

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
frutas (uva, manzana y ciruela)**

POR:

MAIRA GONZÁLEZ MUÑOZ

T E S I S

Presentado como requisito parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Marzo de 2011

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
frutas (uva, manzana y ciruela)**

POR:

MAIRA GONZÁLEZ MUÑOZ

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

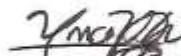
Aprobada por:



Dr. Antonio Francisco Aguilera

Carbó

PRESIDENTE DEL JURADO



Dra. Ana Verónica Charles

Rodríguez

VOCAL I



Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

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 Marzo de 2011

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACIÓN DE
CIENCIA ANIMAL

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

Los evaluadores de esta investigación fueron los siguientes:

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

DEDICATORIA

A mis padres:

*Anastacia Lourdes Muñoz Cruz y Ventura Familo González Rodríguez,
por apoyarme siempre y por sus sabios consejos.*

A mi hermano:

Elicer González Muñoz, por su constante apoyo.

A mi familia:

Por su agradable compañía.

A Leo y Max

Por compartir su vida a mi lado y por todo su amor

AGRADECIMIENTOS

La autora del presente trabajo agradece a Green Corp Biorganiks en su institución CEMAP, por permitir realizar este proyecto dentro de sus instalaciones.

A mi alma mater, Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por acogerme en sus instalaciones y brindarme los conocimientos necesarios para ser profesionista.

A mi tutor, Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó profesor de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por su apoyo y consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández por su gran ayuda, consejos y disponibilidad para la realización y culminación de esta tesis.

Al Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, por promover la realización de este tipo de proyectos de colaboración multi-institucionales, y por brindarme todas las facilidades para poder culminar la tesis y presentar su defensa.

A todo el personal de CEMAP (técnicos, investigadores y trabajadores de laboratorio).

A mis amigos y compañeros de ICTA de la generación CVI (Bonifacio, Clelita, Toño, Tere, Wendolin, Lety, Monse, Juan José, Dolores, Belén, Aglael, Luis, Laura, Donald, Marbella, Adolfo, Paty y Carmen por su amistad, compañía y valiosa ayuda en la realización de las pruebas del trabajo.

A todas aquellas bacterias empleadas para realizar todos los estudios de la presente tesis.

Contenido

RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPOTESIS	4
4. OBJETIVOS	4
4.1 Objetivo General.....	4
4.2 Objetivos específicos	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
5.1 Ensilado de frutas	5
5.1.1 Contenido de humedad.	5
5.1.2 Tamaño del triturado.....	5
5.1.3 Rapidez del ensilado	5
5.1.4 Cantidad de carbohidratos solubles (naturales o agregados).....	6
5.2 Fermentación láctica	6
5.3 Bacterias lácticas	6
5.4 Importancia de las bacterias lácticas.....	8
5.5 Bacterias lácticas presentes en las frutas	9
5.6 Probióticos	10
5.7 Condiciones deseables de un probiótico.....	11
5.8 Ventajas que se atribuyen al consumo de alimentos probióticos	12
5.9 Efectos probados de la ingestión de probióticos	12
5.9.1 Diarrea infecciosa (rotavirus).	12
5.9.2 Diarrea por Clostridium difficile.....	12
5.9.3 Diarrea asociada a antibióticos.....	13
5.9.4 Prevención/tratamiento de la alergia alimentaria.	13
5.9.5 Dermatitis atópica.	14
5.9.6 Carcinogénesis.....	14
5.9.7 Hipercolesterolemia.....	14
5.9.8 Disminución de los niveles de amonio.....	15

5.10	Microflora intestinal en el cuerpo humano.....	17
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1	Adquisición de las muestras	20
6.2	Adaptación de reactores de anaerobiosis.....	20
6.3	Procesamiento de las muestras.....	21
6.3.1	Microsilos	21
6.4	Tratamiento de los ensilados de frutas	22
6.4.1	Determinación del pH en los ensilados de las muestras	22
6.5	Medios de cultivo	22
6.5.1	Condiciones de cultivo	23
6.6	Selección e identificación de cepas	24
6.6.1	Purificación por estría.....	24
6.6.2	Identificación macroscópica y microscópica (tinción de Gram)	25
6.6.3	Prueba de catalasa	25
6.6.4	Método API (Biomérieux)	25
6.7	Resistencia de las cepas aisladas a bajo pH.....	27
6.8	Capacidad de crecimiento de las cepas aisladas a altas temperaturas.....	28
6.9	Selección de las cepas aisladas con capacidad de coagulación de la leche	28
6.10	Crecimiento en medios hostiles	28
6.11	Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas aisladas	28
6.12	Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos.....	29
6.13	Estabilidad en el paso por el estomago	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1	Procesamiento de las muestras.....	30
7.2	Tratamiento de los ensilados de frutas	30
7.2.1	Determinación del pH en los ensilados de las muestras	30
7.3	Selección e identificación de las cepas.....	31
7.3.1	Identificación macroscópica	31
7.3.2	Identificación microscópica (tinción de Gram).....	33
7.4	Identificación mediante pruebas bioquímicas	35

7.4.1	Prueba de catalasa	35
7.4.2	Prueba mediante el sistema API	36
7.5	Resistencia de las cepas aisladas a bajo pH.....	38
7.6	Capacidad de crecimiento de las cepas aisladas a altas temperaturas....	39
7.7	Selección de las cepas aisladas con capacidad de coagulación de la leche	40
7.8	Crecimiento en medios hostiles	41
7.8.1	Crecimiento en bilis de buey	42
7.8.2	Crecimiento a pH 3.....	42
7.9	Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas aisladas.....	44
7.10	Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos	45
7.11	Estabilidad en el paso por el estómago y resistencia a sales biliares...	46
7.12	Discusiones.....	47
8.	Conclusiones.....	49
9.	Bibliografía	50
9.1	World Wide Web.....	53

RESUMEN

La microbiota del tracto gastrointestinal está regulada por diversos factores, interacción entre microorganismos, enzimas gástricas y pancreáticas, pH, movimientos peristálticos y sales biliares. La capacidad de tolerancia a pH y sales biliares es un criterio de selección y un requisito indispensable para que los microorganismos puedan desarrollar sus efectos benéficos en el intestino.

En este trabajo se estudiaron las propiedades probióticas de 3 cepas aisladas de uva, manzana y ciruela. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas estudiadas, exceptuando la cepa C, mantienen su viabilidad con valores bajos de pH, en presencia de sales biliares y a altas temperaturas demostrando mayor capacidad para tolerar medios hostiles. Estas características hacen posible que sobrevivan durante su paso por el estómago.

Las cepas de manzana y ciruela no presentaron actividad antagónica contra microorganismos patógenos comparables con las cepas comerciales. Las dos cepas estudiadas presentaron actividad de fosfo-b-galactosidasa, fermentando la lactosa.

En la prueba de Inhibición contra microorganismos patógenos y sensibilidad a antibióticos demostró que las cepas aisladas no presentaron resistencia a ninguna de las bacterias patógenas (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*) ni a ninguno de los antibióticos utilizados (Bencilpenicilina, Ampicilina, Tetraciclina y Trimetropim-sulfametaxol). Lo anterior permite recomendar más estudios para evidenciar su uso como alternativa a antibióticos en humanos o animales.

Palabras clave: *probióticos, frutas, bacilos, cocos, bacterias ácido lácticas*

1. INTRODUCCIÓN

En cada uno de nosotros (en nuestra piel, en nuestras mucosas en nuestro tracto gastrointestinal) viven microorganismos al lado de los cuales el número de nuestras propias células se ve empequeñecido. Si bien, algunos de estos microbios son patógenos, la mayoría de ellos son inofensivos o incluso benéficos. La gran variedad de microorganismos del cuerpo, colectivamente denominados la microbiota, es similar a un órgano en el sentido de que lleva a cabo funciones esenciales para nuestra supervivencia. Algunos microbios producen vitaminas y otros nutrientes esenciales. Muchos metabolizan alimentos que no podemos digerir por nosotros mismos. También descomponen fármacos y toxinas y regulan múltiples aspectos de la inmunidad innata y adquirida, protegiendo al organismo huésped de infecciones y de inflamación crónica, y también, posiblemente, de muchos trastornos de base inmunológica. Cuando un agente ambiental altera la función de la microbiota, el resultado puede ser una enfermedad (Phillips, 2009).

La mayor parte de las investigaciones sobre la microbiota se han enfocado en los intestinos, donde habitan alrededor de 300-500 especies de microorganismos que principalmente se encuentran en el colon e intestino delgado distal. Cada uno de nosotros es portador de miles de especies de bacterias en nuestros intestinos, junto con unas cuantas especies de otros tipos de organismos. Si bien los seres humanos tienen una microbiota extremadamente similar, no hay dos personas que tengan exactamente la misma composición de especies de bacterias en sus intestinos. Sin embargo, todas tienden a codificar las mismas vías metabólicas (Phillips, 2009).

Las influencias externas tales como el uso de antibióticos, la alimentación y el estrés psicológico han demostrado tener una fuerte correlación con aquello que vive dentro de nuestro cuerpo, y apenas están comenzando a entender cómo estos factores ambientales pueden afectar nuestra salud (Phillips, 2009).

Al nacer, el tracto gastrointestinal es estéril. La flora intestinal es adquirida durante el periodo neonatal y permanece estable durante el resto de la vida. El primer contacto es el canal vaginal y la flora fecal materna que se ingiere habitualmente durante el parto que van a ser decisivos para el tipo de flora intestinal de cada persona. Las bacterias presentes en la leche humana son del género de los *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, bifidobacterias e incluso ciertas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* como fiel reflejo de la microbiótica del intestino del lactante. Por ello la *E. coli* presente en la leche materna es de las primeras especies que colonizan en el intestino neonatal (Martínez, 2008, web 4).

Los efectos beneficiosos de los alimentos están expresados bien directamente por la interacción de microorganismos vivos, bacterias o levaduras, con el huésped o bien indirectamente como resultado de la ingestión de los metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación. Las evidencias científicas indican que la ingestión de ciertos cultivos microbianos ejercen beneficios en la salud, no sólo en el tracto gastrointestinal sino también en el respiratorio y en el urogenital, así como en la modulación del sistema inmune (González y González, 2006).

Los probióticos son microorganismos vivos que se encuentran en algunos productos alimentarios o suplementos, y cuyo consumo en cantidades suficientes puede ser beneficioso para la salud. Los probióticos contribuyen al mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias dentro del tracto gastrointestinal (Thalcave, 2009, web 6).

