



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO (tipo panela)
CON POTENCIAL PROBIÓTICO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

L.Q.A. Nancy Mora Peñaflor

DIRECTOR

Dr. Javier Castro Rosas

ASESORES

Dr. Carlos A. Gómez Aldapa

Dr. Otilio A. Acevedo Sandoval

M. en A. Melitón J. Franco Fernández



Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada: **"Elaboración de queso fresco (tipo panela) con potencial probiótico"**, que desarrolla la Q.A. Nancy Mora Peñaflor.

Asistentes:

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

M. en A. Melitón Jesús Franco Fernández

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la Q.A. Nancy Mora Peñaflor, oportunamente las correcciones adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado.

El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 21 de Octubre del 2014.

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

M. en A. Melitón Jesús Franco Fernández





A Dios y a mi Familia...

Agradecimientos

A Dios, por permitirme vivir, ser fuente de bendiciones y sabiduría, por ser mi confidente, mi guía, por permitirme avanzar y alcanzar mis metas.

A mis padres, por su comprensión, apoyo y por estar siempre a mi lado, sé que cuento con ustedes incondicionalmente.

A ti mamá que me has formado con amor, voluntad y entusiasmo por vivir, servir y disfrutar lo que me gusta hacer, pero sobre todo por creer en mí.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos que con su apoyo ilimitado me transmiten fortaleza y esperanza para creer que mi presente es lo suficientemente bueno sin pedir más, gracias mis niños por robarme siempre una sonrisa.

A mis asesores por el apoyo y la confianza depositada en mí, por sus enseñanzas y tiempo dedicado a este proyecto.

A los doctores que participaron en mi formación, gracias por transmitirme sus conocimientos.

A mis amigos, quienes me ayudaron de una u otra forma, ya sea con sus pláticas, conocimientos, presencia, aliento o preocupación, gracias por compartir tantas cosas dentro y fuera del laboratorio, ellos saben quiénes son, soy tan afortunada de tenerlos, gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación, de todos aprendí algo nuevo, me quedo con un grato recuerdo, gracias por compartir esta experiencia y ser parte de una etapa de mi vida.

A CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Índice

Índice Figuras

Índice Tablas

Resumen

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Definición y origen del queso	3
2.1.1 Clasificación del queso	4
2.1.2 Composición del queso fresco	5
2.1.3 Proceso tecnológico en la elaboración del queso	6
2.1.3.1 Preparación de la leche	6
2.1.3.2 Pruebas de calidad	6
2.1.3.2.1 Sensoriales	6
2.1.3.2.2 Físicoquímicas	6
2.1.3.2.3 Microbiológicos	7
2.1.3.3 Filtración	7
2.1.3.4 Estandarización	8
2.1.3.5 Pasteurización	8
2.1.3.6 Inoculación de cultivos iniciadores	8
2.1.3.7 Coagulación	9
2.1.3.8 Desuerado	10
2.1.3.9 Moldeado	10
2.1.3.10 Salado	10
2.1.3.11 Empaque y almacenaje	11
2.2 Alimentos funcionales con beneficios para el tracto gastrointestinal (TGI)	11
2.2.1 Prebióticos	11
2.2.2 Simbióticos	12
2.2.3 Probióticos	13
2.2.3.1 Microorganismos probióticos	15
2.2.3.2 Mecanismo de acción de los microorganismos probióticos	16
2.2.3.3 Importancia de los probióticos	16

2.2.3.4 Desarrollo de productos lácteos probióticos.....	16
2.2.3.4.1 Yogurt	18
2.2.3.4.2 Queso.....	19
2.3 Bacterias ácido lácticas.....	19
2.3.1 Características generales	20
2.3.2 Metabolismo de azúcares	22
2.3.3 Clasificación y géneros representativos de las BAL.....	26
2.3.3.1 <i>Streptococcus</i>	26
2.3.3.2 <i>Lactococcus</i>	27
2.3.3.3 <i>Enterococcus</i>	28
2.3.3.4 <i>Leuconostoc</i>	28
2.3.3.5 <i>Pediococcus</i>	28
2.3.3.6 <i>Carnobacterium</i>	29
2.3.3.7 <i>Vagococcus</i>	29
2.3.3.8 <i>Tetragenococcus</i>	30
2.3.3.9 <i>Lactobacillus</i>	30
2.3.4 Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas.....	31
2.3.4.1 Ácidos orgánicos	31
2.3.4.1.1 Ácido láctico	31
2.3.4.3 Dióxido de carbono	32
2.3.4.4 Diacetilo	32
2.3.4.5 Bacteriocinas	33
2.4. Microorganismos presentes en los alimentos	34
2.4.1 Microorganismos deterioradores.....	34
2.4.2 Microorganismos patógenos	35
2.4.3 Microorganismos de importancia para la salud pública.....	35
2.4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	35
2.4.3.1.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (<i>E. coli</i> enterohemorrágica).....	35
2.4.3.2 <i>Salmonella</i>	36
2.4.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.4.3.5 <i>Shigella</i>	37
2.5 Comportamiento de bacterias ácido lácticas en quesos.....	37

3. JUSTIFICACIÓN	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo General	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 Material de uso general	42
5.2 Equipo de laboratorio	42
5.3 Reactivos y medios de cultivo	43
5.4 Material biológico	44
5.5 Aislamiento y selección de las cepas	44
5.6 Análisis microbiológico	44
5.6.1 Bacterias ácido lácticas	45
5.6.2 Selección de bacterias ácido lácticas	45
5.6.2.1 Tinción Gram	45
5.6.2.2 Prueba de catalasa	46
5.6.2.3 Prueba de la oxidasa	46
5.7 Evaluación <i>in vitro</i> del potencial probiótico	47
5.7.1 Actividad antimicrobiana	47
5.7.2 Resistencia a pH	48
5.7.3 Resistencia a sales biliares	49
5.7.4 Sensibilidad a antibióticos	50
5.8 Identificación bioquímica	51
5.8.1 Desarrollo a diferente pH	52
5.8.2 Desarrollo a diferente temperatura	52
5.8.3 Desarrollo a diferente concentración de NaCl	52
5.8.4 Producción de CO ₂	52
5.8.5 Prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer (MR-VP)	53
5.8.6 Sobrevivencia a tratamiento térmico	53
5.8.7 Fermentación de azúcares	53
5.9 Identificación molecular	54
5.10 Desarrollo de queso fresco con potencial probiótico	54
5.10.1 Evaluación del potencial antagónico de queso fresco elaborado con la cepa de BAL QT 20.	56

