gram positivo y pequeños.

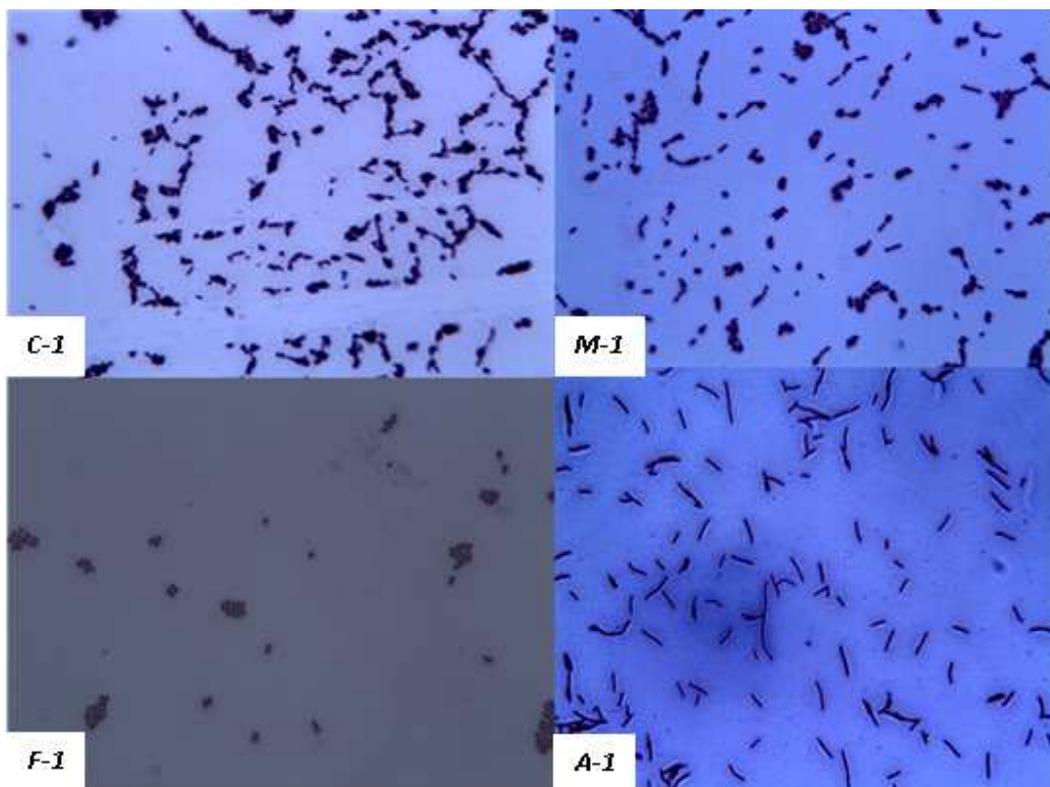


Fig. 8. Identificación microscópica de cepas resistentes en un medio a pH 3

El cuadro 16 se observan el crecimiento en medios hostiles de cepas A-1, M.1, C-1 y F-1., a 0.20 % de sales de sales biliares con el caldo verde brillante para la prueba de bilis de buey. Los resultados obtenidos coinciden en las investigaciones reportadas, 22 cepas identificados como *Lactobacillus*. Estas fueron resistentes a condiciones hostiles a pH 3 y 0.30 % de sales biliares (Mejía y col., 2007).

Cuadro 16: Crecimiento de cepas aisladas en medios hostiles

A-1	M.1	C-1	F-1
+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

4.3.3 Crecimiento de las cepas probióticas a bajo pH, estabilidad en el paso por el estomago y resistencia a sales biliares

Para asegurar la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas a las condiciones existentes en el tracto gastrointestinal de los humanos es necesario probar su estabilidad a pH ácido y sales biliares (Fuller, 1999).

En esta etapa los microorganismos analizados sobrevivieron a pH bajos como a 2.5 como se muestra en el cuadro 17, en el estomago es posible encontrar cantidades importantes de *Lactobacillus* spp (Suarez y Hernández, 1991), no es sorpresivo que las cepas aisladas, aunque con un tipo de generación mayor pudieron crecer en pH 2.5, ya que existen reportes que indican que otras cepas *Lactobacilos* como la M92 de *Lactobacillus acidophilus* solo pueden sobrevivir durante 3 hrs a un pH de 3, produciendo luego la lisis del 60% de la población inicial (Suskovic y col.,1997).