Los tipos más comunes de bacterias probióticas son las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que a veces se combinan con *Streptococcus thermophilus*. Los probióticos suelen encontrarse habitualmente en productos lácteos fermentados. También están presentes en suplementos comercializados en forma de pastillas, cápsulas o sobres (Thalcave, 2009, web 6).

2. JUSTIFICACIÓN

Las toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúan suponiendo un problema sanitario y económico en los países desarrollados. Por otro lado, los consumidores demandan alimentos poco procesados y con menos aditivos químicos, por lo que la industria alimentaria necesita buscar alternativas que permitan ofrecer alimentos seguros pero al mismo tiempo de alta calidad nutritiva y organoléptica. La combinación de antimicrobianos naturales (probióticos) o la aplicación de tratamientos que conserven lo más posible los parámetros de calidad del producto original, suponen una alternativa a los métodos convencionales de conservación de alimentos.

La demostración de que la flora intestinal es de gran importancia en el desarrollo del sistema inmune y en el mantenimiento de los procesos inmunológicos, ha fomentado la investigación sobre bacterias con efectos beneficiosos a nivel inmunológico que puedan ser usadas para mejorar la salud de las personas. En este sentido, los probióticos que son ingeridos en cantidad adecuada ejercen efectos beneficiosos para la salud más allá de sus propiedades nutricionales. Aunque clásicamente el concepto de probiótico se ha asociado con los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, actualmente podemos incluir el término a otras cepas bacterianas no patógenas u otros microorganismos no bacterianos como el *Saccharomyces boulardii*.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación de los probióticos como antimicrobianos naturales, con el fin de obtener nuevos productos que puedan ser empleados en la población con la finalidad de disminuir el número de enfermedades gastrointestinales y mejorar su respuesta inmune.

3. HIPOTESIS

Es posible aislar microorganismos con características de probióticos a partir de ensilados de frutas (uva, manzana y ciruela).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de bacterias benéficas de frutas 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).

4.2 Objetivos específicos

- Aislar microorganismos Gram + de ensilados de frutas (uva, manzana y ciruela).
- Identificar los microorganismos obtenidos, por métodos bioquímicos y por el sistema API.
- Evaluar la sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos, al pH ácido, a altas concentraciones de sales biliares e identificar la capacidad de coagulación de la leche.
- Evaluar el efecto de inhibición de las cepas seleccionadas sobre algunos microorganismos patógenos.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Ensilado de frutas

Ensilaje es la técnica de conservación basada en la fermentación de forrajes verdes, tubérculos y frutas destinados a la alimentación de ganado (HispaNetwork, 2010, web 3). El ensilado es una opción que puede preservar alimentos que son estacionalmente abundantes para más adelante durante los períodos de escasez, puede también cambiar la naturaleza química de los alimentos. Ensilado es un producto muy versátil y puede ser utilizado como complemento a otros alimentos como el forraje (Kayouli y Stephen, 1998).

En el ensilado se deben considerar los siguientes aspectos:

5.1.1 Contenido de humedad. El ensilado debiera tener más de 50 por ciento de humedad de modo que sea fácil de compactar firmemente y así eliminar el aire. Sin embargo, un exceso de humedad, superior a 75 por ciento es dañino ya que afecta las últimas etapas de la fermentación, produciendo un ensilaje ácido. Para ajustar el grado de humedad se puede agregar agua o alimentos acuosos o secos, según sea necesario.

5.1.2 Tamaño del triturado. Cuanto más fino se triture resulta más fácil la compactación y al excluir el aire se asegura un buen almacenamiento. El triturado se puede hacer manualmente o empleando una trituradora.

5.1.3 Rapidez del ensilado. Una rápida puesta en silo y su sellado evitan pérdidas que causadas por la fermentación aeróbica. El ensilado empleando bolsas plásticas es también un buen procedimiento de almacenamiento; es un método fácil de hacer, puede producir ensilaje de alta calidad y reducir las pérdidas siempre que la bolsa se selle correctamente.

5.1.4 Cantidad de carbohidratos solubles (naturales o agregados).

Garantizan que el ensilaje fermente bien y que rápidamente alcance un valor bajo de pH que inhibirá el desarrollo de toda la actividad biológica. De esta forma se asegura la preservación del material ensilado con un mínimo de pérdidas de nutrientes y evitando cambios nocivos para la composición química del sustrato. El valor final del pH del ensilaje depende en gran parte del contenido en carbohidratos del ensilado. Esto explica porque resulta difícil ensilar con éxito materiales ricos en proteína y con bajo contenido de sustancias energéticas fermentables (Kayouli y Stephen, 1998).

5.2 Fermentación láctica

Una gran variedad de microorganismos participan activamente en la fermentación láctica (bacterias lácticas), mientras que otros causan su deterioro. Los microorganismos causantes del deterioro del producto son, en su mayoría, aerobios y no sobreviven en ambientes ácidos, por lo que prácticamente no se desarrollan en este proceso (Hernández, 2003).

5.3 Bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias gram-positivas unidas por una constelación de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de bacterias las incluye dentro del grupo de gram-positivas, no esporuladas, cocos y bacilos anaerobios que producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos (Zamora, 2003).

El género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el núcleo principal de la clasificación. El género *Bifidobacterium* generalmente está considerado dentro del mismo contexto como una bacteria ácido láctica genuina, pero filogenéticamente no tiene relación alguna ya que tiene una única vía de

fermentación de azúcar. La clasificación de las bacterias ácido lácticas esta ampliamente basada en la morfología, vía de fermentación de la glucosa (fermentación homoláctica o heteroláctica), crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido (L o D), habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia al medio ácido o básico (Zamora, 2003).

Cuadro 1. Clasificación de las bacterias lácticas

Grupo Homofermentativo
Bacterias que solamente forman indicios de productos accesorios junto con ácido láctico.
<i>Thermobacterium (Lactobacillus)</i>
<ul style="list-style-type: none">- Bastones alargados, aislados o en cadenas cortas.- Termófilos (temperatura óptima entre 40 y 50°).- Acidificantes muy enérgicos, hasta el 2,7% de ácido inactivo o levógiro.
<i>Streptobacterium (Lactobacillus)</i>
<ul style="list-style-type: none">- Bastones cortos, en cadenas.- Temperatura óptima hacia 30°.- Acidificación muy lenta, pero acusada (1% y más), ácido inactivo o dextrógiro.
<i>Streptococcus</i>
<ul style="list-style-type: none">- Forma esférica, cadenas de longitudes diversas, que pueden ser muy cortas en los medios sólidos.
Grupo Heterofermentativos
La producción de ácido es más débil; además del ácido láctico se forman otros ácidos, sustancias diversas y CO ₂ gas.
<i>Bifidobacterium</i>
<ul style="list-style-type: none">- Bastones, producen ácido acético en proporción elevada y ácido láctico dextrógiro.- Anaerobios: abundantes en las heces de los lactantes.
<i>Betabacterium (Lactobacillus)</i>
<ul style="list-style-type: none">- Forma de bastón, producción de gas, de ácido succínico.
<i>Betacoccus (Leuconostoc)</i>
<ul style="list-style-type: none">- Forma esférica, el ácido láctico es levógiro.- Fermentan las pentosas y descomponen las pectinas.- Fermentación viscosa con la sacarosa y producción de mucílago.

Fuente: (Charles, 1970).

5.4 Importancia de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son importantes, tanto por sus actividades bioquímicas como por su número en la microflora. La producción de ácido láctico en la fermentación anaerobia de los azúcares, es uno de los caracteres bioquímico más importantes (Charles, 1970).

La importancia de las bacterias lácticas radica principalmente en tres acciones (TN Relaciones, 2010, web 7):

5.4.1 Producción de ácido láctico. Las bacterias lácticas causantes de esta fermentación pueden ser homofermentativas que producen casi exclusivamente ácido láctico y cantidades mínimas de otras sustancias, o heterofermentativos, que producen además de ácido láctico, cantidades apreciables de productos volátiles. Las bacterias lácticas no son los únicos capaces de provocar la fermentación ácida; pueden producirla muchos otros, especialmente si las condiciones no son favorables a las bacterias ácido lácticas. Entre las bacterias capaces de acidificar, fundamentalmente por producir ácido láctico, se encuentran diversas especies de los géneros *Micrococcus*, *Microbacterium* y *Bacillus* (Pottí, 2007, web 5).

5.4.2 Degradación proteica (proteólisis). La hidrólisis de las proteínas por acción microbiana se acompaña en general de la producción de un sabor amargo producido por algunos polipéptidos (Pottí, 2007, web 5).

Las alteraciones producidas por los microorganismos proteolíticos son:

- Proteólisis ácida en la que tienen lugar simultáneamente la proteólisis y la producción de ácido, puede estar producida por diversas especies del género *Micrococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Bacillus* (Pottí, 2007, web 5).
- Proteólisis con acidez mínima e incluso con alcalinidad.
- Proteólisis producida por enzimas bacterianas del tipo de la renina en una etapa inicial de la proteólisis.

- Proteólisis lenta por endoenzimas liberadas por bacterias después de su autólisis. La proteólisis lenta carece de importancia en circunstancias normales, pero la posee cuando las bacterias disponen de una cantidad considerable de tiempo (Pottí, 2007, web 5).

5.4.3 Formación de compuestos. La fermentación láctica “aromatizante” permite la obtención de productos ácidos con un sabor deseado: sabor y olor producido por compuestos como ácido acético, ácido láurico y ácido mirístico (Charles, 1970). La producción de gas por las bacterias va siempre acompañada de la formación de ácido, que liberan tanto hidrógeno como dióxido de carbono y las bacterias heterofermentativas producen sólo dióxido de carbono (Pottí, 2007, web 5).

5.5 Bacterias lácticas presentes en las frutas

El crecimiento de las bacterias lácticas depende de los siguientes factores: la concentración de ellas en las frutas, las concentraciones de sal, azúcar y otros nutrimentos, así como la temperatura a la que son sometidas. Durante la primera parte de la fermentación predomina la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, cuyo desarrollo se ve favorecido por la concentración inicial de sal y una temperatura de 21°C. El microorganismo es capaz de convertir los azúcares en ácido láctico, ácido acético, etanol, manitol, algunos esteres y dióxido de carbono. Con la acidez y en estas nuevas condiciones, se desarrollan dos tipos de bacterias: *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, las cuales producen principalmente ácido láctico, además, es muy común encontrar la bacteria láctica *Pediococcus cerevisiae* (Hernández, 2003).