6. Resultados y Discusión	57
6.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	57
6.2 Actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas	59
6.3 Resistencia de las bacterias ácido lácticas a pH.....	64
6.4 Resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares.....	66
6.5 Sensibilidad a antibióticos.....	67
6.6 Identificación Bioquímica de las cepas QT 20.....	77
6.7 Identificación molecular	79
6.8 Evaluación de la viabilidad y comportamiento me microorganismos patógenos en queso fresco con potencial probiótico.....	80
7. Conclusiones	88
8. Referencias	89

Índice Figuras

Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	24
Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	25
Figura 3. Identificación morfológica microscópica de las BAL.	46
Figura 4. Procedimiento para la determinación de actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas frente a patógenos por la técnica de difusión en pozos.	48
Figura 5. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a pH.....	49
Figura 6. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares.....	50
Figura 7. Técnica para la prueba de sensibilidad de bacterias ácido lácticas a antibióticos.	51
Figura 8. Etapas principales en la elaboración de queso fresco con potencial probiótico. 55	
Figura 9. Diagrama de la evaluación del comportamiento de microorganismos patógenos en queso adicionado con la BAL QT 20.	56
Figura 10. Crecimiento típico de BAL en medio de cultivo sólido.	57
Figura 11. Actividad inhibitoria o antagónica de cepas de BAL contra E. coli O157:H7, S. Typhimurium, L. monocytogenes y S. aureus.	62
Figura 12. Sensibilidad de la cepa QT 20 a antibióticos.	69
Figura 13. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de ampicilina 10 µg/mL.	70
Figura 14. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de cloranfenicol 30 µg/mL.	72
Figura 15. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de eritromicina 15 µg/mL.	73
Figura 16. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de tetraciclina 30 µg/mL.....	74
Figura 17. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de kanamicina 30 µg/mL.....	76
Figura 18. Comportamiento de E. coli O157:H7 en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.....	82
Figura 19. Comportamiento de S. Typhimurium en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.....	83
Figura 20. Comportamiento de L. monocytogenes en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.	84
Figura 21. Comportamiento de S. aureus en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.	85

Índice Tablas

Tabla 1. Clasificación de los quesos	5
Tabla 2. Características de un probiótico	14
Tabla 3. Principales microorganismos utilizados como probióticos y su efecto sobre el consumidor.	17
Tabla 4. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas presuntivas BAL aisladas de diversos alimentos	58
Tabla 5. Efecto inhibitorio o antagónico de bacterias ácido lácticas (mm) contra diferentes bacterias patógenas por la técnica de difusión en pozos.	60
Tabla 6. Resistencia /sensibilidad de las bacterias ácido lácticas a 2 niveles de pH evaluados y 3 tiempos de contacto.	65
Tabla 7. Sensibilidad a antibióticos presentada por la BAL QT 20.	68
Tabla 8. Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa QT 20.....	78
Tabla 9. Fermentación de azúcares de la bacteria ácido láctica QT 20.....	79

Resumen

Se aislaron cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) de frutas, hortalizas y productos elaborados artesanalmente. Las cepas se identificaron fenotípicamente mediante pruebas de Gram, catalasa y oxidasa. A todas las BAL se les realizaron pruebas de actividad inhibitoria por difusión en pozo contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. A las cepas de BAL que mostraron el mayor efecto antagónico o inhibitorio contra los 4 patógenos se les realizaron pruebas de resistencia a pH 2 y pH 3, resistencia a sales biliares (concentraciones de 0.15, 0.3, 0.5 y 1 %) y sensibilidad a distintos antibióticos. Se identificó el género y especie de la cepa con mayor potencial probiótico (cepa QT 20) con pruebas bioquímicas y por ribotipificación. Por último, se determinó el potencial antagónico de la cepa QT 20 contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso elaborado con la dicha cepa de BAL.

Se obtuvo un banco de 117 cepas de BAL; de éstas solo el 26.5% mostró actividad inhibitoria al menos contra uno de los microorganismos patógenos estudiados, alcanzando halos de inhibición de hasta 20 mm. La mayoría de cepas de BAL analizadas mostraron resistencia a pH 3, pero fueron sensibles al pH2. Todas las cepas de BAL analizadas mostraron resistencia a una concentración de sales biliares de hasta 1%. El análisis bioquímico y molecular de la cepa QT 20 (cepa con el mayor potencial probiótico) reveló que dicha cepa es del género *Lactobacillus* y de la especie *pentosus*. Y ésta cepa fue sensible al 50% de los antibióticos ensayados. *Lactobacillus pentosus* (cepa QT 20) mostró efecto antagónico significativo contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso fresco almacenado en refrigeración. La cepa de *Lactobacillus pentosus* (cepa QT 20) fue aislada de una muestra de queso tenate el cual es un queso elaborado artesanalmente en el estado de Hidalgo.

Esta cepa de *Lactobacillus pentosus* tiene gran potencial para considerarse como probiótico y podría usarse como tal e incorporarse a alimentos, como los productos lácteos, o bien consumirse directamente como cultivos liofilizados. No obstante, es necesario realizar estudios en animales de laboratorio para comprobar si realmente la cepa de *Lactobacillus pentosus* ejerce dicho efecto.

1. Introducción

Recientemente se ha observado un incremento de los consumidores por las dietas saludables que propicien beneficios en cuanto al tratamiento y la prevención de enfermedades. No obstante, inherente al consumo se asocian enfermedades de origen microbiano. Debido a esto, la comunidad científica y la industria de los alimentos se han visto en la necesidad de desarrollar alimentos funcionales, especialmente productos probióticos que favorezcan la salud de quienes lo consumen en la debida cantidad (Granato *et al.* 2010).

El tracto gastrointestinal es uno de los principales objetivos para el desarrollo de alimentos funcionales. En el intestino existe una flora microbiana, dentro de la que se encuentran las bacterias ácido lácticas que demuestran vivir en simbiosis con el ser humano y su presencia se asocia a un estado saludable, es por esto que se desarrollan alimentos que incentiven la colonización de las bacterias benéficas en los intestinos, como son los probióticos, prebióticos y simbióticos.