Cuadro 17. Resistencia de las cepas aisladas a diferente pH.

pH	A-1	M-1	C-1	F-1
4	+	+	+	+
3	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

En la prueba de estabilidad paso por el estomago de las cepas aisladas (cuadro 15) resistieron en las condiciones de pH 2.5 por 90 minutos que es el pH del estomago humano y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estomago (O 'Sullivan y col. 1992; Smet y col. 1995). Con este experimento se puede deducir que las cepas aisladas pueden ser utilizadas para elaborar un alimento adicionado con estas bacterias ya que podrian transitar en el aparato digestivo, facilitando de este modo la colonizacion del tracto gastrintestinal (Mejía y col. 2007).

Así estos microorganismos resistieron las sales biliares (cuadro 18) evaluadas con el caldo verde brillante, durante 4 horas lo cual coincide en las investigaciones de (Mejía y col. 2007).

Cuadro 18. Estabilidad paso por el estomago por 90 minutos y resistencia a sales biliares de las cepas aisladas.

A-1	M.1	C-1	F-1
+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

4.3.4 Inhibición de microorganismos patógenos sobre cepas aisladas

El experimento de inhibición de microorganismos patógenos por cepas probióticas se estableció en un diseño de bloques completamente al azar con 8 repeticiones que fueron: cepa probióticas con 4 niveles (*M-1*, *A-1*, *C-1*, *F1*), y microorganismos patógenos con 4 niveles (*E. aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*) se realizó el ANVA y donde fue necesario hacer la prueba de comparación de medias de Tukey. En el cuadro 19 se muestran el ANOVA de la prueba de inhibición de microorganismos patógenos ocasionados por cepas probióticas.

Cuadro 19. Comparación de medias mediante la prueba deTukey.

F.V.	g.l.	SC	CM	Fc	Probabilidad
Repetición	7	12.7187	1.8169	1.09	0.3740
Cepas probióticas	3	115.5937	38.5312	23.15	0.00001
Microorganismo patógeno	3	21.5937	7.1979	4.32	0.0065
c*p	9	204.3812	22.7534	13.67	<0.0001
Error	105	174.7812	16.1221		
Total	127	529.4687	1.6645		

De las 4 cepas analizadas todas mostraron actividad antimicrobiana, expresada como halos de inhibición. En la fig. 9 se muestra que no existe diferencia significativa entre las cepas *M-1* Y *A-1* ya que tienen la misma actividad antimicrobiana pero si hay diferencias significativas entre estas dos cepas contra las cepas *C-1* *F-1* lo cual inhibieron menos. Algunas cepas de *Bifidobacterias* excretan sustancias antimicrobianas incluso con un espectro de actividad muy amplio (Simmering y Blaut, 2001).

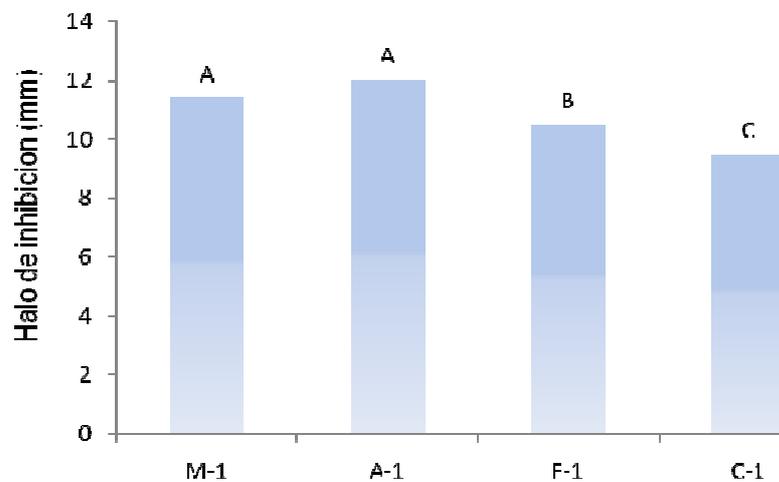


Fig. 9. Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas

En la figura 10 se aprecia que el *Staphylococcus aureus* resultó ser significativamente diferente entre las demás cepas patógenas, puesto que mostró más sensibilidad ante las cepas C-1 y M-1, estos resultados coinciden con las investigaciones de (Calderón y col, 2007) que trabajaron con cepas probióticas y evaluaron su actividad antimicrobiana contra los patógenos. En donde el microorganismo más sensible a probióticos que ellos observaron en sus ensayos fue *Staphylococcus aureus*.