La fermentación de la uva puede durar de tres a siete días; al final, la concentración de ácido oscila entre 1,3 y 1,8% (equivalente a un pH entre 3,1 y 3,5) (Portilla, *et al.*, 2007).

La fermentación de la manzana puede durar de tres a seis semanas; al final, la concentración de ácido oscila entre 1,8 y 2,2% (equivalente a un pH entre 3,5 y 3,7). El proceso se detiene cuando no hay azúcares disponibles o cuando la acidez inhibe los microorganismos involucrados (Alonso, 2009).

La fermentación de la ciruela puede durar de dos a tres días; al final, la concentración de ácido oscila entre 1,0 y 2,0% (equivalente a un pH entre 2,8 y 3,1) (Young-Soon, *et al.*, 2008).

5.6 Probióticos

Actualmente se denomina probióticos a aquellos microorganismos vivos que, ingeridos con los alimentos, tienen efectos de prevención de algunas patologías o disminuyen los daños que causan algunas enfermedades (Martínez, *et al.*, 2007).

Se encuentran en lácteos fermentados, como yogurt, leche y queso, vegetales fermentados, carnes y pescados fermentados, y bebidas alcohólicas artesanales. Los *Lactobacillus* transforman la lactosa en ácido láctico, dicha acidez confiere un ambiente hostil para las bacterias patógenas (Mennickent y Green, 2009).

Generalmente los microorganismos utilizados como probióticos son bacterias comensales que forman colonias en el tracto gastrointestinal, vaginal y en la boca. Entre ellas están los *Lactobacillus*, ciertos cocos Gram positivos, las *Bifidobacterias* y *Bacillus cereus*. Además algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *boulardii*. La particularidad de los microorganismos probióticos es que poseen la capacidad de sobrevivir al tránsito por el tracto gastrointestinal y de colonizar tanto el intestino delgado como el intestino grueso, favoreciendo el equilibrio bacteriano. Los probióticos pueden incorporarse a un amplio abanico de productos, tanto en alimentos como medicamentos y suplementos dietéticos (Mennickent y Green, 2009).

5.7 Condiciones deseables de un probiótico

La condición básica de todo probiótico es la de tener un efecto beneficioso sobre el portador y ampliando el espectro debe reunir las siguientes características:

- No debe ser patógeno para el ser humano incluso para las personas con inmunocompromiso.
- No ser tóxico y no ir asociado con enfermedades gastrointestinales ni con otras como la endocarditis infecciosa.
- Debe tener una alta resistencia a su paso por el tránsito intestinal, ser estable frente a ácidos y bilis. En resumen, tiene que permanecer vivo y estable (Martínez, 2008, web 4).

Cuadro 2. Principales especies bacterianas utilizadas como probióticas

Género <i>Lactobacillus</i>	Género <i>Bifidobacterium</i>	Varios géneros
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>P. acidolacti</i>
<i>L. lactis</i>		<i>O. formigenes</i>
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Fuente: (Martínez, *et al.*, 2007).

5.8 Ventajas que se atribuyen al consumo de alimentos probióticos

Dentro de las ventajas nutricionales de los probióticos cabe destacar:

- Aumentan el valor nutricional de los nutrientes a través de una mejora en la digestibilidad y un aumento de la absorción de minerales y vitaminas.
- Mejoran la absorción de la lactosa y aumentan la biodisponibilidad del calcio contenido en la leche.
- Disminuyen el nivel de colesterol sérico actuando en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Martínez, 2008, web 4).

5.9 Efectos probados de la ingestión de probióticos

Los efectos favorables de los probióticos se ven reflejados en (Ferrer y Dalmau, 2001):

5.9.1 *Diarrea infecciosa (rotavirus)*. El objetivo de los probióticos es prevenir o revertir la deshidratación, acortar la duración de la enfermedad y reducir el período durante el cual la persona puede infectar a otras; en este sentido los probióticos pueden tener un efecto beneficioso en el control de la diarrea. Algunos probióticos muy conocidos son las bacterias acidolácticas y la levadura *Saccharomyces* (Uberos, 2010, web 8).

El motivo por el cual se utilizan los probióticos para la diarrea infecciosa es que actúan contra los agentes enteropatógenos, porque compiten por la obtención de nutrientes y lugares de unión disponibles, acidifican los contenidos intestinales, producen una variedad de productos químicos y aumentan las respuestas inmunitarias específicas y no específicas (Uberos, 2010, web 8).

5.9.2 *Diarrea por Clostridium difficile*. El *Clostridium difficile* forma parte de la microbiota intestinal. La administración de antibióticos altera la microbiota entérica y permite la proliferación de esta bacteria con producción de toxinas (exotoxinas A y B) en el colon conduciendo a la enfermedad. Los probióticos restauran el

balance microbiano y bloquean la proliferación de *C. difficile* disminuyendo significativamente la diarrea (Castro y De Rovetto, 2006).

5.9.3 Diarrea asociada a antibióticos. El crecimiento bacteriano patógeno es el efecto adverso más común en el uso de antibióticos y una de las indicaciones más comunes es el uso de probióticos. Aproximadamente el 20% de los pacientes que reciben antibióticos presentan este problema, que está asociado al aumento en el número de internaciones, mayor costo médico, mayor riesgo de contraer infecciones nosocomiales. Se piensa que los antibióticos alteran la flora intestinal al destruir los organismos responsables de la producción de los ácidos grasos que se absorben en el colon, de esta forma se acumulan moléculas más grandes que no son absorbidas y producen efecto osmótico en el colon, resultando la diarrea. Algunos probióticos (*S. Boulardii*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) han demostrado disminuir el número de deposiciones asociadas con el uso de antibióticos. Un reciente meta-análisis de nueve ensayos clínicos placebo controlados sobre el uso de probióticos en la prevención de diarrea asociada a antibióticos ha mostrado un beneficio consistente; los principales probióticos utilizados fueron el *Saccharomyces boulardii* y el género *Lactobacillus*; la reducción de la diarrea fueron significativamente mejorados a 0.34 para la levadura y 0.37 para el lactobacilo (Mendoza, *et al.*, 2004).

5.9.4 Prevención/tratamiento de la alergia alimentaria. Los alérgenos alimenticios pueden provocar una respuesta pro-inflamatoria en el intestino por alteración de la función de la barrera intestinal. Se ha postulado que las bacterias probióticas podrían prevenir esta disfunción intestinal, pero existe además una relación directa entre la función del tejido linfoide asociado al intestino y la respuesta alérgica. Los probióticos actúan reduciendo la inflamación intestinal, corrigen el desbalance de linfocitos y estimulan a las citoquinas supresoras de los eventos proinflamatorios del intestino. Algunos de los lactobacilos y bifidobacterias usados como probióticos favorecerían la producción de IgA y reducirían la secreción de IgE (Mennickent y Green, 2009).

5.9.5 Dermatitis atópica. La prevalencia de enfermedades atópicas, eczema atópico y rinoconjuntivitis alérgica están asociadas con las citoquinas sintetizadas por los linfocitos TCD4+ hacia la vía Th2 (IL-4, IL-5, y IL-13) las cuales promueven la secreción de inmunoglobulina E (IgE) y la eosinofilia. Los probióticos pueden ser efectivos en la respuesta inmune para prevenir las reacciones alérgicas. Estudios clínicos con *L. rhamnosus* GG y *B. Lactis* mostraron ser útiles en neonatos alérgicos. Este efecto es el resultado de la habilidad del organismo para incrementar la permeabilidad intestinal, estimular la secreción de IgA, producir citoquinas reguladoras como la IL-10 y factor de crecimiento transformador beta (TGF- β). La actividad de estas citoquinas se asocia con la supresión de las células Th2 y secreción reducida de citoquinas proinflamatorias, con un control de la respuesta IgE y reducción de la inflamación alérgica en el intestino (Castro y De Rovetto, 2006).

5.9.6 Carcinogénesis. Estudios en animales han mostrado que lactobacilos y las bifidobacterias modifican la microbiota intestinal reduciendo el riesgo de cáncer. Se postulan tres mecanismos:

- Estos organismos pueden disminuir las enzimas fecales (glycosidasa, β glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa) asociadas con la conversión de precarcinógenos a carcinógenos.
- Inhiben directamente la formación de células tumorales.
- Algunas bacterias pueden unirse o inactivar el carcinógeno. Voluntarios humanos recibieron *L. acidophilus* o *L. casei* reduciendo los niveles de enzimas que convierten precarcinógenos a carcinógenos (Castro y De Rovetto, 2006).

5.9.7 Hipercolesterolemia. El exceso de colesterol en el ser humano es un factor de riesgo en el desarrollo de aterosclerosis y otras enfermedades coronarias. Se ha comprobado efecto hipercolesterolémico terapéutico y preventivo de *L. reuteri* administrado a bajas dosis, sin efectos colaterales, obteniéndose una reducción de un 20%-30% del colesterol total y de un 22%-35%

de los triglicéridos. Al mismo tiempo, la administración de *L. reuteri* produjo un aumento de HDL/LDL (Mennickent y Green, 2009).

5.9.8 Disminución de los niveles de amonio. Los probióticos usados para la relación competitiva con otros gérmenes deberán usarse una formulación altamente concentrada, la que competirá con las bacterias productoras de amonio por el substrato, impidiendo su crecimiento y multiplicación, al inducir su inhibición y eliminación por los cambios locales del pH (ácido láctico) o bien por diarrea (inducida por CO₂), lo cual se traduce en una serie de beneficios que incluyen la disminución en los niveles del amonio por tal, así como la inflamación y el estrés oxidativo hepatocelular, la captación de toxinas microbianas como los lipopolisacáridos y sus metabolitos tóxicos. Es necesario elegir una mezcla de probióticos conveniente, teniendo en consideración que las mejores opciones son los lactobacilos tanto facultativos heterolácticos (*L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum*), como una bacteria heteroláctica obligatoria (*L. bifermentans* y *L. fermentum*) (Bosques, 2005).