Aquellos alimentos que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor se denominan funcionales. Dentro de este grupo de alimentos se incluyen aquellos incorporados con bacterias probióticas, los cuales han demostrado una gran expansión en su producción y popularidad en los últimos años (Sanz *et al.*, 2003).

De acuerdo a estudios recientes para la determinación del potencial probiótico de un microorganismo, este debe cumplir con criterios de clasificación, dependiendo de su posible aplicación, resistencia al tránsito y adhesión a la mucosa intestinal, certificación de inocuidad, actividad antimicrobiana y sensibilidad a antibióticos entre otros (Vanegas *et al.*, 2012).

Los alimentos probióticos contienen microorganismos definidos y viables en concentración suficiente para modificar la microflora del huésped. Se ha establecido que el número mínimo de bacterias probióticas al momento del consumo debe de ser entre 10^6 y 10^7 células viables por mililitro o gramo de producto. Además, estas bacterias probióticas deben tolerar las condiciones ácidas del estómago y sobrevivir

a las enzimas digestivas y sales biliares del intestino delgado, a consecuencia de lo cual están capacitados para colonizar el íleon terminal (De Vuyst, 2000).

Dentro de los probióticos, el género *Lactobacillus* es reconocido por su capacidad de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal y conferir beneficios a la salud como el manejo de diarreas por virus y bacterias patógenas, alergia e intolerancia a la lactosa, etc. (Aureli *et al.*, 2011).

Estas bacterias además de ser reconocidas como GRAS (Generally Recognized as Safe), pueden producir ácido láctico, bacteriocinas y otro tipo de metabolitos con actividad antimicrobiana; se caracterizan además por estar presentes en diferentes tipos de sustratos naturales (Sanz *et al.*, 2003).

Los alimentos comúnmente utilizados para llevar al consumidor los beneficios de los probióticos han sido las leches fermentadas, ya que reúnen una serie de factores que las hacen aptas para tal fin. Sin embargo, el queso podría ser un mejor vehículo para estos microorganismos que los alimentos tradicionalmente empleados por tener una mayor capacidad amortiguadora, un mayor contenido graso y esto favorecería la resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y el tránsito intestinal (Taranto, *et al.*, 2005; Boza, *et al.*, 2010).

Dada la importancia de las bacterias ácido lácticas en la elaboración de alimentos funcionales, el objetivo fue aislar e identificar cepas de bacterias ácido lácticas a partir de diversos alimentos (frutas y hortalizas, pulque y quesos artesanales), conocer su potencial antagónico en medios de cultivo contra diferentes microorganismos patógenos, determinar su resistencia al pH, sales biliares y antibióticos así como determinar su potencial antimicrobiano en queso fresco contra diferentes microorganismos patógenos.

2. Antecedentes

2.1 Definición y origen del queso

Es probable que el queso fuera hecho en primera instancia por accidente, tal vez se obtuvo durante la transportación de la leche en los estómagos de animales y que debido a la acción de enzimas coagulantes convirtieron la leche acidificada en una masa sólida. De esta manera se descubrió que el queso poseía mayor durabilidad que la leche original y así se podían obtener alimentos adecuados para las largas jornadas, en muchas regiones su fabricación ha sido artesanal, pero gracias a su alto valor nutritivo su proceso se ha industrializado (Amiot, 1991).

El origen de la elaboración del queso no se sabe con certeza, pero existen referencias que se consumía desde tiempos bíblicos, en aquel entonces, la coagulación de la leche se conseguía de muchas maneras desde utilizar los cuajos de liebre y cabrito, así como la savia de una rama de higuera y el vinagre, hasta usar la flor de cardo, la semilla de azafrán silvestre, el tomillo y extractos de piña verde (Robinson y Wilbey, 1998).

El término queso se le da a un amplio grupo de productos lácteos elaborados en todo el mundo bajo una amplia variedad de formas, tamaños y sabores. El principal objetivo en la elaboración de estos productos es conservar los principales componentes de la leche. Existe una gran diversidad en la clasificación de los quesos, el más común es aquel que tiene en cuenta la textura que está relacionada directamente con el contenido de humedad y grasa, es así que los podemos encontrar como duros, semiduros y blandos. Algunos otros criterios tienen en cuenta la especie animal de la cual se obtiene la leche, el método de coagulación, el tiempo de maduración, el origen del queso y la flora predominante durante la maduración (Amiot, 1991; Robinson y Wilbey, 1998).

La leche es el componente principal en la elaboración de los quesos, ésta ha sido definida como el producto destinado para el consumo humano proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de los mamíferos sanos y bien alimentados, debe de estar libre de calostro, es de composición compleja, color

blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce, además debe de cumplir con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas. Su finalidad es la alimentación de la cría durante sus primeros meses de vida (Magariños, 2000).

Entre las especies que producen leche utilizada en quesería se encuentran principalmente la de vaca, oveja y cabra. En nuestro país la leche de vaca es la más empleada para la elaboración de este tipo de productos.

2.1.1 Clasificación del queso

El queso fresco pasteurizado es un producto de amplio consumo en todo el mundo, según la NOM-121-SSA-1994 define al queso como el producto elaborado de la cuajada de la leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

Esta norma define al queso fresco como el producto que cumple con lo señalado en la definición anterior y que se caracteriza por ser un producto con alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.

En la tabla 1 se describe la clasificación de los quesos frescos dependiendo su proceso de elaboración.

Tabla 1. Clasificación de los quesos

I	II	III
Frescos	De pasta cocida	Acidificados
Fresco	Oaxaca	Cottage
Panela	Asadero	Crema
Canasto	Mozzarella	Doble crema
Sierra	Del Morral	Petit Suisse
Ranchero	Adobera	Neufchatel
Blanco		
Enchilado		
Adobado		

Fuente: SSA, 1994.

2.1.2 Composición del queso fresco

Durante el proceso de elaboración del queso, los sólidos de la leche son concentrados, ésta concentración se inicia con la formación de una cuajada ácida o enzimática (Early, 1998).