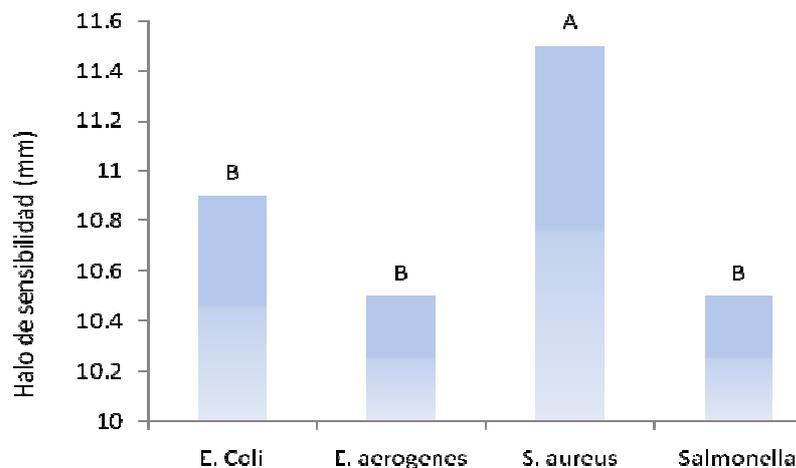


Fig. 10. Sensibilidades de los patógenos sobre las cepas aisladas.

4.3.5 Prueba de sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos

Con frecuencia las personas afectadas por diarrea de origen microbiano, son tratadas con antibióticos, que no solo pueden afectar a los patógenos sino también a microorganismos normales del huésped.

Entre estos últimos podrían estar los probióticos es por ello que otra propiedad deseable hasta cierto punto es que sean resistentes a antibióticos. Por esta causa se probó la sensibilidad de las cepas frente a cuatro antibióticos normalmente usados. Ellos fueron bencilpenicilina, ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol como podemos ver los resultados en el cuadro 20 no fue satisfactorio ya que solo las cepas A-1 resistió en los cuatro antibióticos y en la cepas F-1 solamente trimetoprim- sulfametoxazol a dosis normales mientras que los demás cepas fueron sensibles.

Cuadro 20. Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos a concentraciones normales.

Cepas	Bencilpenicilina (600000 ul /mL)	Ampicilina (500 mg/mL)	Tetraciclina (250 mg/ mL)	Trimetoprim-Sulfametoxazol (160/800 mg/mL)
<i>M-1</i>	-	-	-	-
<i>F-1</i>	-	-	-	+
<i>C-1</i>	-	-	-	-
<i>A-1</i>	+	+	+	+

+ Positivo, - negativo

De acuerdo a que la mayoría de las cepas resultó negativo contra los antibióticos a dosis normales, por lo cual se vio la necesidad de probar a concentraciones más bajas por lo tanto fueron diluidos, en el cuadro 21 se observa la sensibilidad de la cepa *F-1* resistió en bencilpenicilina a una dosis de 600 ul/ml, ampicilina a una dosis de 0.5 mg/ml y Trimetoprim-sulfametoxazol resistió a las tres diluciones (16/80 mg/ml, 1.6/8 mg/ml, 0.16/0.8 mg/m); en la cepa de *C-1* solo tetraciclina a una dosis de 0.25 mg/ml y trimetoprim-sulfametoxazol a una dosis de 0.16/0.8 mg/ml y mientras que en la cepa *M-1* no resistió en ninguna de las diluciones.