Cuadro 3. Efectos probables de las bacterias probióticas

Acción del probiótico	Mecanismo de acción
Digestión de las proteínas: proteólisis	Las proteínas ingeridas se transforman, gracias a las enzimas proteásicos de los probióticos, en moléculas más pequeñas (polipéptidos y luego aminoácidos).
Digestión de las grasas: lipólisis	Las grasas sufren una transformación por obra de la flora probiótica, la enzima lipasa de los probióticos las transforman en ácidos grasos y glicerol.
Digestión de la lactosa	Los lactobacilos, produce una relevante cantidad de, Beta-galactosidasas. Resulta significativo en los sujetos que presentan intolerancia hacia la lactosa, porque la, Beta-galactosidasa producida por las bacterias lácticas parece estimular la producción de la lactasa residual a nivel del enterocito; en

		consecuencia, se obtiene una mayor tolerancia a la lactosa ya que el enzima determina la hidrólisis de glucosa y de galactosa, de fácil absorción por parte de la mucosa intestinal.
Asimilación de los aminoácidos	Los	Los probióticos permitirán la asimilación de los aminoácidos esenciales para el huésped, sintetizándolos o inhibiendo la acción de las desaminasas y de las descarboxilasas bacterianas producidas por la microflora del tracto digestivo. Sintetizan las vitaminas del grupo B, algunos cultivos de bacterias probióticas requieren para su actividad metabólica, justamente de las vitaminas del grupo B, mientras que otras logran sintetizar directamente vitaminas (K, B12, B9, H, B2, B5) cuya actividad es particularmente útil justamente para la función fisiológica del aparato gastrointestinal.
Antagonista patógenos	hacia	Los probióticos pueden reprimir el crecimiento de las bacterias patógenas; la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético, a partir de los glúcidos provenientes de los alimentos actúa bajando el pH y limitando el desarrollo de <i>E. coli</i> y de las <i>Salmonellas</i> .
Estimulación del sistema inmune		Las bacterias tienen una acción estimulante sobre el sistema inmunitario del huésped, ya que actúan tanto sobre las células implicadas en la inmunidad natural como en las relacionadas con la inmunidad específica. Los probióticos estimulan la actividad de los macrófagos. Además, la presencia de los microorganismos probióticos favorece la reproducción de anticuerpos, especialmente las IgA secretoras en el lumen intestinal. Las IgA pueden

		inhibir la adherencia de las bacterias patógenas a la superficie de las mucosas.
Neutralización tóxicos	de	Los probióticos atenúan el catabolismo intradigestivo, orientando la función hepática. Se acumulan en la microflora intestinal para reducir la absorción de sustancias tóxicas como el amoníaco, los aminados y el indol; parece también que disminuyen la biotransformación de las sales biliares y de los ácidos grasos en productos tóxicos.
Protección del aparato urogenital		El predominio de los lactobacilos en el aparato urogenital de los sujetos sanos (> del 90%) se ha relacionado al efecto de protección que éstos ejercen contra la invasión de las cavidades del cuerpo por parte de microorganismos patógenos, tanto endógenos como exógenos. Estas observaciones confirman que los lactobacilos endógenos representan, en la prevención de las infecciones urogenitales, un papel similar al que tienen en el intestino.

Fuente: (CASAPIA, 2010, web 1).

5.10 Microflora intestinal en el cuerpo humano

La mucosa gastrointestinal está muy replegada y provista de millones de vellosidades, cuyas prolongaciones digitiformes le confieren una superficie de 150 a 200 m². Esta forma y superficie favorece la adhesión y colonización de un elevado número de microorganismos, que en un adulto pueden superar las 10¹⁴ células microbianas por gramo de contenido intestinal. Es especialmente reseñable que en el colon es donde se encuentra la mayor concentración de estas bacterias (10¹¹ células/g de contenido intestinal), donde coexisten más de 400 especies diferentes que juegan un importante papel en el mantenimiento de un

sistema gastrointestinal estable. La diversidad de la flora presente en el TGI se debe a la gran variedad de fuentes de carbono de las que disponen para su crecimiento y está determinada tanto por factores genéticos como por otros factores como la dieta y el estado fisiológico del huésped. El TGI representa por tanto, un ecosistema de elevada complejidad (Martínez, *et al.*, 2003).

Cada vez más estudios confirman que el mantenimiento de la microflora intestinal beneficiosa (probióticos) contribuye a protegernos de microorganismos patógenos, ya que impiden su establecimiento en el intestino, principalmente por su efecto reductor del pH y su impacto tanto sobre algunas rutas metabólicas como en la inhibición del establecimiento de algunos de los patógenos como salmonella. Es por ello que últimamente se están llevando a cabo investigaciones que comparan la acción de distintos probióticos metabolizados por la flora intestinal (Martínez, *et al.*, 2003).

El establecimiento de la microflora intestinal comienza ya en el nacimiento y determina el desarrollo del sistema inmune intestinal (Borruel, 2005). El TGI de los recién nacidos en sus primeros días, está colonizado por lactobacilos pero también por bacterias coliformes y enterococos. En los bebés alimentados con leche materna, las bifidobacterias colonizan rápidamente, convirtiéndose en la flora dominante, debido a que entre sus nutrientes se encuentran oligosacáridos que se piensa inducen a la flora bifidogénica (Martínez, *et al.*, 2003).

Cuando el intestino de mamíferos es colonizado por nuevas especies bacterianas tras el nacimiento, aumenta el número de células plasmáticas a lo largo del intestino, la producción de anticuerpos circulantes específicos y anti-bacterias, se estimula la producción de los centros germinales de las placas de Peyer de células B antígeno-específicas y promueve la maduración y acumulación de linfocitos en el epitelio asociado a las placas Peyer. Esta interacción entre el sistema inmune intestinal y las bacterias de la flora mantiene una actividad del tejido linfoide asociado a la mucosa a lo largo de toda la vida (Borruel, 2005).

Cuadro 4. Microorganismos del tracto gastrointestinal humano

	Estomago	Yeyuno	Íleon	Materia fecal
Aerobios y/o anaerobios facultativos				
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	Ausentes	1-10 ²	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Bacterias bífidas	Ausentes	1-10 ³	10 ³ -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹²
Cocos gram-positivos	Ausentes	1-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹¹
<i>Clostridia</i>	Ausentes	Ausentes	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
<i>Eubacteria</i>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	10 ⁹ -10 ¹²
Total de bacterias	1-10 ³	1-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²

Fuentes: (UDLAP, 2010, web 9).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

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

6.1 Adquisición de las muestras

Las muestras (frutas) que se utilizaron en la investigación fueron adquiridas en el mes de agosto 2009. La adquisición de uva roja globo, manzana red delicious y ciruela roja fue en una empresa de supermercado.

6.2 Adaptación de reactores de anaerobiosis

Se adaptaron tres tipos de reactores anaeróbicos; frascos de vidrio con las siguientes capacidades de 275 mL, 2 L y 3 L. Se emplearon las tapas de aluminio de cada frasco, las cuales fueron perforadas y posteriormente se les colocaron tapones de plástico. Finalmente fueron sellados herméticamente utilizando silicón, para garantizar la anaerobiosis de los cultivos.

Etapa I: Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos provenientes de frutas (uva, manzana y ciruela)

6.3 Procesamiento de las muestras

Se utilizó tres tipos de frutas que son de uva roja globo, manzana red delicious y ciruela roja.

El ensilado se llevó a cabo mediante la disminución de tamaño de partícula de las frutas.

6.3.1 *Microsilos*

Se colocaron las frutas en frascos en condiciones de anaerobiosis. Para realizar la anaerobiosis se inyectó nitrógeno al frasco por 3 minutos para desplazar el oxígeno presente (figura 1). Posteriormente los microsilos fueron incubados (incubadora marca Shel Lab) a 37 °C durante 7 días.



Fig. 1 Ensilado de frutas

6.4 Tratamiento de los ensilados de frutas

6.4.1 *Determinación del pH en los ensilados de las muestras*

Durante el ensilaje se midió el pH a cada una de las muestras mediante una tira reactiva (HACH), o bien con el uso de un potenciómetro (HACH SensION 3), calibrado con una solución buffer pH 4.0, 7.0 y 10.0; durante los 7 días de incubación.

6.4.2 *Temperatura*

Los microsilos fueron incubados (incubadora marca Shel Lab) a 37 °C durante 7 días.

6.4.3 *Humedad*

La humedad de las muestras es determinada por la variedad de cada fruta, la uva roja globo con 90% del total del peso, manzana red delicious con 80% del total del peso y la ciruela roja con un 75% del total del peso; dentro de los microsilos y durante los 7 días de incubación fue mayor o igual a 75% de la concentración inicial de cada fruta.

6.5 Medios de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo selectivo para crecimiento de microorganismos probióticos De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) en presentaciones de Agar y Caldo (figura 2).

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

De caldo MRS se disolvió 51 g en 1 L de agua destilada y se añadió 1 mL de Tween 80 (Fluka n° 93.780). Esterilizado en autoclave (HACH) a 121 °C durante 15 minutos.



Fig. 2 Medios de cultivo MRS

6.5.1 Condiciones de cultivo

Las bacterias aisladas se cultivaron en caldo MRS. Los cultivos bacterianos se realizaron en los frascos reactores de 275 mL (figura 3 A) en donde para realizar la anaerobiosis se inyectó nitrógeno al frasco por 3 minutos para desplazar al oxígeno y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sembró el caldo en cajas Petri con agar MRS y se colocó en los frascos reactores de 2 L (figura 3 B), igualmente se realizó la anaerobiosis y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

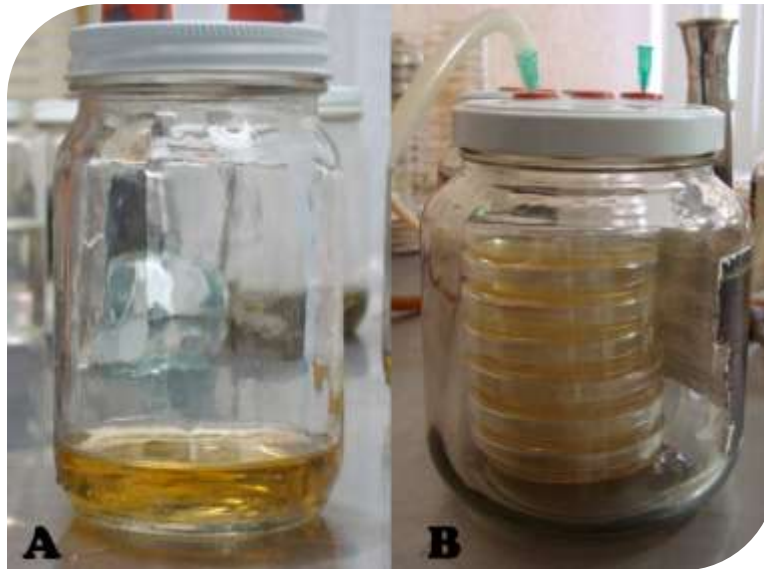


Fig. 3 Medio de cultivo líquido (caldo) y sólido (agar)

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

6.6 Selección e identificación de cepas

De los ensilados de las muestras sembradas se seleccionaron tres cepas.

