

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados

POR:

CLELITA LÓPEZ DÍAZ

T E S I S

**Presentada 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”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**POR:
CLELITA LÓPEZ DÍAZ**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por:

**Dr. Antonio Aguilera Carbó
PRESIDENTE DEL JURADO**

**Dr. Heliodoro de la Garza Toledo
VOCAL I**

**Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
VOCAL II**

**Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
VOCAL III**

**ING. José Rodolfo Peña Oranday
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN
DE CIENCIA ANIMAL**

**Buenavista, 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 UAdeC 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. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

A G R A D E C I M I E N T O

Le agradezco a **Dios** la razón de mi existencia, por regalarme cada instante de esta hermosa vida, por bendecirme y guiarme en este caminar de la vida.

A mi Alma Terra Mater, por permitir construirme como profesionista.

A mi asesor de tesis, Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, por su colaboración, paciencia y asesoría brindada para el desarrollo para este proyecto de investigación.

A todos mis profesores del departamento de ciencia y tecnología de alimentos que influyeron en mi formación profesional: M.C. Xochitl Rúelas Chacón, Q.F.B. Oscar Noé Reboloso Padilla, Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, Dra. Lourdes Caballero, Q.F.B Carmen Julia, M.C Carmen Pérez, Dra. Ana Verónica.

A los Asesores de la U.A de C. Raúl Rodríguez Hernández y Dr. Cristóbal Noé Aguilar, por su colaboración en la realización de este proyecto incondicional y por sus conocimientos compartidos.

A CEMAP y todas las personas que ahí laboran. En especial al **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández** por su apoyo incondicional en este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A ustedes los arquitectos de mi destino:

Ignacio López Roblero y Roselia Díaz Roblero

Que día a día me dieron fortaleza, cariño, comprensión y apoyo, porque me enseñaron que lo más importante es conseguir nuestras metas a través de la honestidad, disciplina y responsabilidad en el trabajo. Por heredarme el tesoro más valioso y por cumplir mi sueño, que también es su sueño.

A mis hermanas: Leysalva, Ana, Idillami, Nancy Dayeni, Por ser mis mejores amigas en esta vida y a mi único y **gran hermano Igner Fco.** Gracias Dios por la dicha de tenerlo.

A mis cuñados: Daniel, Fernando, Mixar ; por formar parte de la familia.

A mis sobrinos: Fernando, Kenia, Jerson, Lluvia; por darme la dicha de compartir momentos inolvidables en esta vida bella y porque ustedes forman parte de mi alegría.

A alguien muy especial en mi vida mi novio...Ing. José Ángel Flores Reyes; Por sembrar en mi el sentimiento del AMOR y por todos los momentos inolvidables que hemos compartido. TE AMO.

A la Familia Flores Reyes, por el cariño y apoyo que me han brindado día con día.

A Jacqueline, Berenice y Genoveva, porque formamos una valiosa amistad que durará para siempre, he contado con ustedes aunque hemos tomado caminos diferentes, siempre las tengo presentes.

A mi sobrina Laura Gómez López †, mi tío Lorenzo López Roblero †; gracias por esos momentos inolvidables y aunque no estén con nosotros pero siempre formaran parte de nuestra familia en nuestras memorias.

A mis amigas del internado Nayeli, Angie, Juanita; porque siempre he contado con su apoyo, comprensión y cariño.

A mis amigas, a Ventura, Amalia, Elena, Marina, Luzvia, Alejandra, Mayra, Esmeralda, Dolores, Angelina, quienes me apoyaron y compartieron la felicidad de un nuevo triunfo.

Aun amigo que Dios me ha dado.

A todos aquellos que no he mencionado pero que no he olvidado y que tuvieron una parte importante en este trabajo.

“Guárdalos como a la niña de tus ojos; escóndelos bajo la sombra de tus alas. Salmos 17:8”.

Índice general

<i>AGRADECIMIENTO</i>	<i>i</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>ii</i>
Índice general.....	iii
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	vii
RESUMEN.....	ix
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Justificación.....	4
Capítulo 2.....	5
Revisión de literatura.....	5
2.1 Alimentos funcionales.....	5
2.2 Probióticos.....	7
2.2.1 Definición.....	8
2.2.2 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos.....	9
2.2.3 Criterios para desarrollar un producto probiótico.....	12
2.2.4 Prebióticos y simbióticos.....	14
2.3 Flora bacteriana del aparato digestivo.....	15
2.4 Bacterias ácido lácticas.....	18
2.4.1 Género <i>Lactobacillus</i>	20
2.4.1.1 <i>Lactobacillus casei</i> como probiótico.....	21
2.4.2 Género <i>Streptococcus</i>	22
2.4.3 Género <i>Bifidobacterium</i>	23
2.4.3.1 Antecedentes Históricos.....	23
2.4.3.2 Características culturales y morfológicas.....	24

2.4.3.3 Características fisiológicas.....	25
2.4.3.4 Características bioquímicas	27
2.5. Leche de cabra.....	30
2.5.1 Generalidades	30
2.6 Suero de leche de cabra	31
2.6.1 Generalidades	31
2.7 Jocoque.....	32
2.7.1 Generalidades	32
Capítulo 3.....	32
Materiales y métodos	33
3.1 Etapa I: Aislamiento y purificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados.....	33
3.1.1 Obtención y procesamiento de las muestras.....	33
3.1.2 Aislamiento y purificación de cepas probióticas.....	34
3.1.3 Medios y condiciones de cultivo	34
3.1.3.1 Adaptación de reactores para crear condiciones de anaerobiosis....	34
3.1.3.2 Cultivo en medio líquido	35
3.1.3.3 Cultivo en medio sólido	35
3.2. Etapa II. Caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de las cepas aisladas	37
3.2.1 Selección de las cepas probióticas.....	37
3.2.1.1 Caracterización macroscópica	37
3.2.1.2 Caracterización microscópica	37
3.2.1.3 Prueba de la catalasa.....	38
3.2.1.4 Identificación bioquímica mediante el sistema API 20 A	38
3.3. Etapa III: Estudio del efecto probiótico in vitro de las cepas aisladas de leche de cabra y sus derivados.	40
3.3.1. Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH's	40
3.3.2. Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas	40
3.3.3. Capacidad de coagulación de la leche	40

3.3.4. Crecimiento en medios hostiles	41
3.3.5 Estabilidad en el paso por el estómago	41
3.3.6. Efecto de inhibición de microorganismos probióticos contra patógenos en humanos.....	41
3.3.7 Prueba de sensibilidad de las cepas a los antibióticos	42
Capítulo 4.....	43
Resultados y discusión.....	43
4.1 Etapa I: Resultados del aislamiento y purificación de microorganismos probióticos provenientes de leche de cabra y sus derivados	43
4.1.1. Resultados del aislamiento y purificación de cepas.....	43
4.2. Etapa II: Resultados de caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de las cepas aisladas.....	45
4.2.1 Selección e identificación de cepas aisladas	45
4.2.1.1 Resultado de la caracterización macroscópica de las cepas ensayadas.....	45
4.2.1.2 Resultado de la caracterización microscópica	46
4.2.1.3 Resultado de la prueba de catalasa	47
4.2.1.4 Resultado de la prueba bioquímica mediante el sistema API 20 A ...	48
4.3. Etapa III: Resultados del estudio in vitro del efecto probiótico de las cepas aisladas de leche de cabra y sus derivados.....	51
4.3.1 Resultado de la capacidad de crecimiento a diferentes pH´s	51
4.3.2. Resultado de crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas.....	51
4.3.3 Resultado de selección de microorganismos de coagulación de la leche	53
4.3.4. Resultado de crecimiento en medios hostiles.....	54
4.3.5 Resultados de las pruebas de estabilidad en el paso por el estómago ...	56
4.3.6. Resultado del efecto de inhibición de las cepas aisladas sobre microorganismos patógenos en humanos	58
4.3.7. Resultado de la prueba de sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos.....	60

Capítulo 5.....	63
Conclusión	63
Capítulo 6.....	65
Recomendación	65
Capítulo 7.....	66
Referencias bibliográficas	66
Capítulo 8.....	75
Anexos	75

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ejemplos de componentes funcionales	6
Cuadro 2. Efectos potenciales establecidos de las bacterias probióticas	11
Cuadro 3. Factores de estrés a los que están expuestas bacterias probióticas...	13
Cuadro 4. Ventajas que se atribuyen al consumo de alimentos prebióticos	14
Cuadro 5. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana ...	16
Cuadro 6. Bacterias ácido lácticas empleados como probióticos.....	19
Cuadro 7. Taxonomía de <i>Lactobacillus casei</i>	21
Cuadro 8: Características de diferenciación de los géneros de la familia <i>bifidobacteriaceae</i>	28
Cuadro 9. Técnicas empleadas para identificar las bifidobacterias a nivel de género, especie y cepa	29
Cuadro 10. Composición química de la leche de cabra	30
Cuadro 11. Composición química del caldo MRS	35
Cuadro 12. Composición química del agar MRS	36
Cuadro 13: Código de identificación de las cepas aisladas	44
Cuadro 14. Caracterización macroscópica de las cepas ensayadas	45
Cuadro 15. Prueba de catalasa de las cepas aisladas	47
Cuadro 16. Resultados de identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante el sistema API 20 A	49
Cuadro 17. Resistencia a pH's	51
Cuadro 18. Crecimiento a las diferentes temperaturas	52
Cuadro 19. Coagulación de la leche normal	53
Cuadro 20. Resistencia a medios hostiles	55
Cuadro 21. Estabilidad del estómago y resistencia a sales biliares	56
Cuadro 22. Comparación de medias de Tukey	58
Cuadro 23. Sensibilidad de cepas aisladas a diferentes concentraciones de antibióticos	61

Índice de figuras

Figura 1. Elaboración de jocoque por un método rústico	32
Figura 2. Identificación de las cepas ensayadas mediante el sistema API 20 A ...	39
Figura 3. Fotografías de los microorganismos de las cepas aisladas. A) LJF, B) LSR, C) JJFM2, D) SJF y E) JJFM1.....	46
Figura 4. Fotografía de los resultados de la prueba bioquímica API 20 A.....	50
Figura 5. Fotografía de coagulación de la leche a las 24 horas	54
Figura 6. Fotografías de la evidencia de la viabilidad de las cepas evaluadas	55
Figura 7. Resistencia del paso por el estómago con un pH de 2.5	57
Figura 8. Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas	59
Figura 9. Sensibilidad de los microorganismos patógenos sobre cepas aisladas	60
Figura 10. Resistencia de las cepas ensayadas a trimetoprim-sulfametoxazol	61

RESUMEN

El uso de microorganismos probióticos se ha incrementado debido a sus propiedades benéficas para la salud animal y humana. El presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar microorganismos probióticos encontrados en un nicho ecológico típico como la leche de cabra y sus derivados, para dicho estudio se recolectó una muestra de leche de cabra proveniente del Ejido San Rafael y muestra de leche de cabra, jocoque y suero, estas tres últimas muestras provenientes del Ejido Jagüey de Ferniza, todas las muestras que se utilizaron provenían de cabras de raza criolla, provenientes de ejidos ubicados en el municipio de Saltillo, Coahuila. Se lograron aislar y mantener 5 cepas, los cuales fueron 4 cocos y una cepa de bacilos Gram positivo, catalasa negativa. Las cepas LJF y SJF fueron identificadas a un 99.5 % mediante el sistema de identificación API 20-A, como *Bifidobacterium spp 2*, mientras que las cepas LSR, JJFM1 y JJFM2, fueron identificadas tentativamente como cepas de *Bifidobacterium spp 2*.

Los microorganismos seleccionados fueron capaces de promover la coagulación de la leche y resistencia a temperaturas de 40,50 y 60 °C, excepto la cepa JJFM2. Así mismo todas las cepas toleraron condiciones hostiles como pH 3 y 2.0 % de bilis. El análisis estadístico mediante sistema SAS demostró que las cepas probióticas inhibieron de la misma manera, puesto que no hubo diferencia significativa entre ellas. Por otra parte se demostró que el patógeno más sensible a cepas probióticas fue el *Staphylococcus aureus*. Se observó resistencia de las cepas probióticas a los antibióticos de bencilpenicilina, tetraciclina, y trimetroprim-sulfametoxazol. Todas las cepas fueron sensibles a 0.5 mg de ampicilina. Con estos resultados podemos decir que nuestras cepas podrían ser utilizadas para la elaboración de leche fermentada que tenga propiedades probióticas.

Palabras clave: Probióticos, aislamiento, leche de cabra y derivados.