Cuadro 21. Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos mediante diluciones seriadas

Antibióticos	Diluciones	<i>M-1</i>	<i>F-1</i>	<i>C-1</i>	<i>A-1</i>
Bencilpenicilina	60000 ul/mL	-	-	-	+
	6000 ul/mL	-	-	-	+
	600 ul/mL	-	+	-	+
Ampicilina	50 mg/mL	-	-	-	+
	5 mg/mL	-	-	-	+
	0.5 mg/mL	-	+	-	+
Tetraciclina	25 mg/mL	-	-	-	+
	2.5 mg/mL	-	-	-	+
	0.25 mg/mL	-	-	+	+
Trimetoprim-sulfametoxazol	16/80 mg/mL	-	+	-	+
	1.6/8 mg/mL	-	+	-	+
	0.16/0.8 mg/mL	-	+	+	+

+ Positivo, - negativo

Resultado similar que han sido reportados por otros autores (Mejía y col., 2007 y Suskovic y col., 1997) trabajando con la cepa M92 de *Lactobacillus acidophilus* encontraron resistencias hacia trimetoprim-sulfametoxazol; incluso con concentraciones tan altas como 25 µg; sin embargo para el caso de ampicilina hubo sensibilidad a partir de concentración de 0.5 µg.

El empleo de estas bacterias, resistentes a algunos antibióticos es interesante en la manufactura de productos lácteos. Por otro lado es importante señalar, que hay autores que consideran que la resistencia a los antibióticos no es una propiedad deseable en probióticos, ya que por intermedio de plásmidos podrían transferirse a bacterias patógenas presentes en el intestino del huésped creando situaciones no deseables para la salud (Mejía, y col., 2007). Estas cepas se pueden considerarse posibles probióticos de gran utilidad en la industria alimentaria.

5. Conclusiones

Se lograron aislar y mantener 3 cepas de bacilos Gram positivo, catalasa negativa e identificadas mediante el sistema API 20 A como *Bifidobacterium sp 2* a partir de ensilado de forraje maíz calabaza y alfalfa. Mientras que a partir de forraje ensilado de frijol se logro aislar y mantener una cepa de coco Gram positiva, catalasa negativa e identificado como *Bifidobacterium sp 2*

Estas cepas presentaron algunas características probióticas, tales como resistencia a temperaturas de 40° C, 50° C y 60° C, a pH ácido y a sales biliares, además coagularon la leche y poseen acción antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp* y *Enterobacter aerogenes*.

Las cepas A-1 presentaron resistencia a los antibióticos bencilpenicilina dosis 600000 ul /ml, Ampicilina dosis 500 mg/ml, Tetraciclina dosis 250 mg/ml y Trimetoprim-sulfametoxazol dosis 160/800 mg/ml, las cepas F-1 resistieron a concentraciones bajas en Trimetoprim-sulfametoxazol dosis 160/800 mg/ml, Ampicilina dosis 0.5 mg/ml y las cepas C-1 en Tetraciclina dosis 0.25 mg/ml mientras que en las cepas M-1 fueron sensibles a los a los 4 antibióticos.

6. Recomendaciones

Las cepas solo fueron identificadas con el API 20 A que arrojó un resultado de *Bifidobacterium Spp 2* , es necesario probar con la prueba bioquímica API 50 CHL, para ver si hay cambios en la identificación y realizar pruebas complementarias que señala el sistema API así como otras características más amplias para recomendar como un probiótico.

7. Bibliografía

1. **A.O.A.C.** (1980). Métodos Oficiales de Análisis. Association of Official Analytical Chemistry. Washintong, D.C.U.S.A.
2. **Alais Ch.** (1985). Ciencia de la Leche: principios de Técnica Lechera. Editorial Reverte, S.A. España. pág. 359-364.
3. **Álvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A.** 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1567-1576.
4. **Axelsson, L.** (1998). Lactic Acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional aspects. (Salminen, S. and Von Wright, A., eds).Marcel Dekker, Inc. New York pag 20-24.
5. **Becker Underwood.** (2005). Inoculante para ensilaje Lactosilo. Información industria. Sitio argentino de Producción Animal. Pág. 2-4
6. **Belén Silveira Rodríguez manuela, Susana Monereo Megías y Begoña Molina Baena.** (2003). ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRICIÓN ÓPTIMA. ¿CERCA O LEJOS? Rev. Esp Salud Pública 2003; 77: 317-331 N.º 3.
7. **Brooks Geo F. y col.** (2008). Microbiología medica. Editorial manual el moderno, pp 207-213
8. **Calderón Oscar, Carolina padilla, Carolina chaves, Laura Villalobos y María Laura Arias.** (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION. 57 (1), P.53
9. **Callon, C.; L. Millet & M. C. Montel.** (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. Journal of Dairy Research, 71 (2). 231 – 244.