El agua es eliminada en una proporción distinta en cada tipo de queso; es esencial para el desarrollo de los microorganismos, también determina el tiempo de conservación del producto, la textura y el rendimiento durante el proceso de elaboración. La materia grasa es un componente que influye sobre la textura, el sabor, el rendimiento y el color del queso. Las bacterias ácido lácticas utilizan la lactosa como sustrato para la formación del ácido láctico y por lo tanto interviene en la coagulación de la leche, el desuerado y la textura de la cuajada, también en el crecimiento de los microorganismos. Las proteínas del suero que quedan incluidas

en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso y tiene mucha importancia en el proceso de maduración (Amiot, 1991; Alais, 1998).

2.1.3 Proceso tecnológico en la elaboración del queso

2.1.3.1 Preparación de la leche

En la elaboración de los quesos se emplea leche procedente de muchas especies de mamíferos, pero predominantemente se utiliza la leche de vaca. La composición química de la leche determina su comportamiento en la coagulación, el rendimiento quesero y las características de textura y consistencia de la cuajada final (Early, 1998).

La leche está compuesta principalmente de agua, además de proteínas, grasa, carbohidratos y sales, estos compuestos los podemos encontrar en suspensión coloidal, emulsión o solución. La constitución de la leche va a depender de varios factores entre los cuales está la raza del animal, la alimentación, el medio ambiente, la época del año, el periodo de lactancia, entre otros (Alais, 1998; Magariños, 2000).

2.1.3.2 Pruebas de calidad

2.1.3.2.1 Sensoriales

La leche debe ser de un color blanco y opaco con un ligero tono amarillo, de olor característico suave, debe tener aspecto homogéneo libre de materiales extraños (Alais, 1998).

2.1.3.2.2 Fisicoquímicas

La densidad es un parámetro importante a medir en la leche, ésta se realiza con la finalidad de determinar si la leche ha sufrido algún tipo de alteración en su composición, el análisis se realiza con la ayuda de un lactodensímetro. El rango de

densidad debe fluctuar entre 1.030 y 1,033 gr/mL a una temperatura de 20°C, su variación con la temperatura es de 0.0002 gr/mL por cada grado de temperatura.

La acidez determina la calidad de la leche, se expresa como porcentaje de ácido láctico y debe estar entre 0.15 y 0.16%. Esta acidez se debe en un 40% a las caseínas, otro 40% al aporte de ácidos orgánicos, el 20% restante se debe a las reacciones secundarias de los fosfatos presentes. Una acidez menor al 0.15% puede ser debido a la mastitis o al aguado de la leche. Una acidez superior al 0.16% es producida por la acción de contaminantes microbiológicos.

El pH de la leche también es medido, debe de estar cercano a la neutralidad, (entre 6.5 y 6.65) valores distintos se producen por deficiente estado sanitario de las glándulas mamarias, por el desarrollo de microorganismos que desdoblan o convierten la lactosa en ácido láctico, o por la acción de microorganismos alcalinizantes.

Las leches deben estar libres de inhibidores, antibióticos, higienizantes, calostro y se deben de evitar las leches mastíticas.

2.1.3.2.3 Microbiológicos

Para evitar fermentaciones y reacciones indeseables, es necesario que la leche sea de buena calidad microbiológica. Las características nutricionales de la leche la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, para evitar parcialmente este desarrollo se debe de enfriar la leche inmediatamente después de la ordeña a 4 °C - 10 °C hasta su procesamiento (Villegas, 2004).

2.1.3.3 Filtración

Este procedimiento se realiza para retirar partículas grandes que han caído en la leche por el manejo y el transporte, ya sean residuos de forraje o bien, partes de insectos.

2.1.3.4 Estandarización

La mayoría de los quesos se elaboran con leche entera, pero se puede normalizar el contenido de grasa según las exigencias del consumidor, este contenido se puede aumentar con leche alta en grasa o con crema, o también se puede disminuir por descremado o adición de leche descremada (Villegas, 2004).

2.1.3.5 Pasteurización

La leche debe ser sometida a este proceso para obtener una calidad higiénica adecuada ya que destruye los microorganismos no deseados con lo cual se garantiza la salud del consumidor. Con este procedimiento se le da un medio libre de competencia al cultivo que se empleará. Es un método fundamental en la elaboración de quesos frescos de corta maduración (Madrid, 1999).

2.1.3.6 Inoculación de cultivos iniciadores

La adición de cultivos iniciadores básicamente se realiza para que se produzca la acidificación, gracias a la producción de ácido láctico ya que con la pasteurización se pierde la mayoría de la flora microbiana natural. Los microorganismos adicionados son seleccionados de acuerdo con las características que se desee conferir al queso (Early, 1998).

Los cultivos iniciadores pueden o no ser empleados en la elaboración de quesos frescos, los cultivos más apropiados son bacterias ácido lácticas homofermentativas mesófilas. Estas actúan como protectores del queso ya que impiden el desarrollo de bacterias no deseables, además promueven la acción del cuajo y la sinéresis (Villegas, 2004).

2.1.3.7 Coagulación

El proceso fundamental para la elaboración de un queso es la coagulación de la caseína, ésta puede ocurrir por dos vías: la enzimática y la láctica. La primera se utiliza principalmente para quesos duros, consiste en la adición de cuajo a la leche para lograr la coagulación de las caseínas. La actividad enzimática del cuajo provoca que la leche coagule y pase a formar un gel irreversible (cuajada).

El cuajo es una enzima proteolítica, su función es desestabilizar a la caseína lo que da lugar a la formación de un gel que engloba al suero y los glóbulos grasos en su interior. Así mismo, su actividad proteolítica conduce a la formación de compuestos que serán utilizados por las bacterias del fermento para su multiplicación (Sbodio y Revelli, 2012).

La coagulación láctica se logra por la acidificación a causa del ácido láctico producido por las bacterias disminuyendo el pH hasta que se desestabilizan las caseínas, se vuelven insolubles y precipitan, este procedimiento es usado para quesos blandos.

La caseína es una fosfoproteína, representa el 80% de la proteína total de la leche. Se encuentran en forma de micelas formadas por fracciones proteicas α S1, α S2, β y κ . Las tres primeras tienen una gran afinidad por el calcio, mientras que la caseína κ es sensible a la acción hidrolítica de la quimosina (Early, 1998).