Capítulo 1

1.1 Introducción

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos que, además de valor nutritivo, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en la ciencia de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales, entre los que se encuentran los alimentos con probióticos.

Actualmente, la leche de cabra ha sido objeto de diversos estudios, los mismos que han demostrado una serie de ventajas en la alimentación, con respecto a la leche de otras especies, como por ejemplo la leche bovina. El conocimiento de los diversos aspectos del estudio de los probióticos y sus beneficios es esencial para estudiarlas en otras materias primas como en leche de cabra y sus derivados debido a que en los últimos años la búsqueda de BAL probióticas se ha dirigido hacia los alimentos fermentados característicos de cada región.

El Suero de Leche de Cabra, es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria. En México alrededor del 10% de la producción de suero, es empleado para transformarlo en productos de valor agregado. Por lo que, es importante que la industria láctea, cuente con diferentes opciones para emplear el Suero de Leche de Cabra como base de alimentos para consumo humano, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar, el valor monetario del mismo (Lomas y Rojas, 2005).

El jocoque es una leche ácida, coagulada, de consistencia muy suave y textura homogénea es que se experimenta una fermentación láctica por las bacterias encontrados en la leche de cabra. Este producto generalmente se elabora con leche cruda (bronca) en diversos lugares del país, así como en poblaciones de zonas áridas como Coahuila.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas a partir de leche de cabra y sus derivados, mediante pruebas microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas.

2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- ✓ Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados y seleccionar los que sobrevivan en medios hostiles para implementar un banco de microorganismo probióticos con potencial de uso industrial (agrícola, alimentario, acuícola y medicinal).

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar los microorganismos de leche de cabra y sus derivados.
- ✓ Identificar a los microorganismos microscópica, macroscópicamente y métodos bioquímicos.
- ✓ Evaluar la capacidad de las cepas aisladas a la coagulación de la leche.
- ✓ Evaluar la sensibilidad de las cepas aisladas a diferentes temperaturas, pH ácido, medios hostiles, paso por el estomago y antibióticos.
- ✓ Evaluar el efecto de inhibición de microorganismos patógenos por las cepas probióticas seleccionadas.

1.3 Hipótesis

Es posible aislar microorganismos probióticos a partir de la leche de cabra y sus derivados proveniente de cabras criollas de la Región Sureste del Estado de Coahuila.

1.4 Justificación

Las exigencias del mercado y el desarrollo de nuevos productos probióticos obligan a la búsqueda de nuevas cepas con propiedades probióticas que cumplan con los criterios establecidos por la FAO-OMS, 2002. Un probiótico es un suplemento dietético microbiano (principalmente localizado en leches fermentadas y productos lácteos) que consumido en ciertas cantidades es capaz de ejercer beneficios sobre la salud, que van más allá de la nutrición básica.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad actuales, un gran aporte a la industria nacional, sería la producción de los probióticos a partir de la leche de cabra, así como también el aprovechamiento del subproducto de leche de cabra, con la finalidad de ampliar sus aplicaciones a otros alimentos, ya sea para consumo humano o animal, con la correspondiente reducción de costos de la materia prima.

En el estado de Coahuila se tienen sustratos que pueden ser una fuente potencial de bacterias lácticas con actividades probióticas, por lo cual es necesario realizar investigaciones que contribuyan a incrementar los conocimientos científicos en esta área a fin de obtener bacterias ácido-lácticas con propiedades probióticas que puedan ser empleados con la finalidad de disminuir el número de enfermedades gastrointestinales y mejorar su respuesta inmune.

Debido a lo anterior, la presente investigación se realiza con el fin de buscar nuevas fuentes para el aislar microorganismos probióticos, debido que en la actualidad estos microorganismos son muy demandados en la industria alimentaria.

Capítulo 2

Revisión de literatura

2.1 Alimentos funcionales

El concepto clásico de nutrición adecuada aporta los nutrientes suficientes para satisfacer las necesidades orgánicas, tiende a ser sustituido por el de nutrición óptima, que incluye además la potencialidad de los alimentos para promover la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades, según la editorial de el mes de enero de la Revista del Consumidor en España (Consumer, 2002).

Al iniciarse el nuevo milenio una nueva área dentro de la ciencia de los alimentos y de la nutrición se ha hecho presente con cada vez mayor intensidad, el área de los alimentos funcionales, que se definen como cualquier alimento al que se le ha añadido o que se le han eliminado uno varios ingredientes; o cuya biodisponibilidad de nutrientes se ha modificado con la particularidad de que algunos de sus componentes (sea o no nutriente) afecte a funciones vitales del organismo de manera específica y positiva (Fuller, 1994).

Los alimentos funcionales son una parte importante del bienestar en el que se incluye una dieta equilibrada y actividad física. Se debería de consumir una amplia variedad de estos alimentos que incluyan algunos de los siguientes componentes: caratenoides, fibra dietética, ácidos grasos, flavonoides, isotiacianatos, fenoles, estanoles, polioles, probióticos, prebióticos, fitoestrógenos y proteína de soya (IFEC, 2004).

Los alimentos funcionales pueden ser diseñados añadiendo componentes funcionales para dirigir una acción benéfica en particular, en el cuadro 1 se muestra algunos ejemplos de componentes funcionales usados en la alimentación.

Cuadro 1. Ejemplos de componentes funcionales

Componentes	Fuente	Beneficio potencial
Carotenoides	Acelga, espinaca, maíz, huevos, cítricos	Neutraliza la acción de los radicales libres que pueden dañar las células, fortalece las defensas antioxidantes de las células.
Fibra dietética	Salvado de avena, avena enrollada, harina de avena.	Puede reducir el riesgo de padecer enfermedades coronarias, puede contribuir al mantenimiento de la salud del tracto digestivo.
Ácidos grasos poliinsaturados –Omega-3	Avellanas, linaza	Puede contribuir al mantenimiento de las funciones mentales y visuales.
Flavonoides	Moras, cerezas y uvas rojas, té cacao, chocolate, manzanas, alimentos cítricos.	Fortalece las defensas antioxidantes de las células, puede contribuir al mantenimiento de la función cerebral
Probióticos	Yogurt, otros productos lácteos y no lácteos.	Puede mejorar la salud gastrointestinal, puede mejorar la absorción del calcio, puede mejorar la salud gastrointestinal y la inmunidad sistémica.
Proteína de soya	Frijol de soya y alimentos a base de soya.	Pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Fuente: Council (IFEC), 2004

La idea de los alimentos funcionales fue desarrollada en Japón durante la década de los 80's. Según Vasconcelos en el 2002, clasificó a los “alimentos funcionales” en tres categorías:

1. Alimentos a base de ingredientes naturales
2. Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.
3. Alimentos que al consumirse cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano incluyendo: Mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica, Prevención o recuperación de alguna enfermedad específica, Control de las condiciones físicas y mentales, Retardo en el proceso de envejecimiento.

Los componentes de los alimentos enriquecidos se hallan también en los alimentos convencionales, por lo que una persona que sigue una dieta equilibrada y mantiene hábitos de vida saludable no necesita consumir alimentos funcionales, ya que ingieren todos los nutrientes que su organismo necesita.

Existe la creencia de que los alimentos funcionales curan enfermedades, sin embargo la propiedad funcional está relacionada con el papel metabólico estructural o fisiológico sobre el crecimiento, desarrollo, mantenimiento y otras funciones normales del organismo; y no con la capacidad de tratar una patología. Los alimentos funcionales pueden prevenir pero no curar, según la editorial de el mes de enero de la Revista del Consumidor en España (Consumer, 2002).

2.2 Probióticos

2.2.1 Definición

El término “probiótico”, derivado de *bíos*, palabra griega que significa “vida”, nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la flora intestinal.

El término probiótico fue usado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell, para describir a aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otras, en contraposición al término antibiótico.

Fuller (1991) acotó más este concepto y redefinió a los probióticos como aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma benéfica al desarrollo de la flora microbiana del intestino.

Saavedra (1994) propuso una definición más general, señalando a los probióticos como microorganismos viables que, ingeridos con la alimentación, pueden tener un efecto positivo en la prevención o en el tratamiento de estados patológicos específicos.

Salminen y col., (1999) definió los probióticos como preparaciones de células microbianas o componentes de células que tiene un efecto benéfico sobre la salud de quien los ingiere.

Heller y col., 2001, los definen como microorganismos que debe ser capaz de sobrevivir a la flora intestinal, ha de permanecer viable durante su almacenamiento en refrigeración, y tener capacidad de adherirse a la superficie mucosa.

Los probióticos afectan a la composición de la flora intestinal y son capaces de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud (Mattila-Sandholm y col., 2000). Algunos de estos beneficios son los siguientes:

2.2.2 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos

Otros estudios epidemiológicos recientes aportan evidencias de que el consumo probiótico tienen actividades benéficas en la salud humana, pueden reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Nagendra, 2001).

Propiedades Anti carcinogénicas. Las bacterias ácido lácticas y los productos fermentados hechos de las mismas, tienen una actividad potencial anticarcinogénica ya que 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, (Nagendra, 2001).

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 Santos, 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 (Heller y col., 2001).

Reducción del Colesterol: Estudios recientes 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 (Homma, 1998 citado por Shah, 2001).

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 Santos, 2002).

Estimulación del sistema inmunológico: Se ha observado inmunomodulación por *L. acidophilus* y *Bifidobacterias*, pero el mecanismo no es claramente entendido (Shah, 2001). Se ha reportado que ingiriendo los probióticos del yogurt, se estimula la producción de citosina en células sanguíneas y aumento en la actividad de macrófagos (Shah, 2001).

Mejoramiento del valor nutricional de un alimento: Los efectos nutricionales de probióticos han sido muy estudiados en las leches fermentadas con *Lactobacilos* y *Bifidobacterium*, estos productos tienen un menor contenido de lactosa y un alto contenido de aminoácidos libres y ciertas vitaminas, (O'Sullivan y col, 1992). Los efectos benéficos que un determinado microorganismo probiótico puede provocar en el huésped se presentan en el cuadro 2 con una posible explicación de su mecanismo de acción.

Cuadro 2. Efectos potenciales establecidos 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 Huis in't Veld, 1999.

Los criterios que deben cumplir los probióticos para poder ser usados en humanos son: deben ser de origen humano para que tengan el potencial de colonizar la vía y ser capaz de sobrevivir; viables y resistentes; estables en presencia de ácido y bilis; capaces de adherirse a la mucosa intestinal y producir componentes antimicrobianos así como el de poseer beneficios clínicamente y ser seguros (Heller y col, 2001).

2.2.3 Criterios para desarrollar un producto probiótico

Se requieren diversas propiedades básica para una actividad probiótica efectiva de bacterias ácido lácticas, entre las propiedades mas importantes esta la habilidad de sobrevivir el paso a través de la boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso y la posibilidad de colonizar el intestino (Schmidl y Labuza, 2000). Para mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos considerando los siguientes factores:

Viabilidad. Para promover beneficios en la salud, las bacterias probióticas deben ser viables y disponibles en altas concentraciones, típicamente 10^5 y 10^6 ufc/g de producto. Hay muchos factores que se consideran como responsables de la pérdida de viabilidad de los microorganismos probióticos: la acidez de los productos, la producción de ácido durante el almacenamiento, el nivel de oxígeno en los productos, su sensibilidad a antimicrobianos, entre otros (Dave y Shah, 1997). Otro factor importante es la dosis, o la concentración de células vivas que deben ser proporcionadas. Las velocidades a las que mueren las bacterias probióticas son del 90-99 % de la concentración inicial por lo que se recomienda una ingesta de 1-10 billones de células vivas para asegurar que lleguen al tracto intestinal, por lo menos 100 millones (10^8) (Siuta-Cruce y Goulet, 2001).

Shah (2001) ha sugerido diversas estrategias para mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos considerando los siguientes factores:

Tolerancia al ácido y a la bilis: Los probióticos deben ser capaces de sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, así deben ser capaces de sobrevivir en las concentraciones biliares usualmente encontradas en el intestino.

Oposición a las bacterias. Además del ácido láctico y acético, los microorganismos probióticos producen otros ácidos como el ácido cítrico y el

hipúrico. Las bacterias ácido lácticas también producen peróxido de hidrógeno, diacetil y bacteriocinas como sustancias antimicrobianas.

Propiedades de adherencia. Es uno de los criterios más importantes en la selección de bacterias probióticas. Los efectos deseados de los microorganismos probióticos solo se producen cuando son capaces de adherirse, colonizar y multiplicarse en el intestino. Las velocidades a las que mueren las bacterias probióticas son del 90-99 % de la concentración inicial por lo que se recomienda una ingesta de 1-10 billones de células vivas para asegurar que lleguen al tracto intestinal, por lo menos 100 millones (10^8) (Siuta-Cruce y Goulet, 2001).