10. **Collins**, M.D., Rodriguez, U., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77 ,pp. 5-12
11. **Córdoba** Manuela, Carolina Chávez y María Laura Arias, (2009). Identificación, cuantificación y de sensibilidad a antibióticos de bacterias Probióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica. *Archivo latinoamericano de nutrición. Costa Rica.* 59(2) pág.
12. **Curró** Claudia y Bruno Juan J. (2008). Componente Capacitación y Difusión, *Notiganadero* 1(13).
13. **Danielsen**, M., Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1-11.
14. **De Vries**, W., Stouthamer, A.H. (1969). Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Microbiol.* 65, 275-287.
15. **Deguchi**, Y., Morishita, T., Mutai, M. (1985). Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.* 49, 13-19.
16. **Deman**, Rogosa y Sharpe. (2009). *Lactobacillus* Agar. FLUKA analítico 69964 agar MRS. MRS Agar
17. **Dunne**, C., Fonden, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reiniero, R., Saarela, M., Salminen S., Saxelin, M., Schiffrin, E. Shanahan, F., Vaughan, E., Wright, A. (2001). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Tech.* 10, 393-399.
18. **Estrada** Álvarez Julián. (2004). Pastos y Forrajes Para Trópico Colombiano. Editorial Universidad de Caldas Ed 1º Manizales Colombia Pág. 181-195

19. **Foo**, E. L.; H. G. Griffin; R. Mollby & C. G. Hedén. (1993). The Lactic Acid Bacteria. Horizon Scientific Press. United Kingdom, 89 – 91.
20. **Fuller**, R. (1989). A review Probiotics in Mand and Animals. J. Applied Bact. 66:365-378.USA.
21. **Fuller**, R. (1999). Probiotics for farm animals. In Probiotics: A Critical Review, G.W. Tannock, ed. Wyomndham, UK: Horizon Scientific Press. pp. 15-22.
22. **Garibay** García, Ramírez Quintero y Munguía López. (2004). Biotecnología de alimentos. Limusa noriega editores S.A. Balderas 95, México, D.F. pág. 90.
23. **Gilliland** S.E. y M.L. Speck. (1977). Deconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli. Appl. Envicrom. Microbiol. 33:15_18. USA.
24. **GIMENO** CREUS EVA. (2004). Alimentos probióticos y prebióticos. NUTRICION. Vol. 23 No. 5. P. 91-93.
25. **Héller**, S., Solórzano, F., Pérez, R., Blasco y González, J.M., Vargas, F. (2001). Probióticos. Una alternativa eficaz en el tratamiento de la diarrea y otros trastornos del tubo digestivo. Byk Gulden. México. Pag. 80.95
26. **Hernández** R. M. y col., (2001). Alimentacion Infantil, Edición Díaz de Santos S.A. Juan Bravo 3-A 28006 Madrid España, pág. 229-309
27. **Holdeman**, L.V., Good, L.J., moore, W.E.C., (1976). Human Faecal Flora Variation In Bacterial Composition Within Individual and a Possible Effect of Emotion Stress. Appl. Environ Microbial. 31: 359-375.
28. **Holland**, D.F. (1920). Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.* 5, 215-229.
29. **Holt**, J. G.; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath; J. T. Staley & S. T. Williams. (1998). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th edition). Pág.: 528, 529, 532, 533, 566.