El cuajo convierte la caseína en paracaseína al hidrolizar la caseína κ , que es la que estabiliza la micela, al estar fraccionada una parte se queda en la micela y la otra se va al suero. La micela precipita en forma de pequeños agregados los cuales van formando una red con poros dentro de la cual se van acomodando los glóbulos grasos. Y por la continua formación de enlaces entre las micelas, el cuajo se va haciendo más firme (Amiot, 1991).

El gel formado tiende a expulsar el suero y el coagulo se concentra, este proceso se llama sinéresis y depende de la temperatura. La temperatura óptima de acción del cuajo está alrededor de 40°C, pero se utilizan temperaturas inferiores para evitar

la dureza del coagulo. La dureza del gel aumenta a medida que disminuye el pH. A pH menores de 6 la dureza reduce por la desmineralización de la caseína (Sbodio y Revelli, 2012).

2.1.3.8 Desuerado

Transcurrido el tiempo de coagulación, se realiza el corte, se rompe la cuajada en granos con un tamaño que va a depender del tipo de queso. El corte ayuda a expulsar el suero. Mientras más pequeños sean los granos de la cuajada menor contenido de humedad, es decir, más intenso será el desuerado y por lo tanto más duro el queso (Madrid, 1999).

2.1.3.9 Moldeado

Al finalizar el proceso de desuerado la cuajada se coloca en moldes que permitan la salida del lactosuero que se encuentra aún entre los glóbulos. Después de esto se somete a un prensado de los moldes aprovechando el propio peso de la cuajada para que los granos se unan y formen una masa continua. De esta manera se le da forma al queso y se determina su textura (Villegas, 2004).

2.1.3.10 Salado

La sal no se utiliza solamente como condimento. Este procedimiento se aplica en todos los tipos de queso, el propósito de la salazón es facilitar el desuerado, potenciar el sabor, inhibir el crecimiento de bacterias indeseables y como consecuencia alargar la vida de anaquel del queso. Se puede salar directamente en la cuajada antes del moldeado, por inmersión en salmuera o por aplicación directa de sal en la superficie del queso (Madrid, 1999).

2.1.3.11 Empaque y almacenaje

Para cubrir la excesiva pérdida de agua y protegerlo de la contaminación microbiológica, se cubren con un film plástico. Los quesos frescos se deben almacenar en refrigeración entre 4 °C y 10 °C para garantizar la estabilidad del producto (Villegas, 2004).

2.2 Alimentos funcionales con beneficios para el tracto gastrointestinal (TGI)

La alimentación influye en el estado nutricional de un individuo y coadyuva en la composición de su microflora la cual es variable entre grupos humanos. Dentro de los componentes utilizados comúnmente en los alimentos funcionales están los prebióticos, probióticos y simbióticos, los cuales intervienen de manera positiva en el tracto gastrointestinal (Vitoria, 2007).

2.2.1 Prebióticos

Según Gibson y Roberfroid (1994) los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que benefician al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un limitado número de bacterias del colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero.

En los últimos años ha crecido el interés por estas fibras que podrían incluirse en los alimentos. Por eso es importante determinar que los prebióticos son alimentos con fibras fermentables, pero también son sustratos especializados para bacterias específicas y sus productos finales de fermentación tienen posibles efectos beneficiosos sobre la salud del huésped.

La mayoría de los prebióticos son utilizados como ingredientes de alimentos, por ejemplo en cereales, chocolates, productos lácteos, entre otros. Los más conocidos son:

-
- Inulina
 - Lactulosa
 - Oligofruetosa
 - Galacto-oligosacáridos
 - Oligosacáridos de la leche materna

Estos compuestos están constituidos por macromoléculas no digeribles como los carbohidratos, debido a que las enzimas del intestino humano no pueden hidrolizarlas, estos llegan al colon sin haber sido alterados químicamente. En el intestino grueso, las bifidobacterias y algunos lactobacilos cuentan con las enzimas adecuadas para hidrolizar estos ingredientes y consumir los monosacáridos resultantes mediante fermentación anaerobia (Cagigas y Blanco, 2002).

Algunos de los requisitos debe reunir una sustancia para ser considerada prebiótica son las siguientes (Cagigas y Blanco, 2002):

- Ser de origen vegetal
- No ser digeridas por las enzimas digestivas
- Formar parte de un conjunto de moléculas complejas
- Ser parcialmente fermentadas por las bacterias del colon
- Su fermentación debe ser selectiva estimulando el crecimiento de bacterias intestinales asociadas a efectos saludables para el huésped.

2.2.2 Simbióticos

Los simbióticos son formulaciones que incluyen prebióticos y probióticos (Vitoria, 2007). Los simbióticos constituyen un grupo diferente a los probióticos, estos se definen como una mezcla de prebióticos y probióticos destinados a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud, con el fin de modificar la microflora intestinal y su metabolismo (Olagnero *et al.*, 2007).

2.2.3 Probióticos

En 1907, el biólogo ucraniano Elie Metchnikoff, ganador del premio nobel en 1903 por su teoría sobre los fagocitos, propuso que el proceso de envejecimiento es el resultado de la intoxicación putrefactiva ocasionada por la microflora intestinal, esto basado en los descubrimientos en habitantes de algunas regiones de Bulgaria quienes consumían yogurt como parte de su dieta y tenían una longevidad notoria. Metchnikoff sugirió que la vida se prolongaba por el consumo de las bacterias ácido lácticas presentes en la leche fermentada (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), surgiendo así la teoría de que las bacterias nocivas en el intestino pueden ser eliminadas por la acción de estas bacterias benéficas (Anukam y Reid, 2007).

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término probiótico que significa a favor de la vida, término empleado para las bacterias que viven en nuestro tracto gastrointestinal (Fuller, 1992).

Fuller, en 1989 los definió como microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician el desarrollo de la flora microbiana en el intestino.

En la actualidad para explicar el término probiótico se utiliza la definición emitida por la FAO y la OMS, probióticos son organismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del huésped (Reyes y Rodríguez, 2010).

Un microorganismo para ser considerado probiótico debe cumplir con algunos criterios importantes como los que se presentan en la tabla 2 (Reyes y Rodríguez, 2010).