6.6.1 Purificación por estría

Las cepas seleccionadas se purificaron por estría continua, la cual consiste en tomar una colonia de la siembra del caldo MRS en cajas con agar MRS y esparcirla con el asa de siembra de izquierda a derecha de la caja Petri y de arriba hasta abajo de la caja.

6.6.2 Identificación macroscópica y microscópica (tinción de Gram)

Para la identificación macroscópica, se observó el crecimiento en la caja Petri y se describió la forma de las colonias, el tipo de borde y el color de las colonias seleccionadas. Después de haber purificado las cepas seleccionadas se tomó una colonia con el asa de siembra y se fijó a un portaobjetos para realizarle a cada cepa la tinción con azul de metileno y safranina y finalmente observar al microscopio óptico e identificar su morfología microscópica.

6.6.3 Prueba de catalasa

Después de haber identificado las cepas como Gram + o - se tomó una colonia pura con el asa de siembra y se fijó a un portaobjetos para después añadirles una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) sin mezclarlo, para posteriormente observar la producción de O₂ (en forma de burbujas) y comprobar si producen la enzima catalasa.

6.6.4 Método API (Biomérieux)

El método API 20 A está constituido por galerías, cámaras de incubación, ampollitas API 20 A Medium y hojas de resultados. La galería API 20 A (figura 4) incluye 20 micro-tubos que contienen substratos deshidratados: L-triptófano, urea, D-glucosa, D-manitol, D-lactosa (origen bovino), D-sacarosa, D-maltosa, salicina, D-xilosa, L-arabinosa, gelatina (origen bovino), esculina citrato férrico, glicerol, D-celobiosa, D-manosa, D-melecitosa, D-rafinosa, D-sorbitol, L-rhamnosa y D-trehalosa.



Fig. 4 Galería API 20 A

Los micro-tubos son inoculados con la suspensión de las ampolletas API 20 A Medium (figura 5) con las células bacterianas de las dos cepas aisladas. Las ampolletas API 20 A Medium contienen: tripticasa, extracto de levadura, cloruro sódico, L-triptófano, L-cistina, hemina (origen porcino), vitamina K₁, sulfito sódico y agua desmineralizada.



Fig. 5 Ampolleta de API 20 A Medium

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o provocados mediante la adición de la suspensión con las células bacterianas. La interpretación de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación y el reconocimiento se consigue mediante el software de identificación (API web).

6.6.4.1 Preparación del inoculó

Se abrió una ampolleta de API 20 A Medium, con un asa bacteriológica, se extrajeron todas las colonias obtenidas sobre el medio MRS sólido. Se utilizó cultivos puros y jóvenes (18 - 24 horas), se suspendió las células bacterianas sosteniendo la ampolla verticalmente y emulsionando las células frotando el asa contra la pared de la ampolla mientras se mantiene dentro del medio de suspensión hasta obtener turbidez.

6.6.4.2 Preparación de las galerías

Se toman las cámaras de incubación, se le esparció agua destilada (aproximadamente 5 mL) al fondo de la cámara que contiene alveolos para crear una atmosfera húmeda. La referencia de las cepas se inscribe en la lengüeta lateral de la cámara.

Se sacó la galería y se depositó en la cámara de incubación, con una pipeta estéril, se inoculó la galería con la suspensión del API 20 A Medium preparada, evitando la formación de burbujas en los micro-tubos (para el test GEL se llenó el tubo y la cúpula, para el test IND, solamente se llenó el tubo con API 20 A Medium y la cúpula con aceite de parafina), se cerró la cámara de incubación y se incubó en un frasco reactor dentro de una incubadora a 37 °C por 48 horas.

Etapa III: Estudio del efecto probiótico de las cepas aisladas de frutas (uva, manzana y ciruela)

6.7 Resistencia de las cepas aisladas a bajo pH

Las cepas seleccionadas se cultivan en caldo MRS a pH de 6.5 incubadas a 37 °C durante 24 horas. Del caldo a pH 6.5 se tomó 0.1 mL y se inoculó en otro medio

líquido de 20 mL a pH 2.5, 3 y 4 acidificado con HCl 2.2 normal y se incubaron a 37 °C por 24 horas en anaerobiosis.

6.8 Capacidad de crecimiento de las cepas aisladas a altas temperaturas

Las cepas aisladas se cultivan en caldo MRS a pH del medio (6.5) incubadas a 40, 50 y 60 °C durante 24 horas en anaerobiosis.

6.9 Selección de las cepas aisladas con capacidad de coagulación de la leche

Se tomó 10 mL de leche entera (Lala) estéril a pH 6.4, la cual fue inoculada con 0.1 mL de las cepas de frutas que se encontraban en caldo MRS, se incubaron a 37 °C sin agitación durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se observó la coagulación o no de la leche.

6.10 Crecimiento en medios hostiles

Las cepas se cultivaron en caldo MRS a pH 3 acidificado con HCl 2.2 normal, también en caldo verde brillante para la prueba bilis de buey 0.20%. Se incubaron en los reactores de 275 mL a 37 °C sin agitación durante 24 horas en anaerobiosis.

6.11 Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas aisladas

Cada una de las cepas aisladas se cultivó en caldo MRS a 37 °C en anaerobiosis por 24 horas en los reactores de 275 mL. Transcurrido el tiempo se sembraron microorganismos patógenos (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*) del banco de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila en agar nutritivo.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión en agar utilizando discos de papel filtro con un diámetro de 1 cm impregnados con el caldo que contenía las cepas aisladas, colocando los discos sobre la siembra de patógenos y se incubaron a 37 °C en reactores de anaerobiosis por 24 horas.

6.12 Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos

Cada cepa aislada se cultivó en caldo MRS incubadas a 37 °C en anaerobiosis por 24 horas. Se prepararon los antibióticos (Bencilpenicilina 600 µL/mL, Ampicilina 0.5 mg/mL, Tetraciclina 0.25 mg/mL y Trimetropim-sulfametaxol 0.16/0.8 mg/mL) en diluciones 10^3 .

Después de transcurrido el tiempo se sembraron las cepas en cajas Petri con agar MRS, se utilizó la técnica de difusión en agar utilizando discos de papel filtro con un diámetro de 1 cm impregnados con las diluciones de los antibióticos, colocando los discos sobre la siembra de las cepas y se incubaron a 37 °C en reactores de anaerobiosis por 24 horas.

6.13 Estabilidad en el paso por el estomago

Se preparó medio de cultivo MRS líquido a pH 2.5 acidificado con ácido acético, para evaluar la viabilidad se sometieron las cepas a este medio por 4 horas, confirmando la viabilidad con el crecimiento de las cepas en medio sólido MRS, para lo cual se incubaron a 37 °C en reactores de anaerobiosis por 24 horas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Procesamiento de las muestras

La fermentación en el ensilado es mediante la acción de bacterias lácticas por lo que se debe tener un control en el tamaño del triturado y pH. La reducción de tamaño de las muestras fue del tamaño estándar de las respectivas frutas a cubos de 2 cm x 2 cm.

7.2 Tratamiento de los ensilados de frutas

7.2.1 *Determinación del pH en los ensilados de las muestras*

Durante el proceso se llevó un control de pH en los ensilados. La composición de las frutas incluye altas concentraciones de carbohidratos por lo que la fermentación es rápida y por ende la disminución de pH. Se midió el descenso en el pH de cada uno de los ensilados durante los 7 días de incubación (figura 6).

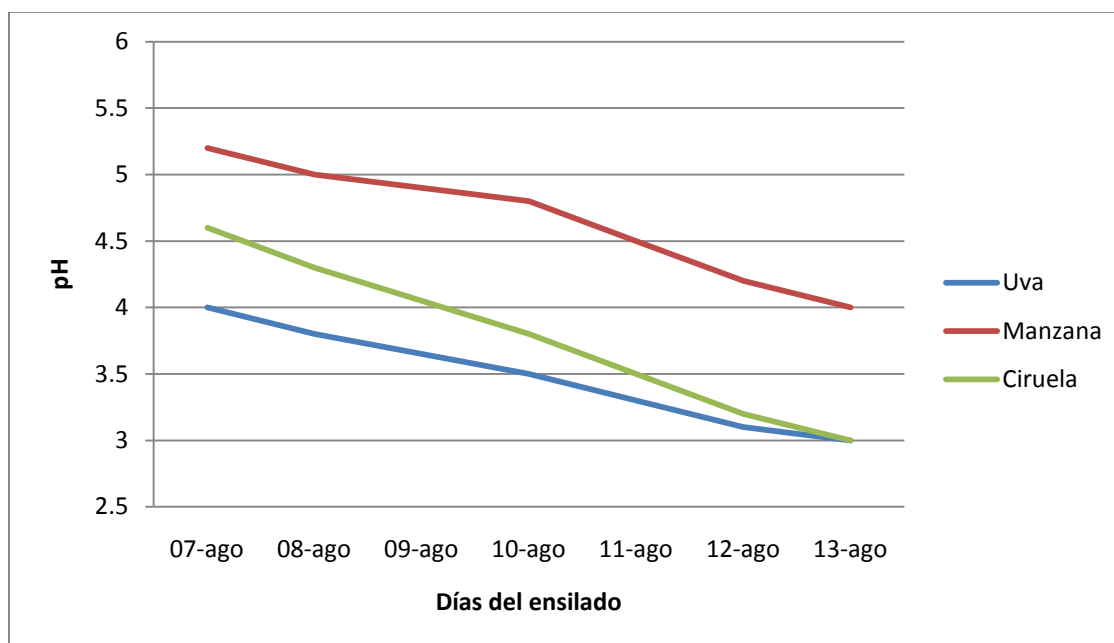


Fig. 6 Descenso de pH en los ensilados.

Los resultados muestran como el ensilado de la uva descendió de un pH de 4 a 3, el de manzana de 5.2 a 4 y el de ciruela de 4.6 a 3. La concentración de acides fue el parámetro de referencia para saber que existía crecimiento microbiano.

7.3 Selección e identificación de las cepas

En la selección de cepas se observó la morfología macroscópica y microscópica de las bacterias a ser aisladas.