En el cuadro 3 se muestran los factores de estrés debido a los métodos encaminados a reforzar la supervivencia de los probióticos como la encapsulación de células vivas para aumentar su vida útil, incrementar la resistencia al calor y mejorar la resistencia a ácidos.

Cuadro 3. Factores de estrés a los que están expuestas bacterias probióticas

Durante su producción
Grandes concentraciones de los productos de la fermentación (ej. Ácido 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.

2.2.4 Prebióticos y simbióticos

Schmidl y Labuza, (2000) definen a los prebióticos como “ingredientes” de los alimentos, no digeribles que afectan benéficamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, que tienen el potencial para mejorar la salud del huésped”.

A pesar que las características moleculares de los prebióticos no se han definido todavía, solo los carbohidratos (oligosacáridos, fibra dietética, fructo-oligosacáridos y almidón) cumplen con lo establecido por esta definición.

Los simbióticos son productos que contienen pre y probióticos e implican sinergismo entre los dos, estimulando el crecimiento o actividad de bacterias intestinales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Schrezenmeir y de Vress, 2001). En el cuadro 4 se indican algunas de las ventajas que aportan beneficios adicionales para la salud el consumo de prebióticos.

Cuadro 4. 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.

2.3 Flora bacteriana del aparato digestivo

La microflora intestinal normalmente entre otras funciones ejerce un efecto protector en el huésped contra la colonización del tracto intestinal por microorganismos patógenos. El balance y la composición normal de la microflora intestinal puede ser afectada por enfermedades, uso de antibióticos, situaciones de “stress”, alimentación y otros (Suscovic y col., 1997).

La flora microbiana gastrointestinal está constituida por diversos grupos bacterianos, en general se pueden distinguir tres grupos:

Una flora dominante anaerobia estricta >90% (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*).

Una flora sub-dominante anaerobia facultativa <1% (*E.coli*, *Enterococcus*)

Una flora residual <0.01% (*Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomona*, *Candida*).

La flora dominante representa de 10^7 a 10^{11} células por gramo de contenido intestinal. Estos microorganismos se encuentran en diferentes lugares del intestino, así, unos están presentes en la flora intestinal y normalmente son expulsados con facilidad, otros se encuentran en el mucus, y finalmente están aquellos que se adhieren al epitelio intestinal y en consecuencia pueden colonizarlo (Suscovic y col., 1997).

No se conocen con precisión los diferentes tipos de microorganismos presentes en la microflora intestinal y consisten por lo menos de cuatrocientas especies diferentes, estos desarrollan el ecosistema y mantienen un equilibrio dinámico con cada uno de sus huéspedes, aparte de contribuir con las funciones digestivas del colon humano (Holdeman, 1976). El cuadro 5 muestra los microorganismos que se encuentran en la vía gastrointestinal humana.

Cuadro 5. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana

	Estómago	Yeyuno	Ileón	Materia fecal
Total de bacterias	1-10 ³	1-10 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				
Bacteroides	Raras	1-10 ²	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Bacterias bifidas	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).

El tracto gastrointestinal humano, el lugar de la digestión de los alimentos, se compone de estómago, intestino delgado e intestino grueso. El pH de los fluidos del estómago es bajo, aproximadamente 2. El estómago puede considerarse, por lo tanto como una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias en el tracto gastrointestinal. El intestino delgado está dividido en dos partes, el duodeno y el íleon. El primero adyacente al estómago, es ligeramente ácido.

Desde el duodeno al íleon, el pH se hace progresivamente menos ácido, el promedio del pH del intestino delgado se encuentran entre 4-5. El intestino grueso se considera como un recipiente de fermentación especializado, encontrándose su pH promedio en 7, (Prescott y col., 1999).

Si para controlar las bacterias en el tracto gastrointestinal la barrera primaria es el estómago con su alto contenido de ácido gástrico y con el pH del estómago, la segunda barrera importante la constituyen las sales biliares. Estas son producidas en el hígado como ácidos biliares y secretados en el intestino a través de la vesícula biliar. Entre otras funciones su papel es facilitar la emulsión de las grasas de la dieta para que puedan ser digeridas eficazmente. En la bilis encontramos que estas sales aparecen bajo la forma de conjugadas, en las que el ácido cólico se une a aminoácidos como la glicina o la taurina, formando ácido glicocólico o taurocólico, respectivamente, o desconjugadas como lo es el desoxicolato de sodio. Estas sales por sus propiedades detergentes también atacan a los microorganismos, afectando la estabilidad de la membrana de los mismos, pudiendo ocasionarles su destrucción (Prescott y col., 1999).

En los epitelios del organismo humano y desde el momento del nacimiento, se instalan ecosistemas microbianos que contribuyen con el huésped a mantener un estado de normalidad. La ruptura de este equilibrio por diversos factores exógenos dispone a la aparición de enfermedades (Perdigón, 1995).

2.4 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas son Gram positivas, normalmente inmóviles y no esporuladas, que dan lugar a ácido láctico como principal o único producto de su metabolismo fermentativo. No tienen porfirinas ni citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y por tanto, obtienen la energía solo por fosforilación a nivel de sustrato. Todas las bacterias ácido lácticas crecen anaeróbicamente. La mayoría de las bacterias ácido lácticas obtiene energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables; están por lo tanto restringidas a hábitats ricos en azúcares (Kandler y Weiss, 1986).

Basándose en sus propiedades fermentativas, a algunas se les conoce como homofermentativas, y utilizan la vía de Embden-Meyerhoff para la glucólisis, que convierten un mol de glucosa en dos de ácido láctico, y las heterofermentativas, utilizan la lactosa por la vía del 6-p-gluconato producen un mol de CO₂, un mol de etanol y/o ácido acético y un mol de ácido láctico (Kandler y Weiss, 1986). También existe otro grupo de heterofermentativos facultativos que tienen la facultad de fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. Mientras que las hexosas las metabolizan homolácticamente (Madigan y col., 1988).

Los probióticos son bacterias ácido lácticas, definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. La mayoría de los probióticos son bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces*. En el cuadro 6 se muestra los microorganismos que son considerados como probióticos.

Cuadro 6. Bacterias ácido lácticas empleados como probióticos

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<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>			
Otras especies			
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>E.faecium</i>	<i>B.subtilis</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>B.coagulans</i>		<i>Leuconostoc spp.</i>

Fuente: Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001.

De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Hassan y Frank, 2001). Las bifidobacterias son consideradas microorganismos probióticos por las propiedades beneficiosas demostradas por muchos estudios científicos, están siendo empleadas ampliamente para la elaboración de leches fermentadas y otros productos lácteos (Collado, 2004).

2.4.1 Género *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 (Foo y col., 1993). Normalmente resisten mejor las condiciones de acidez que las demás bacterias ácido lácticas; pueden crecer bien a valores de pH alrededor de 4-5. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales. Estos microorganismos casi nunca son patógenos (Chacón y López, 2000). Respecto a su ecología y hábitat, los crece en condiciones anaeróbicas, la temperatura mas favorable es la de un mesófilo. Sin embargo, se conocen cepas como *L. viridicens* y *L. plantarum* que son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración aunque se muy lento (Klander y Weiss, 1986).

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS este medio contiene además, magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. 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, descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960. Hay que tener en cuenta, que estos medios de cultivo no son totalmente selectivos, ya que pueden soportar el crecimiento de *Pediococos*, *Enterococos* y *Bifidobacterias* e incluso algunas levaduras (DIFCO., 1978). Por ello se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo.

2.4.1.1 *Lactobacillus casei* como probiótico

L. casei son bacterias Gram positivas con forma de bastón. Difiere de otros Lactobacilos en muchos aspectos. Su tamaño es más pequeño en comparación con *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. helveticus*. Son mesófilos heterofermentadores facultativos. Pueden fermentar una mayor variedad de carbohidratos en comparación con la mayoría de Lactobacilos encontrados en las leches fermentadas. Las cepas de *L. casei* se encuentran de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, así como en el intestino, la boca del ser humano y el ambiente. El nombre de *L. casei* se usó por primera vez en 1919 y se relaciona con queso: *casei* y *caseína* (proteína de la leche) proviene de la palabra *caseus* que significa queso (Danone World Newsletter 7). En el cuadro 7 se muestran las diversas subespecies de *L. casei*.

Cuadro 7. Taxonomía de *Lactobacillus casei*

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

Fuente: DANONE World Newsletter 7.

2.4.2 Género *Streptococcus*

Existen más de 66 especies, 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 *Lb. casei*; *Lb. 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. 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" por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987).

El medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17 que fue desarrollado por Teragazhi y Sandine en 1975, pero posteriormente Shankar y Davies (1977) demostraron su eficacia del medio para el aislamiento selectivo de *Streptococcus thermophilus*, que se debe a la combinación de un fuerte efecto tampón, que facilita el desarrollo de los estreptococos.

2.4.3 Género *Bifidobacterium*

2.4.3.1 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 ed. Manual Bergey's. Actualmente la familia *Bifidobacteriaceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*.

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*, (Taranto y Medicini, 2005).

2.4.3.2 Características culturales y morfológicas

Son bacilos de variada morfología, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no son esporulados y se tiñen irregularmente con azul de metileno. Son anaerobios estrictos, sin embargo, el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (De Vries y Stouthamer, 1969). En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten bien a temperaturas mayores de 46°C. Por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* muere a 60°C, (Rasic y Kurmann, 1983). El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6.5-7 y a pH menores o iguales el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. No existe crecimiento a pH menor de 4.0 o mayor de 8.0 (Scardovi, 1986). La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero Scardovi (1986) distinguió dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género.

2.4.3.3 Características fisiológicas

Sus exigencias nutritivas y la necesidad de una anaerobiosis estricta hacen que el cultivo de las *Bifidobacterias* sea complicado, por ello en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo para la detección y crecimiento. Además las *Bifidobacterias* también han sido encontradas en aguas fecales e incluso han llegado a multiplicarse en ellas, por ello, se pueden emplear como indicador de contaminación fecal de las aguas (Nebra y col., 2003; Bonjoch y col., 2004).

Las *Bifidobacterias* son anaerobias estrictas pero la sensibilidad al oxígeno varía entre especies (De Vries y Stouthamer, 1969). Las *Bifidobacterias* excepto algunas especies de origen animal, son capaces de utilizar como única fuente de nitrógeno, las sales de amonio (Scardovi, 1986). Cuando crecen en ausencia de una fuente de nitrógeno orgánica, segregan grandes cantidades de aminoácidos tales como treonina, alanina, valina y ácido aspártico.

En cuanto a los medios de cultivo se distinguen dos tipos para el aislamiento, cultivo y caracterización de las *Bifidobacterias*: medios no selectivos y medios selectivos.

Medios no selectivos: Estos medios suelen estar constituidos por diversas sustancias tales como extracto de carne, peptonas, extracto de levadura, zumo de tomate, sangre de caballo y leche, que permiten el crecimiento de muchas especies de *Bifidobacterias*. Estos medios pueden ser adicionados con sustancias con bajo potencial redox, como puede ser la cisteína, cistina, ácido ascórbico, sulfato de sodio, etc. Existe un amplio abanico de medios de cultivo, desarrollados en su

mayoría en estos últimos años. Destacar el medio TPY (Triptona, Peptona y extracto de levadura), fue descrito inicialmente por Scardovi (1986), como el más adecuado para el aislamiento y cultivo de las *Bifidobacterias* de cualquiera que fuese su origen, ya que todas crecen bien en él. Sin embargo, su riqueza y su falta de selectividad hacen que también aparezcan profusamente *Lactobacillus*, *Streptococos* y otras bacterias afines.

Para conseguir un medio más selectivo, Samona y Robinson (1991) propusieron la adición de mezclas inhibitoras como 3 g/L de cloruro de litio con 0,1 g/L de sulfato de neomicina y con 15 mg/L de ácido nalidíxico, que se añaden al medio en forma de solución, esterilizada por filtración.

Medios Selectivos: Los requerimientos físicos de las *Bifidobacterias* son extremadamente variados, es difícil definir un medio selectivo apropiado para todas las especies. El reciente entusiasmo de la incorporación de las *Bifidobacterias* a los productos lácteos fermentados ha favorecido la propuesta de medios selectivos para diferenciar el género *Bifidobacterium* de otros géneros que están relacionados con los productos lácteos y además para aislar las *Bifidobacterias* del resto de flora intestinal. Inicialmente el ácido ascórbico y el sodio son empleados como sustancias selectivas.