30. **Hortensia** Silla Santos M. (2004). Dieta mediterránea y alimentos funcionales seguridad alimentaria. Editorial de la UPV Valencia. Pág. 47-63.
31. **Iciar** Astiazaran Anchia, Berta Lasheras Aldas, Arturo H. Ariño Plana y J Alfredo Martínez Hernández. (2003) alimentos en la Nutricion en la Práctica. Editorial Santos. Madrid España. Pág. 69-76.
32. **JASTER** E. (1995). Legume and grass silage preservation. *In: Post-harvest physiology and preservation of forages*. Ed. by K. Moore, M. Peterson, D. Kral; M. Viney. Wisconsin, EE.UU., CSSA Special Publication 22, p. 91-115.
33. **Knut** J. Héller (2008). Bacterias Probioticas en Alimentos Fermentados. Características de los Probioticos y microorganismos iniciadores. Pag. 120-125.
34. **Leon** Victoria y col., 2006. Efecto de Bacterias acido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Julio, año/vol.5 numero 002 Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México. pp 135-141
35. **Macarulla** Jose M. Felix M. Goni. (1994). *Bioquímica Humana; Curso Basico*. 2º edición; Editorial Reverté S.A. Barcelona España. pág. 161.
36. **Mattila-Sandholm**, y col., (2000). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Tech.* 10, 393-399.
37. **Mejía** Rodríguez José Andrés, Chacón Zarck Rueda, Balmore Guerrero Cárdenas, Julio Otoniel Rojas y Guillermo López Corcuera, (2007). Obtención de Cepas de Lactobacillus: Caracterización In-vitro como Potencial Probiótico. *Venezuela Vol.18(002)* pág. 178-185
38. **Morishita**, T.; Y. Deguchi; M. Yajima; T. Sakurai & T. Yura. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148(1): 64 – 71.

39. **Morishita**, T.; Y. Deguchi; M. Yajima; T. Sakurai & T. Yura. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148(1): 64 – 71.
40. **Nagendra**, G. (2001). Functional Foods from probiotics and prebiotics. *Food Tech.* 11, 46-53.
41. **Nigatu** A. (2000). Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CHL patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology* 89 (6):969–978.
42. **O’Sullivan**, M,G, Thornton, G, Y Collins, J., (1992). Probiotic Bacteria: Myth Or Reality? In: *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 31; pag. 301-314.
43. **Orla-Jensen**, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*. 4, 468-480.
44. **Parvez**, S; Mali, K.A. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*. KR. 100. 1171–1185.
45. **Patrick** R. Murray, Ken S. Rosenthal y Michael A. Pfaller (2007). *Microbiología Medica Quinta Edición*. Madrid, España, S.A. pág. 85-86.
46. **Reinheimer** Jorge y Carlos Salazar. (2006). *Avances en Microbiología, bioquímica y Tecnológica de Quesos*. Universidad Nacional de Litoral Santa Fe, Argentina pág. (76-77)
47. **Roberfroid** MB, (2000), Conceptos y la estrategia de la ciencia de los alimentos funcionales: la perspectiva europea, *Am J Clin Nutr.* (6 Suppl): 1660-4S; discusión 1674S-5S.
48. **Rondón** A. J., y col., (2008). Aislamiento e Identificación y Caracterización Parcial de las Propiedades Probióticas de Cepas de *Lactobacillus sp.*

- Procedentes del Tracto Gastrointestinal de Pollos de Ceba. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Vol. 6 numero 001. Reynosa, México. pág. 56-63
49. **Sanders**, M.E., and Huis in't Veld. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, pp. 293-315.
50. **Sanz**, Y., Collado M.C., Dalmau, J. (2003). Probióticos: Criterios de Calidad y Orientaciones para el Consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9) 476-482.
51. **Scardovi**, V. Trovatelli, L.D. (1969). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* 15, 19-29.
52. **Schleifer**, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., Neve, H. 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 386-388.
53. **Shah**, N., (2001), Functional Foods from Probiotics and Previotics, *Foodtechnology*, Nov. 55/11:46-53.
54. **Simmering**, R. y Blaut, M. (2001). Pro-and-prebiotics-the tasty guardian. *Microbiol. Biotechnol.*, 55. 19-28.
55. **Simpson**, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Methods.* 57, 9-16.
56. **Siuta-Cruce**, P. y Goulet, J., (2001). Improving Probiotics Survival Rate, *Foodtechnology*, Oct. 55/11:46-53.
57. **Smet**, I De, et al (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. In: *The Journal Applied of Bacteriology*. Vol. 79, No. 3; pag. 292-301