7.3.1 Identificación macroscópica

Inicialmente se tenían 3 colonias bacterianas de las cuales se seleccionaron y aislaron 2 después de las observaciones, descartando las colonias Gram negativas. Las cepas seleccionadas fueron, una colonia de Bacilos y una colonia de Cocos las cuales si presentaron morfología Gram positiva. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante los códigos presentados en el cuadro 5.

Cuadro 5. Identificación de las cepas aisladas

Tipo de muestra	Procedencia	Código	Tinción de Gram
Uva	Supermercado	<i>U</i>	–
Manzana	Supermercado	<i>M</i>	+
Ciruela	Supermercado	<i>C</i>	+

En la figura 7 se observan la morfología macroscópica de las cepas seleccionadas *U*, *M*, *C* (X, Y, Z) de las cuales se aislaron las dos cepas *M* y *C* (Y, Z).



Fig. 7 Morfología macroscópica cepa *U*, *M*, *C* (X, Y, Z)

La morfología macroscópica de las cepas aisladas se describe en el cuadro 6. Las dos cepas aisladas (*M* y *C*) presentaron morfología similar (tamaño, forma, borde, elevación y color).

Cuadro 6. Descripción morfológica macroscópica de las cepas aisladas

Cepa	Tamaño	Forma	Borde	Elevación	Olor	Color
<i>U</i>	Pequeñas 2 mm	Circular	Liso	Convexa	Alcohol	Blanco
<i>M</i>	Grandes 5 mm	Circular	Liso	Convexa	Sacarosa	Blanco
<i>C</i>	Grandes 5 mm	Circular	Liso	Convexa	Ácido acético	Blanco

7.3.2 Identificación microscópica (tinción de Gram)

En las figuras 8 y 9 se observan la morfología microscópica de las cepas aisladas *M* y *C* de las que su morfología es de Cocos y Bacilos las cuales son Gram positivas. La cepa aislada que presenta en su morfología la forma de Cocos (*M*), se observa que son diplococos y de color azul-purpura por su membrana más gruesa y más compacta que dependen del contenido de peptidoglicanos que participan en entrecruzamientos en la pared celular del microorganismos y por lo tanto el color cristal violeta queda adherido a los ácidos lipoteicoicos dándoles su coloración distintiva Gram positiva.

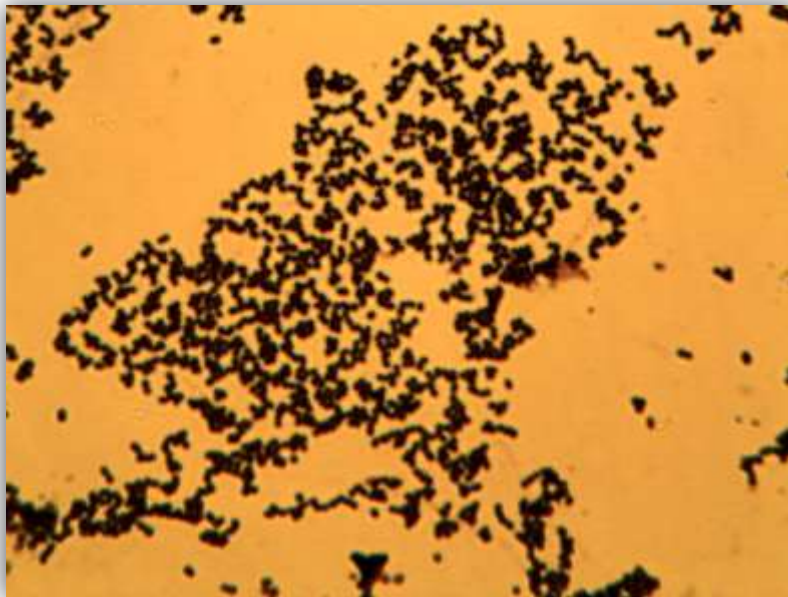


Fig. 8 Morfología microscópica cepa *M*

La cepa aislada con morfología de Bacilos (*C*), muestra que son cortos, delgados y sin agrupación consistente, tomando un color azul-purpura por su membrana con

alto contenido de peptidoglicanos que forman monocapas (1nm) que participan en entrecruzamientos en la pared celular del microorganismos y por lo tanto absorben el colorante azul violeta distintiva de las bacterias Gram positivas.



Fig. 9 Morfología microscópica cepa C

La cepa *U* fue descartada debido a que presento contaminación con levaduras (figura 10). Además que esta cepa presento en su morfología la forma de Bacilos, cortos, delgados y siendo de color rojo (Gram negativos) por su membrana que esta formada por una sola capa de peptodoglicano y rodeada por una pared celular compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas por lo que no retiene el cristal violeta y si conserva el colorante rojo (safranina) distintivo de las bacterias Gram negativas.

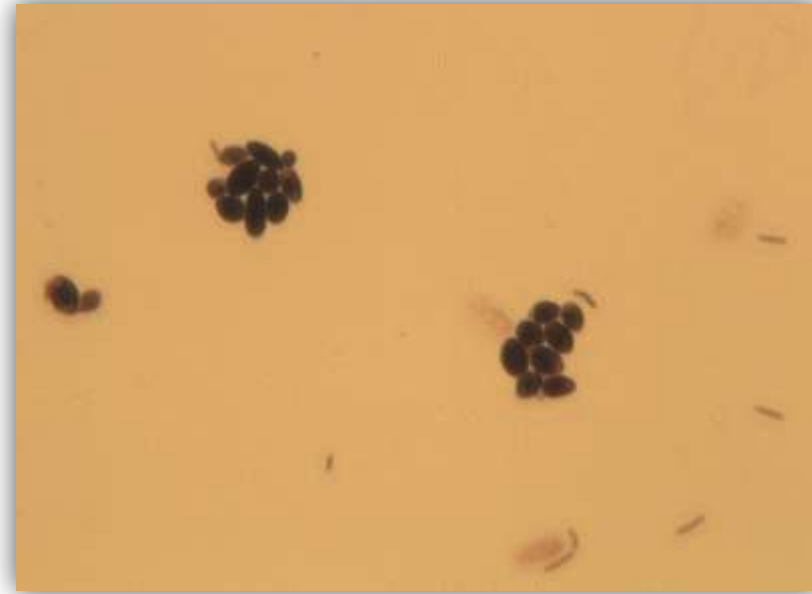


Fig. 10 Morfología microscópica cepa *U*

Por lo tanto, en la búsqueda de los microorganismos con características de probióticos, se aislaron dos cepas, una que proviene del microsilo de manzana (cepa *M*) y la otra cepa que cumplió con las características proviene del microsilo de ciruela (cepa *C*).

7.4 Identificación mediante pruebas bioquímicas

7.4.1 Prueba de catalasa

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos; el enzima descompone peróxido de hidrógeno desprendiendo oxígeno. Se considera una reacción positiva (+) cuando se observa desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno) y negativa cuando hay ausencia de estas burbujas (-) (Galeón, 2010, web 2).

El cuadro 7 presenta los resultados de la prueba de catalasa en las dos cepas aisladas (M y C), las cuales no poseen citocromo, por lo que se les considera bacterias anaeróbicas y por lo tanto pueden tener la capacidad probiótica.

Cuadro 7. Prueba de catalasa de las cepas aisladas

Cepa	M	C
Resultado	-	-

+ Desprendimiento de O₂, - Ausencia de O₂

La ausencia de la enzima catalasa demuestra que las cepas aisladas son bacterias anaerobias, por lo que podrían estar entre las bacterias probióticas. Los resultados obtenidos coinciden con los resultados mostrados por cepas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* (Rondón, et al., 2008).

7.4.2 Prueba mediante el sistema API

La prueba bioquímica para identificar el genero y la especie de las cepas, se realizó por medio del sistema API 20 A.

El sistema API 20 A permite estudiar rápida y fácilmente 21 caracteres destinados a la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias. Este sistema consta de 20 galerías que reaccionan por fermentación, durante la incubación de la galería las reacciones cambian el color y el pH de cada una (prueba positiva), de no reaccionar la prueba es negativa. Para conocer la identificación del microorganismo se consulta el perfil de acuerdo a los resultados de la prueba, es característico para cada bacteria.

El cuadro 8 muestra las reacciones de las 20 galerías del API 20 A de las dos cepas aisladas. Ninguna de las cepas aisladas fue identificada en el género de un probiótico, utilizando este sistema. Por lo que se recomienda realizar otros estudios para conocer el género de estas dos cepas.

Cuadro 8. Identificación de las cepas aisladas por el sistema API 20 A

Componentes Activos	Cepa M	Cepa C
IND	–	–
URE	–	–
GLU	+	+
MAN	+	+
LAC	+	+
SAC	+	+
MAL	+	+
SAL	+	+
XYL	+	–
ARA	+	+
GEL	+	–
ESC	+	+
GLY	–	–
CEL	+	+
MNE	+	+
MLZ	+	+
RAF	–	–
SOR	+	–
RHA	–	–
TRE	+	+

+ Positivo, - Negativo

En las figuras 11 y 12 se observan los cambios de color en las galerías de las cepas aisladas (M y C). En la galería de la cepa *M* se presentaron cambios de color en D-glucosa, D-manitol, D-lactosa, D-sacarosa, D-maltosa, salicina, D-xilosa, L-arabinosa, gelatina, esculina citrato férrico, D-celobiosa, D-manosa, D-melecitosa, D-sorbitol y D-trehalosa que fueron fermentados por la cepa *M* y difieren con los cambios presentados en la galería de la cepa *C*.



Fig. 11 Galería API 20 A cepa *M*

En las figuras 12 se observa claramente que las cepas son diferentes en su metabolismo debido a que existen pruebas en las cuales se presenta un negativo como en el micro-tubo del D-xilosa y D-sorbitol que no fueron fermentados por esta cepa y en la cepa anterior es positivo. Además se observa que ninguna de las dos cepas fue capaz de fermentar L-triptófano, urea, glicerol, D-rafinosa y L-rhamnosa.



Fig. 12 Galería API 20 A cepa *C*

7.5 Resistencia de las cepas aisladas a bajo pH

Las cepas aisladas deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal, asegurar su estabilidad a pH ácidos y a las sales biliares. Los microorganismos aislados sobrevivieron a pH ácidos de 2.5, 3 y 4, los resultados de muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Resistencia de las cepas aisladas a pH ácidos

pH	Cepa <i>M</i>	Cepa <i>C</i>
2.5	+	+
3	+	+
4	+	+

+ Crecimiento, - Sin crecimiento

Las cepas evaluadas (*M* y *C*) fueron capaces de resistir y crecer en bajos pHs. La resistencia a bajos valores de pH es de gran importancia en la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal, por lo que se les considera como posibles cepas probióticas.