Matteuzzi y col., en 1983 sugirió la adición de 80 µg de kanamicina/mL. Sonoike y col., en 1986 emplearon el principio de que las *Bifidobacterias* son capaces de metabolizar carbohidratos tales como los fructo-oligosacáridos.

2.4.3.4 Características bioquímicas

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 propiónicos. 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. En donde las hexosas son degradadas exclusivamente y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato descrita por Scardovi y Trovatelli (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 Stouthamer, 1967).

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. En el cuadro 8 nos indica las principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium*, *Parascardovia* y *Scardovia* pertenecientes *Bifidobacteriaceae*.

Cuadro 8: Características de diferenciación de los géneros de la familia *bifidobacteriaceae*

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pariscardovia</i>	<i>Scardovia</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).

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 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, 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). En el cuadro 9 se muestran las técnicas que se emplean para identificar las bifidobacterias a nivel género, especie y cepa.

Cuadro 9. Técnicas empleadas para identificar las *Bifidobacterias* a nivel de género, especie y cepa

Identificación a nivel género
Test de la Fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa
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

Fuente: Theunissen y col., 2005.

2.5. Leche de cabra

2.5.1 Generalidades

La leche es un líquido blanco, opaco, dos veces más viscosa que el agua, de sabor azucarado y de olor poco acentuado, (Veysseyre R., 2000). La leche de cabra posee unas características peculiares que la diferencian de la leche de vaca y la convierten en un alimento de los denominados funcionales. Posee mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta y larga y glóbulos de grasa de tamaño menor, el organismo. También posee un mayor contenido de minerales Fe, Mg, Cu, Mn y Se. Otro aspecto beneficios que posee es la cantidad y naturaleza de sus oligosacáridos. Estos compuestos llegan al intestino grueso sin digerir y actúan como prebióticos, ayudan al desarrollo de una flora probiótica que compite con la flora bacteriana patógena, eliminándola, (Grappin, 1981). En la composición química de la leche de cabra puede haber variaciones significativas en alguno de los componentes debidos a la raza, período del año y la alimentación de las cabras. En el (cuadro 10) se da a conocer la composición química de la leche de cabra.

Cuadro 10. Composición química de la leche de cabra

Sólidos Totales (%)	Materia Grasa (%)	Proteína Total (%)	Caseína (%)	Lactosa (%)	Cenizas (%)
13.0	4.3	3.6	2.9	4.3	0.8

Fuente: Grappin, 1981.

Los microorganismos probióticos aislados e identificados en la leche de cabra fermentada naturalmente han sido las siguientes: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. coryniformis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, y *Aerococcus urinaeequi*, (Zhang, 2008).

2.6 Suero de leche de cabra

2.6.1 Generalidades

Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca (Hassan y Frank, 2001).

El suero de leche de cabra, es un subproducto lácteo, líquido resultante de la coagulación de la leche de cabra durante la elaboración del queso. Contiene por lo menos el 50 % en peso de los nutrimentos de la leche, no emplearlo como alimento, es un enorme desperdicio de nutrimentos; constituye aproximadamente el 90 % del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus componentes solubles en agua: carbohidratos hidrosolubles y proteínas solubles, (Lomas y Rojas, 2005).

Las prácticas industriales y ecológicas requieren que el suero se utilice para propósitos constructivos, ya que el grado de contaminación que genera verterlo al drenaje es muy alto. Desde hace mucho tiempo se ha alimentado con suero a los cerdos y a otros animales de granja. Aunque esto en pequeños volúmenes, actualmente se tienen interés por incorporarlo directamente a la dieta humana, (Lomas y Rojas, 2005).

2.7 Jocoque

2.7.1 Generalidades

La Secretaría de Salud, 1989, define al jocoque, al producto obtenido por tratamiento con gérmenes lácticos de la leche pasteurizada, fresca, limpia y sana, semidescremada o descremada. En la figura 1 se muestra el método artesanal para elaboración de jocoque.

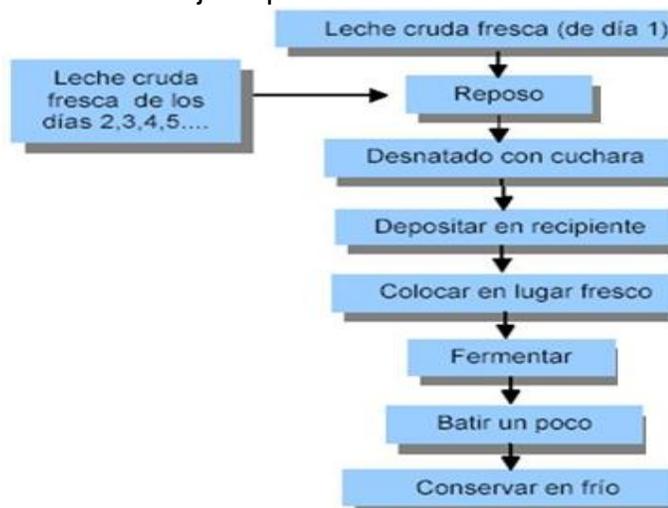


Figura 1. Elaboración de jocoque por un método rústico

La microflora responsable de la fermentación de la leche o de la nata crudas está constituida por bacterias ácido lácticas, entre las que destacarían seguramente las siguientes especies: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis ssp. Cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, (*Leuc. mesenteroides ssp. dextranicum*) *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), (Jouzier-Maurel, 1986).

Capítulo 3

Materiales y métodos

El desarrollo de este proyecto se realizó en el laboratorio de la empresa mexicana GBS Global S.A. de C.V., en conjunto con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y de la Facultad de Ciencias Químicas. Todos estos están ubicados en la Ciudad de Saltillo Coahuila, México.

Para la realización de este estudio se dividió en tres etapas:

3.1 Etapa I: Aislamiento y purificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados

3.1.1 Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de leche de cabra y sus derivados que se emplearon para este ensayo son de razas criollas y son las siguientes: a) leche de cabra, proveniente del Ejido San Rafael, b) leche de cabra, c) suero y d) jocoque, provenientes del Ejido Jagüey de Ferniza, ambos Ejidos se encuentran localizados en el municipio de Saltillo, Coahuila.

La leche fresca ordeñada de las cabras, se mantuvo en refrigeración hasta el momento del análisis (no más de dos días). El suero de queso se obtuvo del líquido residual del proceso artesanal de elaboración de queso de cabra en los ejidos y se mantuvo a temperatura ambiente y el jocoque fue elaborado, de manera tradicional en los ejidos y se mantuvo a temperatura ambiente, del líquido sobrenadante se tomaron las muestras para el aislamiento. Se midió el pH inicial antes de inocular las muestras en caldo MRS.

3.1.2 Aislamiento y purificación de cepas probióticas

En esta primera etapa las cepas fueron aisladas en caldo MRS en donde se inoculó 1 ml de cada a 37 °C, durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Trascurrido el tiempo se preparó agar MRS con el fin de aislar las cepas, para esto se inoculó 0.1 mL en placas de petri con agar MRS y fueron incubadas a 37°C durante 24 hrs en condiciones de anaerobiosis.

Se seleccionaron 2 colonias de cada muestra del agar MRS y se propagaron dos veces más para asegurar la pureza del cultivo. Posteriormente se tomó una colonia de cada muestra y se inoculó en cajas petri con agar MRS de forma de estría por agotamiento con la finalidad de obtener colonias aisladas y posteriormente realizar la tinción de Gram.

3.1.3 Medios y condiciones de cultivo

3.1.3.1 Adaptación de reactores para crear condiciones de anaerobiosis

Para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos probióticos se emplearon reactores de vidrio de 275 mL y de 3 L (anexo A). Con el fin de crear condiciones de anaerobiosis el cual se le introdujo nitrógeno para poder desplazar el oxígeno, el tiempo de inyección de nitrógeno dependió del tamaño de los reactores utilizados.

3.1.3.2 Cultivo en medio líquido

Todos los microorganismos aislados en este estudio fueron cultivados en caldo y agar MRS cuya composición por litro se presenta en el cuadro 11.

Cuadro 11. Composición química del caldo MRS

Composición (gr/L)	
Proteosa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2

El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 51 g en 1 L de agua destilada y añadió 1 mL de Tween 80. Posteriormente se esterilizó en Autoclave (AESAs) a 121 ° C durante 15 min.

3.1.3.3 Cultivo en medio sólido

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de *Lactobacilos*. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. (Man, Rogosa y Sharpe 1960). En el cuadro 12 se muestra la composición química del medio sólido MRS.

Cuadro 12. Composición química del agar MRS

Composición (gr/L)	
Proteosa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2
Agar	13

El medio de cultivo se realizó de la siguiente manera: Se disolvió 51 gramos de agar MRS (Fluka) en 1 L de agua destilada, se le añadió 1 mL de Tween 80, se calentó con agitación frecuente de 1 a 2 minutos hasta disolución, por último esterilizó en autoclave (AESA) a 121 ° C durante 15 minutos.

3.2.- Etapa II. Caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de las cepas aisladas

3.2.1 Selección de las cepas probióticas

Las cepas aisladas se purificó por estría continúa para la selección 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. Las bacterias que presentaron la morfología microscópica y metabolismo bioquímico de microorganismos probióticos se sometieron a liofilización.

3.2.1.1 Caracterización macroscópica

Las cepas aisladas por medio de siembras mediante la técnica de estriado por agotamiento en placas de Agar MRS, se hicieron observaciones macroscópicas a las colonias resultantes tomando en cuenta el olor, color, forma, borde, elevación, etc.

3.2.1.2 Caracterización microscópica

A las cepas aisladas se les hicieron tinción de Gram para observar las características de cada microorganismo. Para esto se realizó la técnica de Gram.

Esta técnica se utilizó para caracterizar bacterias Gram positivas y negativas. La tinción de Gram es la más importante de las tinciones diferenciales, las diferencias en la estructura de la pared son los responsables de este comportamiento. Debido a que el complejo de color formado con la pared de las bacterias Gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol-acetona permaneciendo de color azul violeta, mientras que las bacterias

Gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la safranina, quedando de color rojo. La metodología se presenta en el Anexo B (Merck, 2005).

3.2.1.3 Prueba de la catalasa

Esta prueba bioquímica se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final de del metabolismo aerobio de los azúcares. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis en refrigeración. La metodología se presenta en el Anexo C (Fung, 1997). El desprendimiento de burbujas se consideró una prueba positiva.

3.3.1.4 Identificación bioquímica mediante el sistema API 20 A

Para identificar a las bacterias aisladas se emplearon kits comerciales del sistema API 20 A siguiendo las instrucciones del fabricante. La galería API 20 A incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. En la figura 2 se muestra la realización de la prueba bioquímica mediante el sistema API 20 A.



Figura 2. Identificación de las cepas ensayadas mediante el sistema API 20 A

Se aislaron las diferentes colonias encontradas empleando la técnica de estriado y se mantuvieron incubadas por 24 horas., para su montaje con el sistema API, el cual requiere cultivos frescos de 24 a 48 horas., se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomó la colonia ya aislada hasta observar turbidez, posteriormente se colocaron en la placa la cual contiene diferentes sustratos en su mayoría CHO (anexo D)

Una vez montados los sistemas API se incubaron dentro de la cámara de anaerobiosis por 24 horas. Próximo a las 24 horas de la incubación de los sistemas API 20 A se revelaron con las pruebas bioquímicas y con ayuda del software se hicieron las lecturas de los microorganismos encontrados. Por último se sometió a incubación durante 24 y 48 horas a 37 ° C para determinar el perfil bioquímico fue necesario utilizar cámara anaerobia (NUAIRE). Por último se identificó el perfil de cada una de las cepas ensayadas (anexo E).

3.3. Etapa III: Estudio del efecto probiótico *in vitro* de las cepas aisladas de leche de cabra y sus derivados.

3.3.1. Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH's

Las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS. Posteriormente de cada cultivo se inocularon 0.1 mL de un cultivo de 24 horas en 20 mL de caldo MRS a pH's de 3, 4 y 6 utilizando HCl 2.2 N para ajustar. La resistencia a las diferentes condiciones se midió a las 24 horas de incubación a 37 °C, en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se realizó la re-siembra en placas con Agar MRS.

3.3.2. Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas

Para realizar esta prueba se preparó caldo MRS, el cual contenía 20 mL en cada uno de los reactores, se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, posteriormente se inoculó 0.1 mL de cepas de 24 horas. Por último se incubaron a 40, 50 y 60 °C durante 24 horas en anaerobiosis, el crecimiento se determinó cultivando en placas con Agar MRS.