Tabla 2. Características de un probiótico

Ser habitante normal del intestino

Favorecer tolerancia a la lactosa

Tener baja permeabilidad intestinal

Producen compuestos antimicrobianos

Mejora las propiedades de la flora nativa

Proteger de infecciones gastrointestinales

Aumentar el valor nutritivo de los alimentos

Propiedades no patogénicas, ni toxigénicas

Resistente a la acidez estomacal y alcalinidad duodenal

Capacidad de adhesión a células epiteliales del intestino

Se emplean como vehículos en la administración de vacunas

Reduce la acumulación de compuestos tóxicos o cancerígenos en el alimento

Habilidad para modular el sistema inmune e influenciar actividades metabólicas

Disminuye los niveles de colesterol en sangre y/o controlan algunos tipos de cáncer

Habilidad para adaptarse dentro del tracto gastrointestinal sin desplazar la flora nativa

Durante los últimos años se han desarrollado una gran diversidad de productos elaborados con probióticos, la oferta incluye principalmente derivados lácteos como leches fermentadas, yogurt, quesos, helados, además de suplementos alimenticios en diferentes presentaciones (González *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo reportado por algunos autores es necesaria una ingesta mínima diaria de 10^7 - 10^9 microorganismos vivos por cada gramo o mililitro de producto para que puedan ser observados los beneficios en la salud de los consumidores, además de que permanezcan viables a altas concentraciones durante el tiempo de vida de anaquel (González *et al.*, 2006).

2.2.3.1 Microorganismos probióticos

Entre los microorganismos probióticos para uso en humanos se encuentran comúnmente las bacterias ácido lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros y especies. Los principales son los lactobacilos, estreptococos y las bifidobacterias. Los primeros son una población dominante en el intestino, mientras que las bifidobacterias lo son del colon (Vitoria, 2007).

El género *Lactobacillus* es considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe). Ninguna de las cepas consideradas como probióticas ha causado daño a quien las consume, aun así es necesario que al elaborar un producto probiótico se identifique la especie utilizada para garantizar la inocuidad y grado alimenticio (Sanz *et al.*, 2003).

La viabilidad de los microorganismos durante su tránsito en el tracto digestivo es importante en el ámbito de los alimentos funcionales, es por esto que al elegir un microorganismo probiótico para ser añadido a un alimento requiere pasar por ciertas pruebas, entre ellas está la resistencia a la acidez gástrica, sales biliares y antibióticos, así como la adherencia al mucus y células epiteliales, la habilidad para reducir la adhesión de la flora competitiva, y actividad antimicrobiana que favorezca el desplazamiento de patógenos (Castro y Rovetto, 2006).

Los microorganismos más utilizados con fines funcionales se pueden apreciar en la tabla 3. También se resumen algunos de los beneficios propios de cada bacteria que confieren al individuo consumidor (Sanz *et al.*, 2003).

2.2.3.2 Mecanismo de acción de los microorganismos probióticos

Algunas de las formas de acción de los probióticos en el hospedero son las que a continuación se mencionan: competencia por nutrientes, modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal, entre otros (Gimeno, 2004). La eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando es administrado al huésped por la influencia de factores más complejos como su muerte en el tracto gastrointestinal provocada por la incapacidad del probiótico para mantener su fisiología bajo circunstancias de una mayor interacción microbiana (Vine *et al.*, 2006; Arribas *et al.*, 2008).

2.2.3.3 Importancia de los probióticos

Los efectos benéficos de los probióticos son varios, incluyendo la modificación de la flora bacteriana evitando la colonización de microorganismos patógenos, previniendo el desequilibrio de la microflora intestinal, reduciendo la incidencia y duración de las diarreas, así como el mantenimiento de la integridad de las mucosas, la producción de vitaminas B2, B6 y biotina, la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral (Gómez, 2003).

2.2.3.4 Desarrollo de productos lácteos probióticos

Recientemente se han desarrollado productos lácteos funcionales, en especial leches fermentadas que usan cultivos de microorganismos probióticos, estos microorganismos son principalmente *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* y *Bifidobacterium bifidum*, ya que estos se encuentran presentes en la microflora intestinal. El resultado benéfico dependerá de la cepa bacteriana que se utilice, si está en el alimento o en combinación con otra, el tipo de alimento utilizado como vehículo, su tiempo de vida útil, la genética del consumidor y la dosis suministrada (Coronado *et al.*, 2007).

Tabla 3. Principales microorganismos utilizados como probióticos y su efecto sobre el consumidor.

Género	Especie	Cepa	Efecto
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Breve</i>		Reducción de los síntomas del colon irritable
	<i>Longum</i>	BB536	Reducción de los síntomas del colon irritable
	<i>Lactis</i>	Bb12	Reducción de la diarrea por Rotavirus y de la incidencia de la diarrea del viajero
<i>Lactobacillus</i>	<i>Acidophilus</i>	La5	Reducción de la diarrea asociada con antibióticos
	<i>Casei</i>	Shirota	Reducción de la diarrea por rotavirus
	<i>Johnsonii</i>	La1	Reducción de la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Plantarum</i>	299v	Reducción de los síntomas del colon irritable Reducción del colesterol LDL
	<i>Reuteri</i>	SD2112	Reducción de diarrea por rotavirus
	<i>Rhamnosus</i>	GG	Reducción de diarrea por rotavirus Reducción de la inflamación por colon irritable
	<i>Salivarius</i>	UCC118	Reducción de los síntomas del colon irritable

Adaptado de Ouwehand *et al.*, 2002.

En general, la concentración de microorganismos probióticos necesarios para provocar resultados benéficos aún no está clara, sin embargo, algunos estudios sugieren que es necesario que entre 10^9 y 10^{10} organismos viables alcancen el

intestino delgado diariamente, siendo imprescindible que un producto probiótico contenga la cantidad de 10^6 - 10^7 organismos por mL o gr, para que mantenga su función y ejerza su beneficio sobre la salud. Además es aconsejable ingerir al menos una dosis diaria de alimento que los contenga (Sanz *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003).

Los productos lácteos representan un vehículo ideal para el suministro de probióticos por las razones siguientes:

- Tienen un alto contenido proteínico, vitamínico y de minerales
- Son ampliamente consumidos y al ser asociados con los beneficios de los probióticos tienen mayor aceptación
- El tiempo y temperatura de almacenaje baja, promueven la estabilidad de los probióticos y garantizan el efecto positivo al ingerirlos
- Ofrecen protección para los probióticos al mantener un ambiente favorable durante su tránsito por el tracto digestivo, en especial por el estómago e intestino delgado, donde los ácidos y bilis pueden eliminarlos

Así mismo, gracias a la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas se genera ácido láctico que da lugar a una disminución del pH, favoreciendo la coagulación de las proteínas determinando la textura del producto, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y facilita la digestión de la lactosa al consumidor. En cuanto a la degradación de caseína, ésta genera péptidos y aminoácidos libres más fáciles de asimilar (Sanz *et al.*, 2003).