58. **Somarribas M.** (2007). Efecto de diferentes densidades de maíz y diferentes agotamientos del agua disponible en el suelo sobre la producción de forraje de maíz asociado con mucuna. Tesis de maestría. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Pág. 90
59. **Stefanie J.W.H. Oude Elferink, Frank Driehuis, Jan C. Gottschal y Sierk F. Spoelstra.** (1999). Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos. Editado por L. 't Mannetje. Colombia estudio 2. Pág. 17-20
60. **Suarez Murcia Juan Carlos, Javier Hernández Fernández.** (2008). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a Partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los Municipios de pacho (cundinamarca) y belén (boyaca). Universidad de la Salle Facultad de zootecnia Bogotá D.C. pág. 50-51
61. **Suskovic, J.; Brkic, B.; Maticic, S.; Maric, V.** (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft.* 52: 430-435.
62. **Tenney Deaane.** (1996). *Acidophilus.* Woodlan Publishing. P.O. Box 160 Pleasant Grove, UT 84062 pag 11-20.
63. **Theunissen J, TJ Britz, RC T orriani and RC.Witthuhun** (2005). Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiology.* 98: 11-21.
64. **Tissier, H.** (1900). La putrefacción intestinal. *Bull. Inst. Pasteur.* Paris. Pag. 20-25
65. **Tourmut, J.** (1994). Perspective de Développement des Probiotiques A Base de Bacteries Lactiques en: *Bacteries Lactiques.* Vol II, ed. H. Roissart. T Luquet FM., Lorica. Pág. 50-27.
66. **Varo L. B., Doris J. L. E., Elsa Irma Q.R. Carlos V. S.,** (2005) Probioticos ¡Una Alternativa Para la Salud!. *Revista Digital Universitaria.* • V. 6 N. 4 • ISSN: 1067-6079.

67. **Villoslada**, y col., (2007). Alimentos funcionales: Efectos beneficiosos en niños sanos del consumo de un producto lácteo que contiene dos cepas probióticas. *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT5714. Nutrición hospitalaria. *Departamento de Inmunología y Estudios preclínicos*. Granada. España. 22(4):496-502 ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ S.V.R. 318.

7.1 Consultas web

1. **(Web 1)**. Disponible en INIFAP. (2010) Tecnología para la Conservación de Forrajes: Ensilado y Henificado. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tecnología No. 16 San Luis Potosí México. Disponible en <http://www.inifap.gob.mx> 27/01/2010 4:00 pm
2. **(Web 2)**. Disponible en INIFAP-SAGARPA. (2010). Conservación de forrajes por el método de ensilaje. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Pecuarias. Unión Regional Ganadera de Jalisco. Disponible en <http://www.inifap.gob.mx> 27/01/2010 4:00 pm
3. **(Web 3)**. Gibson, GR. (2002). British Journal of Nutrition. Probiotics as modulators of the gut flora. 88 (1).
Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/artid/perspectivas-probioticos/>.
25/08/ 2009 10:00 am
4. **(Web 4)**. Singh, T; Drake, M. (2003). Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective.
Disponible en: <http://www.members.ift.org/NR/rdonlyres/20702.pdf>.
30/08/2009 1:00 pm
5. **(Web 5)**. Taranto, M; Medicini M. (2005). Revista Química Viva (1).
Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/taranto.htm>.
05/10/2009 1:00 pm

6. **(Web 5)**. Disponible en FAO/WHO. 2002. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>

10/11/2009 1:00 pm

7. **(Web 5)**. Marquina, D. y Santos, A. Probióticos, prebióticos y salud.

Encontrado en Disponible en:

http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32_24.pdf 25/11/2009 1:00 pm

8. Anexos

Anexo I: Composición del medio MRS

Cuadro No. 1. Composición de agar MRS

Composición (gramos por litros)	
Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Fosfato dipotasico	2 g
Agar	13 g

Cuadro No. 2. Composición de caldo MRS

Composición gramos por litro	
Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotasico	2 g

Anexo II: Control de humedad y ph de las muestras aisladas

Cudro 1: Medición de pH.