3.3.3. Capacidad de coagulación de la leche

Para la selección de los microorganismos con capacidad de coagulación de la leche, se compró leche comercial y se esterilizó en auto clave, se tomaron 10 mL de leche estéril, a pH normal de 6.5, fueron inoculados con 1 mL de cada una de las cepas ensayadas, provenientes de un cultivo de 24 horas a 37 °C se incubaron a la misma temperatura monitoreando cada 24 horas hasta por 3 días. Se observaron la formación o no de un coagulo uniforme.

3.3.4. Crecimiento en medios hostiles

Para ello las cepas aisladas se cultivaron en caldo MRS acidificando hasta pH 3 utilizando HCl a 2.2 N. También se hicieron pruebas en caldo verde brillante bilis de buey al 2%. Todos los ensayos se realizaron a 37 °C, sin agitación durante 24 horas, el crecimiento se siguió por incremento de la turbidez y/o sembrando en placas con agar MRS para determinar la viabilidad de las cepas evaluadas.

3.3.5 Estabilidad en el paso por el estómago

El pH del estómago humano es de 2.5 y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos. Para evaluar la capacidad de los microorganismos aislados de las muestras ensayadas a sobrevivir en este medio se ajustó a pH de 2.5 utilizando HCl de 2.2 N. sometiendo la cepa aislada a esta acidez durante 24 horas. El resultado de esta prueba se determinó por el incremento de turbidez del medio de bilis de Buey al 2 % ácido.

3.3.6. Efecto de inhibición de microorganismos probióticos contra patógenos en humanos

Los microorganismos de prueba utilizados en el presente estudio fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella spp.* Para la realización de esta prueba se cultivaron cada una de las cepas ensayadas en caldo MRS estéril, sin agitación durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Las bacterias patógenas se sembraron en agar Nutritivo en forma entrecruzada, con la finalidad de obtener crecimiento en toda la caja. La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión en agar utilizando discos impregnados con las cepas aisladas en las cajas inoculadas con los

microorganismos patógenos, por último se incubaron en condiciones de aerobiosis entre 24 y 48 horas.

3.3.7 Prueba de sensibilidad de las cepas a los antibióticos

Para esta prueba se emplearon 4 antibióticos para poder probar la susceptibilidad de las cepas ensayadas. Las concentraciones normales que se probaron de los antibióticos fueron 500 mg de ampicilina, 250 mg/mL de tetraciclina, 600000UI/mL de bencilpenicilina y 160/800 mg de trimetoprim-sulfametoxazol, respectivamente. Para ello se sembró cada una de las cepas seleccionadas en caldo MRS sin agitación a 37 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se sembraron 0.1 mL del cultivo de caldo MRS a placas con Agar MRS. Los antibióticos estuvieron en discos de papel filtro de 10 mm de diámetro, estos discos se colocaron con una pinza estéril sobre las placas inoculadas con las cepas aisladas. De acuerdo a los resultados en dosis normales de antibióticos se realizaron diluciones seriadas, cultivadas en agar MRS.

Capítulo 4

Resultados y discusión

Los resultados de la investigación se muestran de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 3, además se presentan conforme a las etapas de investigación.

4.1 Etapa I: Resultados del aislamiento y purificación de microorganismos probióticos provenientes de leche de cabra y sus derivados

4.1.1 Resultados del aislamiento y purificación de cepas

Las cepas fueron aisladas en caldo MRS a partir de leche, suero y jocoque incubada a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. El ph inicial de las muestras fue de 4-4.5.

En esta primera etapa se realizó la selección e identificación de cepas mediante resiembras en placas conteniendo agar MRS por el método de estría por agotamiento (Martín y Escudero 2010), para lograr la purificación de las cepas aisladas de muestras de leche de cabra y sus derivados, en donde inicialmente se aislaron 8 colonias. Luego de observaciones al microscopio se hizo una preselección descartándose 3 colonias Gram negativas conservándose 1 cepa de bacilo y 4 cocos. Ambos presentaron morfología Gram Positiva, los reportes de la literatura indican que las cepas probióticas son Gram positivas, Suarez y col, (2008).

Cuadro 13: Código de identificación de las cepas aisladas

Tipo de muestra	Procedencia	Código
Leche	San Rafael	LSR
Leche	Jagüey de Ferniza	LJF
Suero	Jagüey de Ferniza	SJF
Jocoque	Jagüey de Ferniza	JJFM1 y JJFM2

4.2. Etapa II: Resultados de caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de las cepas aisladas

4.2.1 Selección e identificación de cepas aisladas

La inoculación de las muestras en las placas de agar MRS produjo abundante crecimiento microbiano. Las cepas previamente aisladas en la etapa I presentaron morfología Gram positiva.

Se sometieron nuevamente a una caracterización microscópica y macroscópica, para conocer su morfología colonial e individual, además evidenciar su potencial el uso de diferentes sustratos a través de la aplicación de pruebas bioquímicas.

4.2.1.1 Resultado de la caracterización macroscópica de las cepas ensayadas

Para la descripción macroscópica de las colonias cultivadas en placas MRS, se determinó mediante los criterios siguientes, colonias de 1-1.5 mm se consideraron como colonias chicas, 1-2 mm colonias medianas y de 2 mm o más se tomaron como colonias grandes. En el cuadro 14 se ilustran las diversas características de los microorganismos probióticos aislados en placas de agar MRS, incubados en anaerobiosis a 37 °C.

Cuadro 14. Caracterización macroscópica de las cepas ensayadas

Muestras	Tamaño	Forma	Borde	Elevación	Olor
LSR	Chicas	Circular	Redondo	Leche ácida	Blancas
LJF	Chicas	Circular	Redondo	Leche ácida	Blancas
JJM1	Chicas	Circular	Redondo	Leche ácida	Blancas
JJM2	Grandes	Circular	Redondo	Leche ácida	Blancas
SJF	Chicas	Circular	Redondo	Leche ácida	Blancas

En el cuadro anterior se puede observar que la mayoría de las cepas aisladas presentaron forma circular, borde redondo, color blanco y colonias chicas.

Scardovi (1986) distinguió dos tipos de colonias de *Bifidum*, algunas colonias muy lisas, convexas, blancas y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la observación macroscópica de las colonias no es una buena referencia para la identificación del género, las cuales las cepas fueron seleccionadas para su posterior identificación.

4.2.1.2 Resultado de la caracterización microscópica

Los microorganismos probióticos aislados en las diferentes muestras ensayadas se indican en la figura 3. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas en condiciones anaerobias, fueron examinadas mediante tinción Gram.

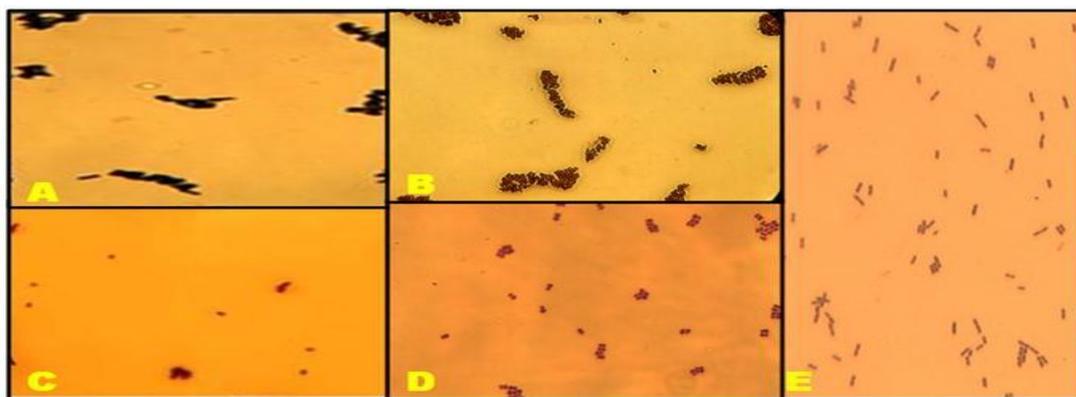


Figura 3. Fotografías de los microorganismos de las cepas aisladas. A) LJF, B) LSR, C) JJFM2, D) SJF y E) JJFM1

Los resultados de las observaciones de las cepas al microscopio usando la tinción de Gram, arrojaron los siguientes resultados. Para la cepa JJFM1 se muestra en la figura 3 con el subíndice E, se aprecia que de acuerdo a su morfología microscópica tiene la apariencia de bacilos largos y delgados,

separados uno de otro, de color púrpura definido, la literatura indica que la coloración presentada por estos microorganismos corresponde a los Gram positivos; en cuanto a las cepas LJF, LSR, JJFM2 y SJF (A,B,C y D) presentaron forma de cocos redondos. (De Vries y Stouthamer, 1969), aporta que en algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea, ya que la morfología de *Bifidobacterias* es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Suarez y colaboradores (2008), en dicho estudio emplearon bacterias ácido-lácticas obteniendo resultados que presentan características morfológicas de bacilos y cocos Gram positivas.

4.2.1.3 Resultado de la prueba de catalasa

Los resultados de la prueba de la catalasa se presentan en el cuadro 15, el cual todas las cepas aisladas resultaron catalasa negativa, lo que indica que las cepas no sintetizaron dicha enzima, según la literatura estas cepas podrían ser anaerobias estrictas (Scardovi en 1986), ya que no presentan esta enzima solo algunos microorganismos aerobios y anaeróbicos facultativos con citocromo presentan la presencia de la enzima catalasa ya que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generado durante la ruta de degradación de los azúcares.

Cuadro 15. Prueba de catalasa de las cepas aisladas

Cepas	Catalasa
LSR	-
LJF	-
SJF	-
LJJFM1	-
LJJFM2	-

(-): Negativa; (+): Positiva

En el cuadro anterior se muestra que todas las cepas de (LSR,LJF,SJF, JJFM1,JJFM2) resultaron negativa para la prueba de catalasa, similares resultados con las investigaciones de Juárez y Hernández en 2008, quienes trabajaron con bacterias ácido lácticas reportan el aislamiento de bacterias probióticas catalasa negativa. Esa prueba puede ser un indicativo sobre toxicidad de las cepas aisladas, ya que los anaerobios estrictos generalmente resultan ser microorganismos altamente tóxicos, como *Clostridium botulinum*, en el caso de los microorganismos probióticos resultan ser grado GRAS por sus siglas en ingles (Generally recognized As Safe) generalmente reconocidos como seguros, sin embargo, esta sola prueba aún no confirma que las cepas aisladas sean probióticas.

4.2.1.4 Resultado de la prueba bioquímica mediante el sistema API 20 A

Para realizar las pruebas bioquímicas mediante el sistema API 20 A bioMérieux®, se cultivaron cepas jóvenes de 24 horas, en donde se llevó a cabo la prueba de fermentación de 20 carbohidratos que posee la galería. En el cuadro 16 y figura 4 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas empleando las bases de datos del sistema API Web, los datos desplegados fueron los siguientes (cuadro 16): para las cepas SJF y LJF indicaron un 99.5 % de probabilidad para el género de *Bifidobacterium spp 2*, donde fue positiva la fermentación de la mayoría de los azúcares de las galerías; en la cepa LSR dió negativo en sacarosa, melecitosa y rafinosa, la cepa JJFM2 no fermentó el sorbitol y manosa, mientras que la cepa JJFM1 resultó negativo en glucosa, manitol, gelatina y glicerol, en esta última cepa los resultados de fermentación coincide con la literatura citada de Bifidobacterias por lo que reportan que los microorganismos de este género no fermentan el manitol, gelatina y manosa, estas cepas provocaron resultados tentativamente como *Bifidobacterium spp. 2*.

Cuadro 16. Resultados de identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante el sistema API 20 A

Cepas \ Carbohidratos	SJF	LJF	JJFM2	JJFM1	LSR
IND	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	+	-
GLU	+	+	+	-	+
MAN	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	-
MAL	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	-	+
ESC	+	+	+	+	+
GLY	+	+	+	-	+
CEL	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	-	+
MLZ	+	+	+	+	-
RAF	+	+	-	+	-
SOR	+	+	-	+	+
RHA	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+

(+): Si hubo fermentación; (-): No hubo fermentación



Figura 4. Fotografía de los resultados de la prueba bioquímica API 20 A

La relación tan cercana al género *Bifidobacterium spp.* 2 proporcionado por el sistema API 20 A indican con probabilidad alta que se trata de este género, para la identificación de la especie es necesario emplear pruebas más sensibles y estrictas.

Sin embargo en la literatura los autores (Collado, 2004 y Nigatu, 2000) reportan que la prueba API 20 A no es definitiva y depende de la interpretación de los diferentes tests, ya que al considerar una prueba como negativa y/o positiva provoca grandes variaciones en la identificación de los microorganismos ensayados y además estas diferencias posiblemente se deban a que la base de datos del método API no está actualizada con respecto a la taxonomía más reciente lo que conduce a una errónea identificación o a resultados confusos.