7.6 Capacidad de crecimiento de las cepas aisladas a altas temperaturas

Los microorganismos se clasifican de acuerdo a las temperaturas óptimas de crecimiento, en termófilos que se desarrollan entre 25° y 80° C, mesófilos que se desarrollan entre 10° y 45° C y psicrófilos que se desarrollan entre -5° y 30° C por lo que es necesario identificar las dos cepas aisladas de acuerdo a la capacidad de crecimiento a temperaturas de 40°, 50° y 60° C.

En el cuadro 10 se muestra el crecimiento de las cepas *M* y *C* a temperaturas de 40°, 50° y 60° C.

Las bacterias probióticas aumentan su población de 37° a 45° C por lo que son considerados microorganismos mesófilos. Las bacterias ácido lácticas por otro lado crecen a temperaturas de 50° a 70° C.

Cuadro 10. Crecimiento de las cepas aisladas a altas temperaturas

Temperatura (°C)	Cepa <i>M</i>	Cepa <i>C</i>
40	+	+
50	+	+
60	+	+

+ Crecimiento, - Sin crecimiento

Esta prueba demostró que las cepas *M* y *C* son microorganismos termófilos ya que resistieron temperaturas de 40°, 50° y 60° C, por lo que se pueden utilizar en la elaboración de alimentos fermentados o no fermentados. Las cepas probióticas deben cumplir con la supervivencia en medios hostiles.

7.7 Selección de las cepas aisladas con capacidad de coagulación de la leche

Los microorganismos en los alimentos fermentados y elaboración de quesos deben coagular la leche para ser utilizados posiblemente como probióticos. La figura 13 muestra la coagulación completa de la leche después de incubar por 24 hrs con las cepas *M* (A) y *C* (B).

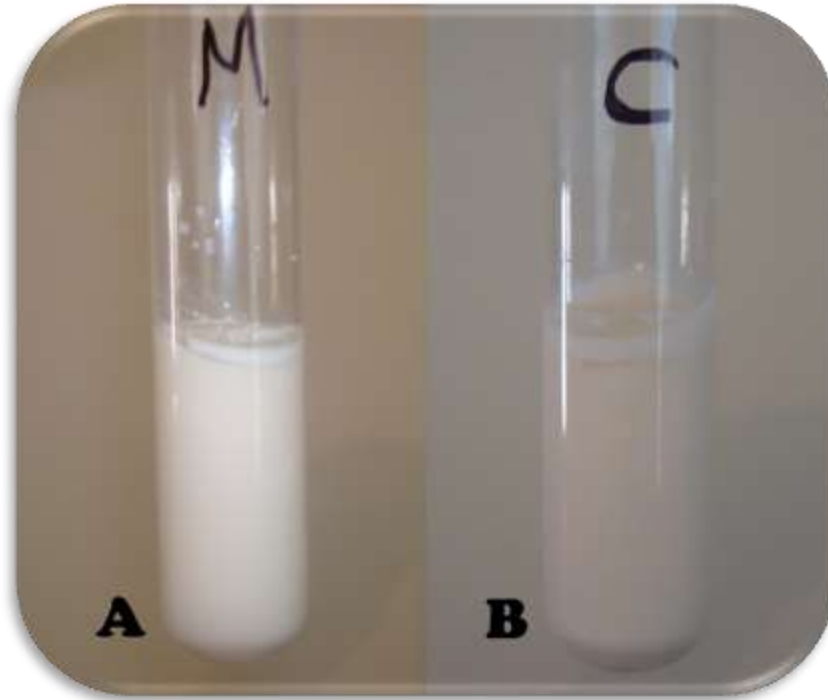


Fig. 13 Coagulación de la leche de las cepas aisladas *M* y *C*

La presencia de las cepas *M* y *C* en la leche, modifican sus propiedades físico-químicas, sensoriales y de textura; se puede observar que las cepas fermentaron la lactosa y produjeron ácido láctico dando como resultado la coagulación de la leche, como la fermentación se llevó a cabo en tubos de ensayo y sin agitación se obtuvo una coagulación de consistencia sólida o firme; la coagulación de la cepa *M* tuvo una producción de ésteres por su aroma dulce mientras que la cepa *C* tuvo una considerable producción de acetaldehído o de aldehídos (productos secundarios de la fermentación) por su aroma ácido.

7.8 Crecimiento en medios hostiles

La mejor actividad de los microorganismos probióticos es en el tracto gastrointestinal, por lo que es necesario que las cepas aisladas sean capaces de sobrevivir al paso por el ácido del estómago, resistir los ácidos biliares del intestino delgado y que logren colonizar para ser consideradas probióticos.

7.8.1 Crecimiento en bilis de buey

El cuadro 11 muestra el crecimiento en medios hostiles de las cepas aisladas *M* y *C* a 0.20% de bilis de buey en caldo verde brillante.

Cuadro 11. Crecimiento de las cepas aisladas en medios hostiles

	Cepa <i>M</i>	Cepa <i>C</i>
Medios hostiles	+	+

+ Crecimiento, - Sin crecimiento

Se pudo constatar que la resistencia de las dos cepas aisladas (*M* y *C*) a la bilis fue buena, aún en presencia del 0.2% de bilis como condición extrema se obtuvieron microorganismos viables. Lo cual evidencia que ambas cepas fueron capaces de crecer en presencia de concentraciones biliarias similares a las que se pueden encontrar en el intestino humano.

7.8.2 Crecimiento a pH 3

En la figura 14 se observa la cepa aislada *M* sobreviviente a un medio de cultivo a pH 3, conservando su morfología inicial de diplococos, Gram positivos.



Fig. 14 Morfología microscópica cepa *M* en medio a pH 3

En la figura 15 se observa la cepa aislada *C* sobreviviente a un medio de cultivo a pH 3, conservando su morfología inicial de Bacilos cortos y delgados, Gram positivos.

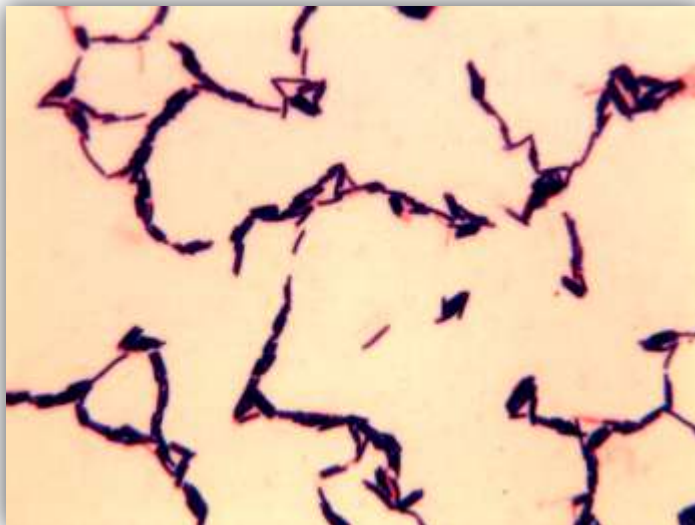


Fig. 15 Morfología microscópica cepa *C* en medio a pH 3

La tolerancia a pHs bajos de las cepas *M* y *C* demostró que son capaces de sobrevivir en condiciones similares a las existentes en el estómago de seres humanos teniendo microorganismos viables a pH 3. Con este resultado se confirmó además la ácido-tolerancia de estas cepas, que es una de las características comunes entre los microorganismos del género *Lactobacillus*.

7.9 Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas aisladas

Cada una de las cepas aisladas (*M* y *C*) se pusieron a prueba contra microorganismos patógenos (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*) para probar su capacidad de inhibición. De esta prueba resultó que las cepas no mostraron actividad antimicrobiana.

En la figura 16 se muestra el halo de inhibición (alrededor de los discos de papel filtro) que debió aparecer si las cepas aisladas presentaran actividad antimicrobiana.



Fig. 16 Halo de inhibición presente en la actividad antimicrobiana
(Zapata, *et al.*, 2009)

La determinación de la acción inhibitoria frente a bacterias patógenas, es importante porque pueden sustituir las terapias con antibióticos como un método menos agresivo y acercaría aún más a las cepas *M* y *C* a las características de un probiótico.

7.10 Sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos

Otra propiedad de las bacterias probióticas es resistir a los antibióticos, que son con frecuencia consumidos por las personas con problemas digestivos y que no solo afectan a los microorganismos patógenos sino también a la flora intestinal del huésped.

Se probó la sensibilidad de las cepas aisladas (*M* y *C*) a cuatro antibióticos normalmente usados en tratamientos contra patógenos. Los antibióticos usados fueron Bencilpenicilina, Ampicilina, Tetraciclina y Trimetropim-sulfametaxol en diluciones 10^3 . Los resultados se observan en el cuadro 12 los cuales no fueron satisfactorios ya que las dos cepas fueron sensibles a las diluciones de los antibióticos.

Cuadro 12. Sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos diluidos

Antibióticos	Dilución 10^3	Cepa <i>M</i>	Cepa <i>C</i>
Bencilpenicilina	600 μ L/mL	–	–
Ampicilina	0.5 mg/mL	–	–
Tetraciclina	0.25 mg/mL	–	–
Trimetropim-sulfametaxol	0.16/0.8 mg/mL	–	–

+ Sin sensibilidad, - Sensibles

7.11 Estabilidad en el paso por el estómago y resistencia a sales biliares

En la prueba de paso por el estómago la estabilidad de las cepas aisladas (*M* y *C*) se percibió por el crecimiento de estas a pH de 2.5 por 4 horas que representa el pH y la digestión del estómago humano (cuadro 13). Por esto pueden ser consideradas probables probióticos ya que pasando el estómago podrían colonizar el tracto gastrointestinal inferior.

A estos microorganismos también se les midió su estabilidad a las sales biliares (cuadro 13) en medios de caldo verde brillante, durante 4 horas.

Cuadro 13. Estabilidad en el paso por el estómago y resistencia a sales biliares

	Cepa <i>M</i>	Cepa <i>C</i>
Paso por el estomago	+	+
Sales biliares	+	+

+ Resistentes, - No resistentes

Las cepas aisladas (*M* y *C*) fueron sometidas a una simulación de la barrera gástrica combinando las condiciones de pH y sales biliares, en las cuales mostraron ser resistentes. Cabe destacar, que el resultado es aceptable, ya que la viabilidad de las cepas *M* y *C* bajo estas condiciones se mantuvo.