Condiciones	Maíz	Frijol	Calabaza	Alfalfa
Antes de fermentación	8.0	7.0	8.0	6.0
Después de fermentación	4.5	6.5	8.0	5.0

Cuadro 2: Medición de humedad

% de humedad	
Maíz	58.24
Frijol	55.23
Calabaza	31.12
Alfalfa	68.59

Anexo II Sistema api 20 a

Cuadro: 1 Identificación API 20 A

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
<u>IND</u>	L-triptófano	0,98	formación de INDOLE	<u>XYL - mezclar / 2-3 min + EHR / 5 min</u> amarillo rojo	
URE	urea	0,648	UREasa	amarillo-anaranjado	rojo
GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA	D-glucosa D-manitol D-lactosa (origen bovino) D-sacarosa D-maltosa salicina D-xilosa L-arabinosa	1,96 1,96 1,96 1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidificación (GLUCosa) acidificación (MANitol) acidificación (LACTosa) acidificación (SACarosa) acidificación (MALtosa) acidificación (SALicina) acidificación (XYLosa) acidificación (ARABinosa)	BCP púrpura amarillo / verde- amarillento	
<u>GEL</u>	gelatina (origen bovino)	0,6	hidrólisis (proteasa) (GELatina)	sin difusión del pigmento (1)	Difusión del pigmento negro (1)
ESC	esculina citrato férrico	0,36 0,11	hidrólisis (β-glucosidasa) (ESCulina)	amarillo (2)	marrón-negro (2)
				<u>bajo rayos UV (365 nm)</u> fluorescencia sin fluorescencia	
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glicerol D-celobiosa D-manosa D-melecitoso D-rafinosa D-sorbitol L-rhamnosa D-trehalosa	1,82 1,86 1,96 1,96 2,18 2,18 1,96 1,96	acidificación (GLYcerol) acidificación (CELobiosa) acidificación (MaNosE) acidificación (MeLeZitoso) acidificación (RAFinosa) acidificación (SORbitol) acidificación (RHAmnosa) acidificación (TREhalosa)	BCP púrpura amarillo / verde- amarillento	
CAT		-	CATalasa	Después de 30 min al aire libre <u>H₂O₂ en un tubo positivo</u> ausencia de burbujas presencia de burbujas	
SPOR		-	esporas	ausencia	presencia
GRAM		-	coloración de Gram	rosa	violeta
COCC		-	morfología	bacilo	coccus

Cuadro 2: Composición api 20 a

API 20 A médium 4 ml	
Tripticasa	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	2.5 g
L- triptófano	0,2 g
L- cistina	0,4 g
Hemina (origen porcino)	0,005 g
Vitamina K1	0,01 g
Sulfito sódico	0,1 g
Agua desmineralizada pH 6,9-7,3	csp 1000 ml

Anexo V sistema SAS

SISTEMA SAS			CODIGO CEPAS PROBIOTICAS	
PROCEDIMIENTO ANOVA			M-1	1
			F-1	2
Clase	niveles	valores	C-1	3
C	4	1,2,3,4	A-1	4
P	4	1,2,3,4		
Z	2	12		
R	8	1,2,3,4,5,6,7,8	CODIGO DE CEPAS PATOGENAS	
Números de observaciones 128			<i>E. coli</i>	1
Sistema SAS			<i>E. aerogenes</i>	2
Variable dependiente : h			<i>S. aureus</i>	3
			<i>Salmonella</i>	4

Fuente	DF	suma de cuadrados	cuadrado de media	F-Valor	Pr> F
Modelo	22	354.68	16.12	9.69	<.0001
Error	105	174.78	1.66		
Total correcto	127	529.46			

R-
cuadrado Coef var Raiz MSE h Media
0.66 11.88 1.29 10.85

Fuente	DF	ANOVA	cuadrado de media	F-Valor	Pr> F
R	7	12.71	1.81	1.09	<0.3740
C	3	115.59	38.53	23.15	<0.0001
P	3	21.59	7.19	4.32	0.0065
c*p	9	204.78	22.75	13.67	<0.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para h

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 105
Error del cuadrado medio 1.6645
Valor critico del rango estudentizado 3.6920
Diferencia significativa minima 0.8421

Medias con la misma letra no son significativa diferentes

Tukey

agrupamiento	media	N	P
A	12.00	32	4
A	11.4375	32	1
B	10.5	32	2
C	9.5	32	3

Prueba del rango estudentizado de tukey (HSD) para h

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	105
Error del cuadrado medio	1.6645
Valor critico del rango estudentizado	3.69203
Diferencia significativa minima	0.8421

Medias con la misma letra no son significativa diferentes

Tukey

agrupamiento	media	N	P
A	11.5	32	3
B	10.9375	32	1
B	10.5	32	2
B	10.50	32	4