4.3. Etapa III: Resultados del estudio *in vitro* del efecto probiótico de las cepas aisladas de leche de cabra y sus derivados

4.3.1 Resultado de la capacidad de crecimiento a diferentes pH's

Para garantizar 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 (Fuller, 1992). Debido a los criterios que deben de cumplir las cepas aisladas para comprobar si son microorganismos probióticos, se realizó la prueba de sobrevivencia a los pH's ensayados ver (cuadro 17). Se observó que a los tres pH's hubo crecimiento en las cepas aisladas, por lo tanto esta prueba positiva indica que las cepas aisladas pueden sobrevivir al tracto gastrointestinal.

Cuadro 17. Resistencia a pH's

Cepas \ pH's	pH 3	pH 4	pH 5
LSR	+	+	+
LJF	+	+	+
SJF	+	+	+
JJFM1	+	+	+
JJFM2	+	+	+

(-): No hay crecimiento;(+): Hay crecimiento.

4.3.2. Resultado de crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas

Los microorganismos se clasifican de acuerdo a las temperaturas óptimas de crecimiento por lo que en este estudio es necesario identificar de acuerdo a la capacidad de crecimiento a temperaturas de 40 °C, 50 °C y 60 °C, (cuadro 18). Por

otra parte también se realizó con el fin de probar la viabilidad de las cepas sometidas a futuro en procesos de manufactura de alimentos. Los resultados obtenidos en el cuadro 18 muestran que la mayoría de las cepas aisladas son tolerantes a temperatura de 60 °C a excepción de la cepa JJFM1.

Cuadro 18. Crecimiento a las diferentes temperaturas

Temperatura Cepas	40 °C	50 °C	60 °C
LSR	+	+	+
LJF	+	+	+
SJF	+	+	+
LJJFM1	+	+	-
LJJFM2	+	+	+

(+): Hay crecimiento; (-): No hay crecimiento

Estos resultados concuerdan con los de León y col., (2006) que encontraron termoresistencia de bacterias ácido lácticas a temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C en tratamientos térmicos de salchichas comerciales. Por lo tanto el aislamiento de las cepas en leche de cabra y sus derivados posiblemente pueden ser utilizados en productos cocidos ya que también podría ser una alternativa para mejorar la vida de anaquel de productos comerciales. De este modo, las bacterias ácido lácticas aisladas tendrían un papel muy importante en la conservación de alimentos fermentados provocando cambios en olores, sabores y texturas, además de su mencionada acción preservativa.

Comparando los resultados de crecimiento de las cepas aisladas a diferentes temperaturas, no coinciden con lo que menciona (Collado y col, 2004) debido puesto que ellos menciona que en los productos pasteurizados después de

la fermentación no presentaron crecimiento después del período de incubación de las placas, también menciona que en este tipo de productos no poseen microorganismos viables. Es de gran relevancia esta característica detectada en las cepas aisladas en la presente investigación ya que esta capacidad representa una gran ventaja para el empleo de las cepas en procesos que involucren procesos de pasteurización suave y pueden mantenerse viables después de proceso.

4.3.3 Resultado de selección de microorganismos de coagulación de la leche

Como el objetivo del aislamiento y selección de las cepas de Lactobacilos y cocos podrían a futuro emplearse en elaboración de leches fermentadas con probióticos, debido a eso se sometió a prueba de coagulación de la leche (cuadro 19)

Cuadro 19. Coagulación de la leche normal

Coagulación (hr) Cepas	24 horas	48 horas	72 horas
LSR	+	+	+
LJF	+	+	+
SJF	+	+	+
LJJFM1	+	+	+
LJJFM2	+	+	+

(-): Si hubo coagulación; (+): No hubo coagulación



Figura 5. Fotografía de coagulación de la leche a las 24 horas

La coagulación láctica es realizada por las bacterias probióticas presentes en la leche que transforman la lactosa en ácido láctico haciendo descender el pH de la leche, lo que produce la alteración de la caseína hasta la formación de coágulos. Las cepas de bacterias ácido lácticas pueden ser clasificadas en lentas o rápidas según su capacidad de crecer en leche a la temperatura de fabricación (21-30°C). Las cepas rápidas son capaces de coagular la leche en 24 horas y las cepas lentas en más de 48 horas. (Reinheimer, 1997). De acuerdo a los patrones de coagulación de la leche, se puede decir que las cepas aisladas de leche de cabra y sus derivados, son rápidas ya que coagularon la leche en 24 horas (figura 5), presentando un coágulo liso y uniforme, estos valores de tiempo de coagulación son parámetros útiles a nivel tecnológico ya que la acidificación de la leche, también participa en la inhibición de microorganismos indeseables.

4.3.4. Resultado de crecimiento en medios hostiles

Los resultados obtenidos para las pruebas realizadas en medios hostiles principalmente que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal se presentan a continuación. En el cuadro 20 y figura 6, se observan las cinco cepas aisladas y sometidas a medios hostiles en caldo MRS acidificado a pH 3.0 con HCl a (2.2 N).

Cuadro 20. Resistencia a medios hostiles

pH 3 y bilis 2 % Cepas	pH 3	2%
LSR	+	+
LJF	+	+
SJF	+	+
JJFM1	+	+
JJFM2	+	+

(+): Hay crecimiento; (-): No hay crecimiento

Los resultados mostraron que las cinco cepas crecieron en caldo MRS ajustado a pH 3. En investigaciones previas (Berrada y col., 1991), obtuvieron resultados similares, en sus experimentos utilizaron cepas de *Bifidobacterium* aislada a partir de una leche fermentada, ésta sobrevivió después de incubación in vitro en una solución de pH 3, durante tres horas. Nuestros experimentos demuestran que las cepas ensayadas, pudieran pasar a través del estómago en su paso hacia el intestino, manteniéndose aún viable, esto en caso que sea introducida por vía oral.

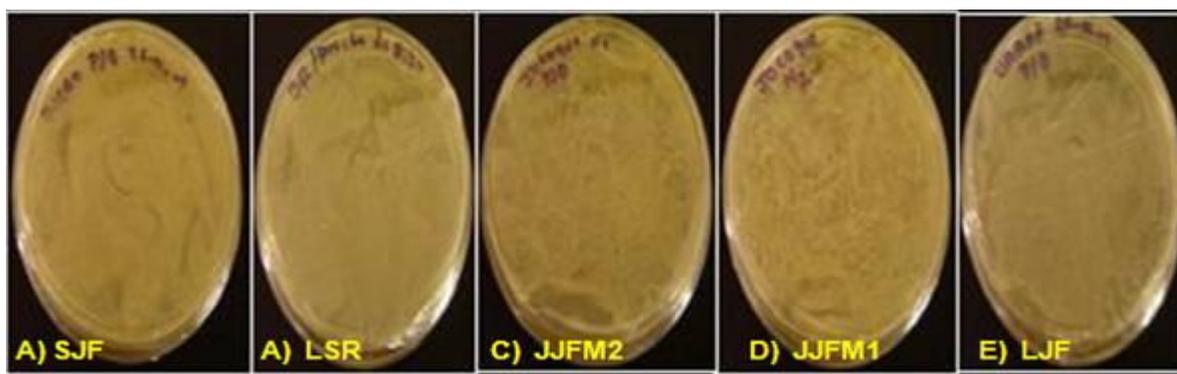


Figura 6. Fotografías de la evidencia de la viabilidad de las cepas evaluadas

En la figura anterior se muestran resultados de la prueba de las cepas aisladas en condiciones hostiles se cultivaron en caldo verde brillante bilis de Buey al 2%, las cinco cepas evaluadas fueron capaces de tolerar las condiciones que representa crecer en bilis de buey. Al-saleh y colaboradores (1998), reportaron que el género *Bifidobacterium* tolera mejor la bilis en comparación de otras bacterias ácido-lácticas como por ejemplo; *Streptococcus termophilus* o *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Los resultados obtenidos hasta esta sección indican que las bacterias ensayadas presentan características probióticas.

4.3.5 Resultados de las pruebas de estabilidad en el paso por el estómago

Los resultados obtenidos para la prueba de tolerancia a las condiciones del estómago en el cuadro 21 se presentan resultados bastante interesantes ya que nuevamente las cinco cepas fueron capaces de crecer en el medio Verde Brillante bilis de buey al 2 % y ajustado a pH 2.5. Los resultados obtenidos representan una ventaja ya que Dunne y colaboradores (2001), afirmaron que para garantizar la sobrevivencia de las BAL y ejercer sus efectos como probióticos es necesario probar su estabilidad a pH's ácidos y sales biliares.

Cuadro 21. Estabilidad del estómago y resistencia a sales biliares

pH y Bilis Cepas	2.5 pH	2% de bilis
LSR	+	+
LJF	+	+
SJF	+	+
JJFM1	+	+
JJFM2	+	+

(+): Con crecimiento; (-): Sin crecimiento

En la figura 7 se observa la fotografía de los caldos cultivados, en donde la turbidez del medio indican el crecimiento microbiano, el cual se aprecia de manera singular con la cepa de SJF (C) y JJFM1 (E), sin embargo en la pruebas de viabilidad en placas MRS también fueron capaces de crecer.



Figura 7. Resistencia del paso por el estómago con un pH de 2.5

Con respecto a las sales biliares, algunas cepas de *Lactobacillus* no crecen en presencia de sales conjugadas de la bilis, pero sí, en presencia de sales desconjugadas, (Suskovic *et. al*, 1997). En las cepas aisladas, la situación es diferente, ya que la bilis de buey posee un 2 %, sin embargo las cepas aisladas son resistentes. Esto posiblemente se deba a que las cepas aisladas poseen actividad hidrolítica para las sales biliares, en relación a este punto las opiniones son contradictorias: hay autores que opinan que la presencia de la actividad hidrolítica para las sales biliares no es deseable en una bacteria probiótica ya que podría disminuirse la concentración de sales conjugadas a niveles por debajo de los necesarios para la optima digestión y absorción de los lípidos. Además las formas desconjugadas pueden sufrir una modificación posterior y se suponen participan en procesos responsables en el desarrollo de cáncer de colon (Suskovic *et. al*, 1997). (Mejía y col., 2007; Suskovic y col., 1997).

4.3.6. Resultado del efecto de inhibición de las cepas aisladas sobre microorganismos patógenos en humanos

El experimento de inhibición de microorganismos patógenos por cepas próbioticas se estableció en un diseño de bloques completamente al azar con dos repeticiones que fueron: cepa próbioticas con 5 niveles (LJF, JJM1, JJM2, SJF, LSR), y microorganismos patógenos con 4 niveles (*E. aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*) se realizó el ANVA y donde fue necesario se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey. En el cuadro 22 se muestran el ANOVA de la prueba de inhibición de microorganismos patógenos ocasionados por las cepas aisladas.

Cuadro 22. Comparación de medias de Tukey

F.V	G. L	SC	CM	FC	Probabilidad
Repetición	1	1.6	1.6	0.72	0.40
Cepa probiótica (c)	4	10.40	2.6	1.17	0.35
Cepa patógena (p)	3	180.0	60.0	26.89	0.0001
c*p	12	280.0	2.3	1.05	0.45
Error	19	42.4	2.23	-----	-----
Total	39	262.4	-----	-----	-----

En la figura 8 se muestra que no existe diferencia significativa entre las cepas aisladas, puesto que todas las cepas ensayadas inhiben a los microorganismos casi de la misma manera. Algunas cepas de Bifidobacterias excretan sustancias antimicrobianas incluso con un espectro de actividad muy amplio (Simmering y Blaut, 2001).

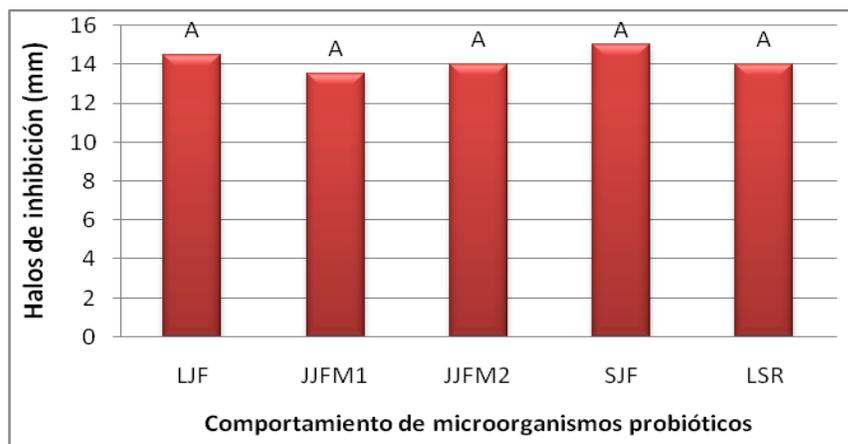


Figura 8. Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas

En la figura 9 se aprecia la inhibición de los microorganismos patógenos por los microorganismos probióticos, el cual el *Staphylococcus aureus* mostró diferencia significativa, puesto que presentó mayor sensibilidad ante las cepas aisladas, 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*.