A partir de estos resultados puede esperarse que ambas cepas al ser ingeridas, puedan soportar la barrera del pH gástrico del ser humano y pasar al intestino para su posible implantación.

7.12 Discusiones

La microbiota del tracto gastrointestinal está regulada por diversos factores, interacción entre microorganismos, enzimas gástricas y pancreáticas, pH, movimientos peristálticos y sales biliares. La capacidad de tolerancia a pH y sales biliares es un criterio de selección y un requisito indispensable para que los microorganismos puedan desarrollar sus efectos benéficos en el intestino.

En este trabajo se estudiaron las propiedades probióticas de 3 cepas aisladas de uva, manzana y ciruela. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas estudiadas, exceptuando la cepa C, mantienen su viabilidad a valores de hasta pH 2.5, demostrando mayor capacidad para tolerar bajos valores de pH. En consecuencia, estas características hacen posible que sobrevivan durante su paso por el estómago, llegando al intestino en cantidades adecuadas para ejercer actividades benéficas.

La tolerancia a sales biliares es una importante característica que les permite sobrevivir y duplicarse en el intestino delgado. En las 2 cepas estudiadas la población no se alteró en presencia del inhibidor. La bilis actúa sobre la membrana plasmática alterando su permeabilidad y provocando, en el caso de cepas sensibles la lisis celular. Sin embargo en el caso de cepas resistentes como las estudiadas, puede facilitar el transporte de sustratos y favorecer el ingreso de nutrientes.

Las cepas de manzana y ciruela no presentaron actividad antagónica contra microorganismos patógenos comparables con las cepas comerciales. Este fenómeno resulta de interés desde el punto de vista sanitario debido a que los microorganismos probióticos como los lactobacilos constituyen un mecanismo natural para controlar la posible contaminación de los alimentos con microorganismos potencialmente peligrosos.

De las 2 cepas estudiadas, las dos presentaron actividad de fosfo-b-galactosidasa, fermentando la lactosa. En estos casos la lactosa se acumula en el citosol como lactosa-6-fosfato, sustrato específico de la fosfo-b-galactosidasa. Las 2 cepas desarrollaron actividades de b-gal comparables con las cepas comerciales. En consecuencia, los resultados obtenidos nos permiten considerar el potencial uso de las cepas aisladas para fermentar o formar parte de la flora acompañante de productos lácteos destinados a humanos.

En la prueba de Inhibición contra microorganismos patógenos y sensibilidad a antibióticos demostró que las cepas aisladas no presentaron resistencia a ninguna de las bacterias patógenas (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*) ni a ninguno de los antibióticos utilizados (Bencilpenicilina, Ampicilina, Tetraciclina y Trimetropim-sulfametaxol). Lo anterior permite recomendar más estudios para evidenciar su uso como alternativa a antibióticos en humanos o animales.

La capacidad de crecimiento de las cepas aisladas en el presente estudio alcanzó valores favorables, propiedad que debe caracterizar a las cepas probióticas, ya que deben presentarse en cantidades suficientes para llegar al tracto gastrointestinal, resistir los impedimentos químicos que aquí se presentan y ser capaces de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa intestinal.

Los microorganismos no necesitan cumplir con todos los criterios de selección ensayados, en consecuencia las restantes cepas podrían ser sometidas a posteriores pruebas con el objeto de estudiar propiedades adicionales no contempladas en este estudio.

8. Conclusiones

- Se aislaron dos cepas una de Cocos Gram positivos (*M*) y otra de Bacilos Gram positivos (*C*) de frutas (manzana y ciruela), ambas catalasa negativas.
- Las bacterias no fueron identificadas de acuerdo a su perfil de fermentación de carbohidratos (sistema API 20 A), de 1 a 4% de efectividad en la identificación dando un perfil no válido.
- Las cepas aisladas resultaron ser sensibles a la acción de antibióticos por lo que se concluye que no podrían ser utilizadas en combinación con estos antibióticos.
- Las cepas aisladas no presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas, por lo que es necesario llevar a cabo evaluaciones en microorganismos patógenos diferentes para que puedan ejercer un buen efecto probiótico.

Como resultado de las pruebas realizadas, se demuestra que las cepas *M* y *C*, poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probióticos: resistencia a las principales barreras químicas del tránsito gastrointestinal (pH ácido y sales biliares), las dos con una alta capacidad de crecimiento y producción de ácido láctico.

9. Bibliografía

Alonso JL., Garrote G., Domínguez H., Santos V. y Paraj JC. (2009). Ácido láctico de pulpa de manzana: un experimento de laboratorio para la enseñanza de la valorización de los residuos. *CyTA Journal of food*. Vol. 7. n° 2. p. 83-88.

Borrueal Sainz, Natalia. (2005). Interacciones de las bacterias de la flora con el sistema inmune intestinal. Presentada en la Universidad Autónoma de Barcelona para obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía. p. 10-38.

Bosques Padilla, F.J. y col. (2005). Tratamiento de la encefalopatía hepática con probióticos y prebióticos. *Revista de Gastroenterología México*. Vol. 70. n°. 3. p. 372-374.

Castro Bact, Luz A. y M.D. De Rovetto, Consuelo. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*. Vol. 37. n°. 4. p. 308-314

Charles, Alais. (1970). *Ciencia de la leche, Principios de técnica lechera*. CECSA. p. 227-268.

Ferrer Lorente, B. y Dalmau Serra, J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*. Vol. 59. n° 3. p. 150-155.

González Rivas, Fabián y González Martínez, Elena E. (2006). Criterios de Calidad de los Microorganismos Probióticos y Evidencias Sobre Efectos Hipocolesterolémicos. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*. Vol. 7. n° 1. p. 160-169.

Hernández, Alicia. (2003). *Microbiología Industrial*. Editorial Euned. p. 166.

Kayouli, Chedly y Stephen, Lee. (1998). Silage from by-products for smallholders. *Manual of Smallholder Milk Production in the South Pacific*. p. 67-101.

Martínez Álvarez, Jesús R., De Arpe Muñoz, Carlos, Urrialde de Andrés, Rafael, Fontecha, Javier, Murcia Tomás, María A., Gómez Candela, Carmen, Villarino

Marín, Antonio. (2003). Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Nueva Imprenta. p. 73-83.

Martínez López, Marta, Pacho Jiménez, Sonsoles y Vicario González, Susana. (2007). Probióticos: Potencial para prevenir y curar. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV). Vol. 1. n° 2. p. 573-583.

Mendoza Amatller, Alfredo, Paulsen Sandi, Kurt y Gorena Antezana, Samara. (2004). Probióticos en pediatría. Revista de la sociedad Boliviana de pediatría. Vol. 43. n° 2. p. 104-106.

Mennickent, Sigrid y Green, Karina. (2009). Los probióticos y su utilidad terapéutica. Ciencia Ahora. Vol. 12. n° 24. p. 31-33.

Phillips, Melissa Lee. (2009). Reacción visceral: Efectos ambientales sobre la microbiota humana. Salud Pública de México. Vol. 51. n° 4. p. 343-352.

Portilla Rivera Oscar M., Moldes Ana B., Torrado Ana M. y Domínguez José M. (2007). Ácido láctico y la producción de mosto de uva destilada biosurfactantes hidrolizado orujo. Proceso de Bioquímica. Vol. 42. n° 6. p. 1010-1020.

Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milian, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M. y Pérez M. (2008). Aislamiento, Identificación y Caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* Procedentes del tracto gastrointestinal de Pollos de Ceba. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 6. n° 001. p. 56-63.

Young-Soon Kim, Kim Yoon Sook, Yeong Kim Seong, Hyun Jong Whang y Joo Hyung Suh. (2008). Aplicación de omija (*Schiandra chinensis*) y ciruela (*Prunus mume*) los extractos para el mejoramiento de la calidad *Kimchi*. Control de los Alimentos. Vol. 19. n° 7. p. 662-669.

Zamora Rodríguez, Lucero M. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Girona. p. 37-38.

Zapata Sandra, Muñoz Juliana, Ruiz Orlando S., Montoya Olga I., Gutiérrez Pablo A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 16. n° 1. p. 75-82.

9.1 World Wide Web

Web 1. CASAPIA (2010). Las bacterias probióticas. Disponible en: <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenus/MenudeInformaciones/ComplementosNutricionales/LosProbioticos.htm> 11/10/2009 17:42 hrs.

Web 2. Galeón (2010). Micro. Disponible en: <http://www.galeon.com/lactobacilo/micro.htm> 07/10/2010 16:25 hrs.

Web 3. HispaNetwork Publicidad y Servicios, S.L. (2010). Glosario. Disponible en: <http://www.glosario.net/busqueda/?D=28&P=ensilaje> 28/02/2010 15:58 hrs.

Web 4. Martínez, Benjamín M. (2008). Alimentos Funcionales: Prebióticos, Probióticos. Disponible en: http://www.celiacosmadrid.org/ALIMENTOS_FUNCIONALES.pdf 18/10/2009 16:18 hrs.

Web 5. Pottí, Daniel (2007). Materias Primas: Leche: Microbiología de la leche (1^{ra} parte). Disponible en: <http://www.mundohelado.com/materiasprimas/leche/laleche-microbiologia.htm> 12/10/2010 21:56 hrs.

Web 6. Thalcave (2009). Bacterias probióticas y alimentos probióticos, la investigación continua. Disponible en: <http://www.accumalaga.es/Todas-las-noticias/Investigacion/Bacterias-probioticas-y-alimentos-probioticos-la-investigacion-continua.html> 11/10/2009 17:46 hrs.

Web 7. TN Relaciones (2010). Microbiología de la leche. Disponible en: http://www.tnrelaciones.com/cm/preguntas_y_respuestas/content/240/3180/es/microbiolog%EDa-de-la-leche.html 12/10/2010 21:28 hrs.

Web 8. Uberos Fernández, José. (2010). Evidencias sobre la utilidad de los probióticos y enfermedades gastrointestinales. Disponible en: <http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/gastro/probioticos.htm> 12/07/2010 19:18 hrs.

Web 9. Universidad de las Américas de Puebla. (2010). Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/santacruz_l_ya/capitulo1.pdf
16/07/2010 15:38 hrs.