Jack y col., (1995), explican que la sensibilidad del *S. aureus* provocados por los probióticos puede deberse a varias razones, incluyendo la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, entre otros.

Los resultados obtenidos para la inhibición de microorganismos patógenos incrementan sus características probióticas perfilando a los microorganismos aislados como fuertes candidatos para su aplicación.

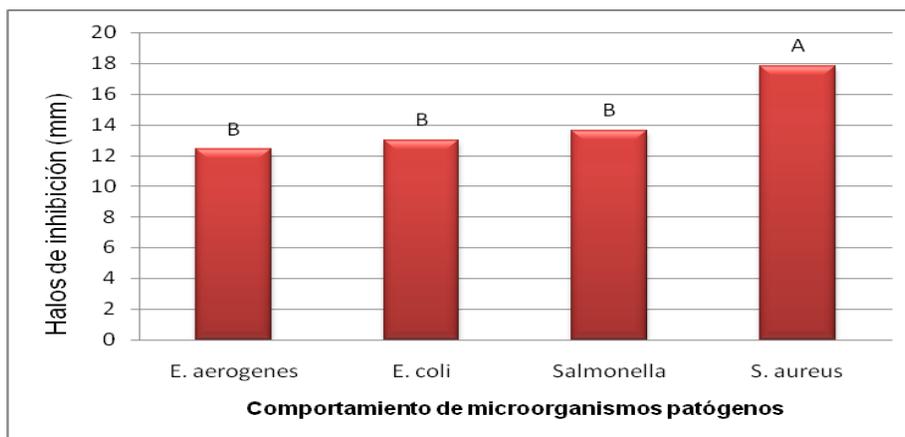


Figura 9. Sensibilidad de los microorganismos patógenos sobre cepas aisladas

4.3.7. Resultado de la prueba de sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos

Se probó la sensibilidad de las cepas contra cuatro antibióticos usados frecuentemente en los síndromes diarreicos, siendo esta una característica muy importante ya que después de una terapia con antibióticos, en el intestino quedan restos de estas sustancias las cuales podrían causar la muerte de nuestros microorganismos de interés (cuadro 23). Debido a la sensibilidad presentada de las cepas aisladas a dosis normales de los antibióticos, se probó a concentraciones más bajas, por lo tanto los antibióticos fueron diluidos, en donde se observó que las cepas LSR, JJFM1 y JJFM2 resistieron en concentraciones bajas de trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina, la cepa LJF toleró concentraciones bajas de trimetoprim-sulfametoxazol y bencilpenicilina, mientras que la cepa SJF mostró resistencia a tres antibióticos los cuales fueron; trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y bencilpenicilina.

Cuadro 23. Sensibilidad de cepas aisladas a diferentes concentraciones de antibióticos

Diluciones de antibióticos	Ampicilina (mg/mL)			Tetraciclina (mg/mL)			Bencipenicilina (UI/mL)			Trimetoprim-sulfametoxazol (mg/mL)		
	50.0	5.0	0.5	25.0	2.5	0.25	60000	6000	600	16/80	1.6/8	0.16/0.8
LSR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
LJF	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
SJF	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
JJFM1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
JJFM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): Hay crecimiento; (-): No hay crecimiento.

En la figura 10 se muestra la resistencia de las cepas aisladas a trimetoprim-sulfametoxazol a una dosis de 0.16/0.8 mg/mL.

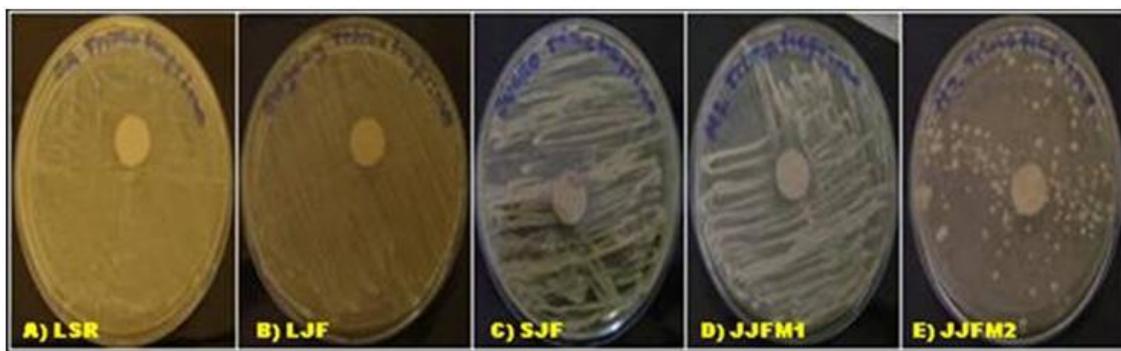


Figura 10. Resistencia de las cepas ensayadas a trimetoprim-sulfametoxazol

A simple vista se puede observar que las cepas aisladas resistieron a trimetoprim-sulfametoxazol a una dosis de 0.16/0.8 mg/mL y fueron

moderadamente resistentes a bencilpenicilina y tetraciclina, mientras que en ampicilina todas las cepas fueron sensibles aún en concentraciones bajas; estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Charteris y col., (2000), Biaviati y col., (2000) y Temmerman y col., (2002).

Por otro lado es importante señalar, que hay autores que consideran que la resistencia a los antibióticos no es una propiedad deseable en cepas probióticas, ya que por medio de plásmidos podrían transferirse a bacterias patógenas presentes en el intestino del huésped creando situaciones no deseables para la salud (Relalais, 1996).

Capítulo 5

Conclusión

De acuerdo con los objetivos planteados, los materiales y métodos empleados y resultados obtenidos se pueden derivar las siguientes conclusiones.

Se aislaron 5 cepas de muestras de suero de leche de cabra y sus derivados (Jocoque y suero).

Las cepas aisladas fueron identificadas como microorganismos Gram positivo, correspondientes al género *Bifidobacterium* spp. 2 y confirmado por pruebas bioquímicas con alta probabilidad para dos de ellas (LJF y SJF) y las cepas LSR, JJFM1 y JJFM2 resultaron tentativamente *Bifidobacterium* spp. 2.

Todas las cepas coagularon la leche rápidamente en un periodo de 24 h, por lo que estas cepas se podrían emplear para la elaboración de productos fermentados. En base a los experimentos realizados de prueba a diferentes temperaturas, se demostró que la mayoría de las cepas ensayadas crecieron hasta 60 °C, excepto la cepa JJFM1, fue la que mostró sensibilidad, creciendo hasta 50 °C.

Se ha demostrado la posibilidad de utilizar las cepas de *Bifidobacterium* ssp. 2 como probiótico, basados en la realización de algunos experimentos *in vitro* tales como: resistencia a pH de 2.5, resistencia a las concentraciones de 2.5 % de sales biliares durante 24 horas.

Todas las cepas aisladas presentaron actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos de prueba (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*), según el sistema SAS, el *Staphylococcus aureus* mostró mayor sensibilidad ante las cepas aisladas, además presentó resistencia a concentraciones ensayadas de trimetoprin-sulfametoxazol, mientras que a penicilina fueron altamente sensibles.

Las bacterias obtenidas de la leche de cabra y sus derivados podrían ser utilizadas de manera positiva para elaborar productos lácteos con probióticos o como aditivos en alimentos para humanos o animales, ya que resisten a la acidez gástrica y a capacidad antimicrobianas contra algunos microorganismos patógenos y resistencia contra algunos antibióticos.

Capítulo 6

Recomendación

Basándonos en estos resultados planteamos las siguientes perspectivas:

Utilizar cámaras especiales para mantener las condiciones de anaerobiosis, aún durante la manipulación de las muestras, ya que esto pudiera representar una variable importante que estaría afectando el aislamiento.

Para que este estudio se profundice en la correcta identificación de las cepas aisladas en la leche de cabra y sus derivados, es necesario emplear metodologías más precisas sobre la presencia de la enzima fructosa 6-fosfato-fosfocetolasa (F6PPK), para que se compruebe la autenticidad del uso de las cepas aisladas como microorganismos probióticos (GRAS) en la industria de alimentos. También se recomienda utilizar el sistema Api-50 CHL para identificarlo hasta especie.

Caracterizar las cepas con respecto a su potencial benéfico en experimentos *in vivo* en animales de laboratorio para su posterior utilización en alimentos humanos.

El uso de estos microorganismos asegura un futuro prominente en la industria de alimentos; por tal motivo se espera que este trabajo sea retomado en la búsqueda de nuevas respuestas que permitan aportar la información necesaria para la elaboración de un producto en base a bífidos.

Capítulo 7

Referencias bibliográficas

Alvarez-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.

Al-Salet, A.A., Zahran, A.S., Abu-Tarboush, H.M. (1998). Growth of Bifidobacteria: environmental conditions and adherence to epithelial cells. *Milchwissenschaft*, 53 (4): 187-189.

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.

Banwart, G. J., 1982, Microbiología básica de los alimentos. Ed. Ediciones Bellaterra, España.

Ben Amor, K.; E. E. Vaughan & W. M. de Vo. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic Acid bacteria. *Journal of Nutrition*, 137(3): 741 – 747.

Berrada, N. Lemeland, J.F. Laroche, G.Thouvenot, P. Piaia, M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy SCI*, 74, 409-413.

Biavati, B., V. Escovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* 50, 117-131.

Calderón Oscar, Carolina padilla, Carolina chaves, Laura Villalobos y María Laura Arias. 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*. 2007. Archivos Latinoamericanos de Nutrición Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 57(1), 2007 p.53

Callon, C.; L. Millet y M. C. Montel. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71 (2). 231 – 244.

Cervantes R. (2000). Situación de la Caprinocultura en Nuevo León. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. <http://www.unionganaderanl.org.mx>

Chacon, R., Z., López, C.G. (2000). Evaluación de capas de *Lactococcus* como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos de pasta prensada. Revista Científica, pp. 423 y 428.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 2000. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *J.Food Prot.* 63, 1369-1376.

Collado Amores María Carmen. 2004. Caracterización de cepas del género *bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. P.22-23.

Consumer. Alimentos funcionales o enriquecidos, Revista Consumer, 51 (1):16-18. <http://revista.consumer.es/web/es/20020101/alimentacion/>

Danone Vitapole Research. Danone Newsletter 7. Lactobacillus casei. Encontrado Marzo 13, 2002. En la World Wide Web en:<http://www.danonevitapole.com/extranet/vitapole/portail.nsf/ACCUEIL?OpenFormySeq=1>

Dave, R.L., y Shah, N.P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starts culture. *Intl Dairy J.* 7:31-41.

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.

De Vries, W., Stouthamer, A.H. 1969. Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Microbiol.* 65, 275-287.

DIFCO. (1978). Manual de bacteriología. Gráficas MIRASA, S.L. Valdemoro. Madrid. P. 58.

Dubeuf J.-P., Morand-Fehr P., Rubino R. (2003). Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research* 51: 165-173.

Dunne, Colum, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. In: *The American journal of clinical nutrition.* Vol. 73, No. 2 (2001); p. 386S-92S.

Gimeno Creus Eva. Alimentos probióticos y prebióticos. OFFARM. Ámbito Farmacéutico. Nutrición. Vol. 23 No. 5. (Mayo 2004). P. 91-93.

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.

Foo, E. L.; H. G. Griffin; R. Mollby & C. G. Hedén. (Editors). 1993. The Lactic Acid Bacteria. Horizon Scientific Press. United Kingdom, 89 – 91.

Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. 32, pp.439-442.

Fuller, R. 1992. Probiotics foods. Current use and future developments. Int. Food Ingred. 3. pp. 23-26.

Fuller, R., 1994, History and development of probiotics, In, Probiotics, Ed. R. Fuller. Chapman y Hall, N.Y.

Fuller, R. 1989. Probiotics for farm animals. In Probiotics: A Critical Review, G.W. Tannock, ed. Wyomondham, UK: Horizon Scientific Press. pp. 15-22.

Fung, D.Y.C. 1997. “Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis New Technologies”. (Eds. Tortorello, M.L. y Gendel, S.M). Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 1-25

Gibson, G., y Roberfroid, M. 1995. Modulación dietética de la microbiota colónica humana: Introducción del concepto de los prebióticos. J. Nutr. 125: 1401-1412.

Gibson, GR. 2002. British Journal of Nutrition. Probiotics as modulators of the gut flora. 88 (1). (en línea). Consultado el 25 de abril del 2008. Disponible en:<http://www.eufic.org/article/es/artid/perspectivas-probioticos/>

González-M. B. E., Marivel G.-T., Zacarías J.-S. Bacteriocinas de probióticos. Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León), 2. Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León). Revista Salud Pública y Nutrición. Vol. 4 No. 2. 2003. P:325

Grappin, R., R. Jenet, R. Pillet and A. Toquin. 1981. A study of goat's milk. I. Contents of fat, protein and nitrogenous fractions pp.: 61: 117-133.

Hammes, W.P., N. Weiss, y W. Holzapel. (1992). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes*. Vol. II, eds. Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. 2^oEd. Springer-Verlag, N.Y. P:543

Hassan, A.N. y Frank, J.F. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele. 2001. Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. P. 50-58

Heller, 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. P:227.

Holdeman, L.C., Good, I.J., Moore, W.E.C: (1976). Human faecal flora variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:359-375.

Holland, D.F. 1920. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.* 5, 215-229.

Hortensia Silla Santos M. 2004. Dieta mediterránea y alimentos funcionales seguridad alimentaria. Editorial de la UPV Valencia. Pág. 47-63.

Jack R, Tagg J y Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995; 59:171-200.

Jouzier X. et Cohen-Maurel E. 1986. Manuel de référence pour la qualité du lait. FNPL. París, France. P. 55.

Juárez M. Juan Carlos y 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 Belen (Boyaca). Universidad de la Salle Facultad de Zootecnia Bogotá. Pág. 50-51

Kandler, O., Weiss N. (1986). Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 7th. Ed. The Williams y Wilkins Co. Baltimore. P: 340.347.

León, T.V., Totosaus, A. Guerrero, I. M.L. Pérez Chabela. 2006. Efecto de Bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México. 5: 002. pp 135-141.

Lilly, D.M., Stillwell, R.H. 1965. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147, 747-748.

Lomas Y., Rojas C., (2005). Aprovechamiento de suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. VII séptimo Congreso Nacional de ciencia de los Alimentos y III Foro de ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. p. 475-484.

Madigan, M., Martinko J., Parker J. (1988). Brock Biología de los microorganismos. PRENTICE HALL EBERIA. Madrid. P.88-90.

Man, Rogosa, Sharpe. 1960. *J. Appl. Bact.* 23. P.130.

Martín R y E. Escudero. (2010). Practica 5. Tecnicas de siembra y cultivo de bacterias y hongos. Manual de Microbiología Experimental (ME1515) p.4. Departamento de programas audiovisuales UNAM. http://depa.pqquim.unam.mx/amyd/archivero/P5.TecnicasCultivoBacteriasHongos_10030.pdf

Marquina, D. y Santos, A. Probióticos, prebióticos y salud. Encontrado en la World Wide Web en: http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32_24.pdf

Matteuzi, D., Crociani, F., Brigidi, P. 1983. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* 134, 339-349.

Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., De Vos, W., 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. 2000. Probiotics: towards demonstrating efficacy. 10, 393-399.

Mejia, R. J. A. Zarack, C. R. Balmore, G. C. Julio, O.R. y Guillermo, L.C. (2007). Obtención de capas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. Revista Científica, FCV-LUZ/ 17. (2), 178-185.

Merk, C, 2005. Internet disponible en: www.merk.com.co/mcsa/site/wwwsp-nsf/ustRefConPortit/ColorGram%20-%20ustRefConPortTit/ColorGram%20-%20Coloracion%20de%20Gram?opendocuemnt. Accesado el 25 de enero de 2010.

Micanel, N., Haynes, I.N., Playne, M.J. (1997). Viability of probiotic cultures in commercial Australian yogurts. *Aust. J. Dairy Tech.* 52: 24-27.

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.

Nagendra, G. 2001. Functional Foods from probiotics and prebiotics. *Food Tech.* 11, 46-53.

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*, *Weissela minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology* 89 (6):969–978.

Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. 4, 468-480.

O’Sullivan, M., Thornton, G, Y Collins, J., 1992, Probiotics bacteri:myth or reality?, *T. Food Science*, 12(3):309-314.

Parvez S, Malik K, Kang S, & Kim H. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J App Microbiol.* 2006; 100: 1171-1185.

Perdigón, G., Agüero, G., Alvarez, S., Gaudio de ALLORI, c., Pesce de Ruíz Holagdo, A.A. 1995. Effect of viable *Lactobacillus casei* feeding on the inmunity of the mucosae and intestinal microflora in malnourished mice. 50: 251-256.

Rasic, J.L. y Kurmann, J.A. 1983. Bifidobacterias and their role. *Ann. Péd.* 241, 8-23.

Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A.; Taillez, P.; Binetti, A.G.; Suárez, V.B. 1996. The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. *Int. Dairy J.* 6: pp 869-879.

Relalais, G. P., (1996). Recent advances in the prevention and tratament of diarrheal diseases. *Current opinions in Infectious Diseases.* 9: 210-213.

Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344, 1046-1049.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Sci. Technol.* 10, 1-4.

Sanders, M.E., y 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.* 76, 293-315.

Scardovi, V. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME y Holt JG (eds) Williams and Wilkins. Baltimore, Londres, Los Angeles, Sydney. P.1418-1434.

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.

Schmidl, M.K y Labuza, T.P. 2000. *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. USA.

Schrezenmeir J. y De Vress, M. Probiotics, prebiotics and symbiotic-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 73 No. 2 (Suppl. 2001); p. 361-364.

Shah, N., 2001, *Functional Foods from Probiotics and Prebiotics*, *Foodtechnology*, Nov. 55/11:46-53.

Shankar, P.A., y Davies, F.L. 1977. Selective technique for yogurt bacteria enumeration. *J. Soc. Dairy Technol.* 30, 28.

Secretaría de Salud. 1989. *Ley General de Salud*. Ed. Porrúa. México. P: 30-31

Simmering, R. y Blaut, M. (2001). Pro-and-prebiotics-the tasty guardian. *Microbiol. Biotechnol.*, 55. 19-28.

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.

Siuta-Cruce, P. y Goulet, J., 2001). Improving Probiotics Survival Rate, *Foodtechnology*, Oct. 55/11:46-53.

Sonoike, K., Mada, M., Mutai, M. 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J.Food Hygienic Soc. Japan* 27 ,238-244.

Suskovic, J., Brkic B., Maticic S., Maric V. (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft* 52: 430-435.

Sperti, G.S. 1971. Probiotics. *Westport, Conn., AVI Pub.Co.*

Suarez Murcia Juan Carlos. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). Trabajo de grado presentado para optar el título de Zootecnista. Universidad De La Salle Facultad De Zootecnia. Bogotá D.C., 2008. P. 50-51.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2002. Identification of antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10.

Teragazhi, B.E., Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic Streptococcaceae phages from cheese factories. *Appl. Environm. Microbiol.* 29, 807.

Teuber, M. A. Geis, and H. Neve. (1992). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes*. Vol. II, eds. Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. 2^oEd. Springer-Verlag, N.Y.

Theunissen J, TJ Britz, RC Torriani and RC.Witthuhun 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiology.* 98: 11-21.

Tissier, H. 1900. La putréfaction intestinale. *Bull. Inst. Pasteur.* Paris.

Trovatelli, L.D. 1965.The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* 15, 19-29.

Vasconcelos, J.A. 2002. Alimentos Funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. World of food science. The World of Food Science. Encontrado Febrero

22, 2002. En la World Wide Web:

http://www.worldfoodscience.org/voll_3/feature1-3a.html

Veisseyre, R. Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche, Editorial Acribia. Zaragoza (España), 2000 P.2-3.

Williams y Wilkiins. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins, 1994.

Zhang, W,Y., Yun, Y,Y., Sun T,S., Menghe, B., He Ping Zhang, H,P. (2008). Isolation and identification of dominant microorganisms involved in naturally fermented goat milk in Haixi region of Qinghai, China. Annals of Microbiology. 58(2):213-217.

Página consultada:

Web 1: Your Nutrition and Food Safety Resource. International Food Information Council (IFIC)-Marzo 2004. Disponible en: <http://www.ific.org/about/index.cfm>
Accesado el 07 de febrero de 2010.

Capítulo 8

Anexos

Anexo A. Jarras de anaerobiosis adaptadas cultivar cepas probióticos

Fue necesario adaptar jarras de anaerobiosis de 3 litros y 275 mL con el fin de simplificar el aislamiento y cultivo de microorganismos anaeróbicos. Son de peso ligero transparente y soporta esterilización en autoclave, tiene conexiones externas con el generador de N₂, en donde el generador de N₂ se midió en kg/cm², se le inyectó 1 psi durante 10 minutos a los reactores de 275 mL y a los reactores de 3 litros se les inyectó 1.5 psi.

Anexo B. Tinción de Gram

- Recoger muestra estéril
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejara de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua
- Agregar lugol y esperar 1 minuto
- Enjuagar con agua
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejara de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

Anexo C. Prueba de catalasa (Método del portaobjetos)

- ◆ Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- ◆ Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- ◆ Observa la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- ◆ Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- ◆ Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producir falsos positivos.

Anexo D. Composición del sistema 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

Preparación de la galería: Se reunió fondo y tapa de una cámara de incubación y se repartió en los alveolos. Se sacó la galería API 20 A de su envase y depositó en la cámara de incubación y con la ayuda de una pipeta estéril, se inoculó la galería con la suspensión preparada, evitando la formación de burbujas. Para el test GEL, se llenó el tupo y la cúpula, para el test IND, se llenó solamente el tubo con API 20 A Medium y se llenaron las cúpulas con aceite de parafina, para evitar la evaporación del índol formado.

Anexo E. Identificación API 20 A

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
<u>IND</u>	L-triptofano	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	D-glucosa D-manitol D-lactosa (origen bovino)	1,96 1,96 1,96	acidificación (GLUCosa) acidificación (MANitol) acidificación (LACTosa)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-sacarosa D-maltosa salicina D-xilosa L-arabinosa	1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidificación (SACarosa) acidificación (MALtosa) acidificación (SALicina) acidificación (XYLosa) acidificación (ARAbinosa)	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-melecltosa 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 (MANosa) acidificación (MELeZtosa) 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	ococus

Anexo F. Sistema SAS

Sistema SAS			Código cepas probióticas			
Procedimiento ANOVA			LJF			1
Información del nivel de clase			JJFM1			2
Clase	Niveles	Valores	JJFM2			3
b	5	1,2,3,4,5	SJF			4
p	4	1,2,3,4	LSR			5
r	2	1,2				
			Código de cepas patógenas			
Procedimiento ANOVA			<i>E. aerogenes</i>			1
Números de observaciones 40			<i>E.coli</i>			2
Sistema SAS			<i>Salmonella</i>			3
Variable dependiente : h			<i>S. aureus</i>			4
Fuente	DF(g.l)	Suma de cuadrados	Cuadrado de media	F-Valor	Pr> F	
Modelo	20	220.0000000	11.0000000	4.93	<0.0001	
Error	19	42.4000000	2.2315789			
Total correcto	39	262.4000000				
	R- cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	h Media		
	0.838415	10.52005	1.493837	14.2000		
Fuente	DF	ANOVA SS	Cuadrado de media	F-Valor	Pr> F	
r	1	1.6000000	1.6000000	0.72	0.4077	
b	4	10.4000000	2.6000000	1.17	0.3573	
p	3	180.0000000	60.0000000	26.89	<0.0001	
b*p	12	28.0000000	2.3333333	1.05	<0.4507	
Sistema SAS						
Procedimiento ANOVA						
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para h						
Alfa		0.05				
Error de grados de libertad		19				
Error del cuadrado medio		2.231579				
Valor critico del rango estudentizado		4.25283				
Diferencia significativa mínima		2.2462				
Medias con la misma letra no son significativa diferentes						

Tukey agrupamiento	Media	N	p
A	15.000	8	4
A	14.500	8	1
A	14.0000	8	3
A	14.0000	8	5
A	13.5000	8	2

Prueba del rango estudentizado de tukey (HSD) para h

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	19
Error del cuadrado medio	2.231579
Valor critico del rango estudentizado	3.97655
Diferencia significativa minima	1.8785

Medias con la misma letra no son significativa diferentes

Tukey agrupamiento	Media	N	p
A	17.8000	10	4
B	13.6000	10	3
B	13.0000	10	2
B	12.4000	10	1