2.2.3.4.1 Yogurt

Este producto es considerado como un alimento saludable. Metchnikoff en 1908 observó que en Bulgaria las personas vivían más de 100 años, después de algunas investigaciones determinó que esto se debía a las grandes cantidades de yogurt que ingerían diariamente. Por lo que el yogurt está calificado como un alimento funcional y máximo representante de probióticos y prebióticos por ser el vehículo

ideal, pues además de los beneficios tiene gran aceptación en los distintos grupos de población y son fáciles de digerir (Castro y Rovetto, 2006).

2.2.3.4.2 Queso

Los resultados obtenidos con el yogurt llevó a realizar diversos estudios para la aplicación de probióticos en queso, ya que se cree que es un mejor vehículo para los microorganismos probióticos ya que presenta una estructura estable y adecuada, la matriz de caseína protege a las células de la acción de los jugos digestivos (Taranto *et al.*, 2005).

El queso presenta una serie de ventajas respecto a las leches fermentadas, el pH es mayor, la matriz es más compacta lo que hace que haya una mayor exclusión de oxígeno (atmósfera anaerobia), mayor contenido en grasa. El contenido en grasa ejerce una protección de los microorganismos probióticos, lo cual favorecerá mayor resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y tránsito intestinal (Taranto *et al.*, 2005; Boza *et al.*, 2010).

La mayoría de los trabajos sobre el desarrollo de quesos funcionales probióticos se han hecho en variedades de queso de producción industrial como el queso Cheddar, Cottage, Gouda, entre otros. También se han obtenido resultados positivos en los quesos elaborados con leche de cabra. En la elaboración de dichos quesos se han utilizado distintas cepas probióticas pertenecientes a las especies *Lb. paracasei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, etc. (Fernández y Rodríguez, 2005; Martínez *et al.*, 2008).

2.3 Bacterias ácido lácticas

Fue en 1857 cuando Pasteur descubrió a los microorganismos que causaban alteración en los alimentos, en poco tiempo descubrió que la sustancia que los alteraba era el ácido láctico, el cual es un producto derivado de la fermentación de ciertos microorganismos. En 1890, Weigman estableció lo que fue el primer cultivo iniciador reconocido y más tarde, en 1899 definió a las bacterias ácido lácticas como

“aquellas bacterias que formaban leche ácida a partir del azúcar de la leche” (Esquivel *et al.*, 1987; Fernández, 2000).

Es sabido que las BAL no solo son interesantes en la industria de los alimentos por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlos para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos (Parra, 2010). La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano. Además de los ácidos orgánicos producen otras sustancias como el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, bacteriocinas (Hernández *et al.*, 1993).

Las BAL han adquirido recién interés debido a sus características fermentativas y antagonicas por parte de la industria alimentaria ya que son consideradas GRAS por la FDA, debido a que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos sin que hubiera efectos adversos sobre la población (Monroy *et al.*, 2009).

2.3.1 Características generales

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que se caracterizan por ser Gram positivos, con una pared celular gruesa, heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico (Parra, 2010) cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo fermentativo de carbohidratos. En general las bacterias ácido lácticas son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, grandes o pequeños, no esporulados e inmóviles, microaerófilos o anaerobios facultativos que carecen de citocromos, son catalasa y oxidasa negativa, no patógenas ni toxigénicas, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales y no tienen un ciclo de Krebs funcional (Monroy *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2011).

Si bien las bacterias ácido lácticas son mesófilas, algunas son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5 °C y otras a temperaturas tan altas como 45 °C

(termófilas), la mayoría muere cuando se eleva la temperatura a 70 °C, aunque algunas soportan hasta 80 °C. Con respecto al pH de crecimiento, la mayoría desarrolla en una escala comprendida entre 4 y 4.5 aunque un grupo de ellas son capaces de crecer a pH tan bajo como 3.2 y otras a pH tan alto como 9.6, en cuanto a sus exigencias nutricionales, además de una fuente de energía como carbohidratos, las bacterias ácido lácticas necesitan aminoácidos preformados, vitaminas del grupo B, bases púricas y pirimídicas (Jay, 2000).

La enzima que degrada al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es la catalasa, para que la enzima realice esta función necesita de un grupo porfirínico (citocromos), el cual las bacterias ácido lácticas son incapaces de sintetizar y, por lo tanto, este clase de bacterias no posee dicha enzima, lo que permite la identificación del grupo como catalasa negativa. Una característica física debida a la ausencia de citocromos es el color lechoso de las bacterias ácido lácticas (Prescott *et al.*, 1999).

Las bacterias ácido lácticas son muy exigentes en cuanto a la nutrición se refiere, requieren aminoácido como fuente de nitrógeno siendo las sales amoniacaes las que estimulan su desarrollo, además necesitan vitaminas, por ejemplo B₆, B₁₂, B₂. Las cantidades de vitaminas necesarias para cada especie varían con las condiciones de cultivo. A su vez, la cantidad de aminoácidos necesarios dependen en parte de las vitaminas presentes (Leveau y Bouix, 2000). Algunas bacterias ácido lácticas además necesitan bases púricas y pirimídicas utilizadas en la síntesis de ácidos nucleicos. La mayor parte de las bacterias ácido lácticas obtienen energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Charles, 1998; Jay, 2000).

El hábitat de las bacterias ácido lácticas es muy diverso, las podemos encontrar en (Barakat, *et al.*, 2000):

- Productos cárnicos
- Alimentos fermentados
- Lácteos y sus derivados

-
- Superficie de frutas y verduras
 - Mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, tracto naso faríngeo, gastrointestinal y vagina

A pesar de la utilidad que las BAL tienen en la industria, es difícil cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Se utilizan varios medios de cultivo (selectivos o diferenciales) para el aislamiento y recuento de estos microorganismos a partir de alimentos, entre los que se encuentra el agar MRS (Man Rogosa-Sharpe), agar APN (Actidiona-polimixinanitrito), agar de Lee y el agar de Chalmers (Charles, 1998).

Dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas, existen microorganismos reconocidos como probióticos, pero no todos causan los mismos efectos y ejercen los mismos mecanismos de acción. La mayoría pertenece al género *Lactobacillus*. Slover y Danzinger (2008) reportaron su aplicación en gran variedad de enfermedades gastrointestinales como diarrea infecciosa y síndrome del colon irritable por la producción de ácido láctico, propiónico y acético que disminuye el pH intestinal inhibiendo potencialmente el crecimiento de bacterias patógenas. Sablon *et al.*, 2000 reportaron la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* mediante la producción de sustancias de bajo peso molecular, también conocidas como bacteriocinas en el tracto gastrointestinal.

2.3.2 Metabolismo de azúcares

El grupo de las bacterias ácido lácticas está integrado por diferentes géneros que comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. La fermentación desde el punto de vista bioquímico es el proceso catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones (Jay, 2000).

Para realizar la fermentación de monosacáridos las bacterias ácido lácticas tienen dos rutas metabólicas, fermentación homoláctica o glucólisis (vía Embden-

Meyerhof-Parnas) (Figura 1) y la fermentación heteroláctica o vía de las pentosas (vía 6-fosfogluconato) (Figura 2). Las bacterias ácido lácticas han sido divididas en tres categorías metabólicas basadas en estas vías de fermentación: homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas (Madigan *et al.*, 2004).

Las homofermentativas obligadas solo fermentan hexosas por la glucólisis, mientras que las heterofermentativas obligadas solo usan la vía del 6-fosfogluconato, y las heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar ambas vías siendo homofermentativo su metabolismo principal.

La diferencia entre una vía y otra está en función de la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis. Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas carecen de esta aldolasa y no pueden romper la fructosa 1,6 difosfato, en su lugar oxidan la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se escinde hasta gliceraldehído 3-fosfato y acetil-fosfato por medio de la fosfoacetolasa, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (adenosina trifosfato), mientras que el acetil-fosfato acepta electrones del NADH (nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida) que se ha generado durante la formación de xilulosa 5-fosfato, dando lugar directamente a etanol sin producir ATP, es por esto que las heterofermentativas solo producen 1 mol de ATP de la glucosa en lugar de 2 como ocurre con las homofermentativas (Prescott *et al.*, 1999).

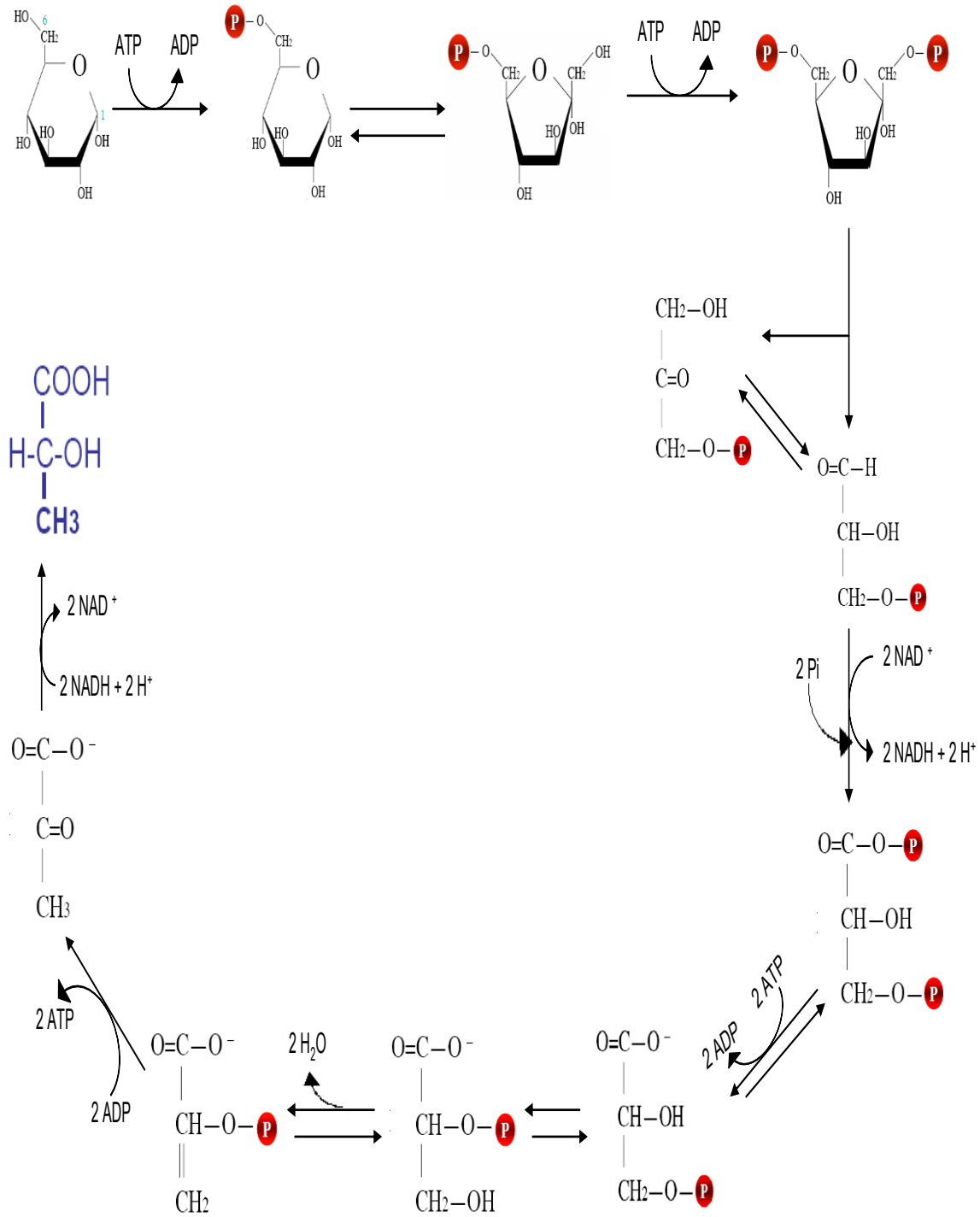


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.
(Adaptada de Stryer, 1990).

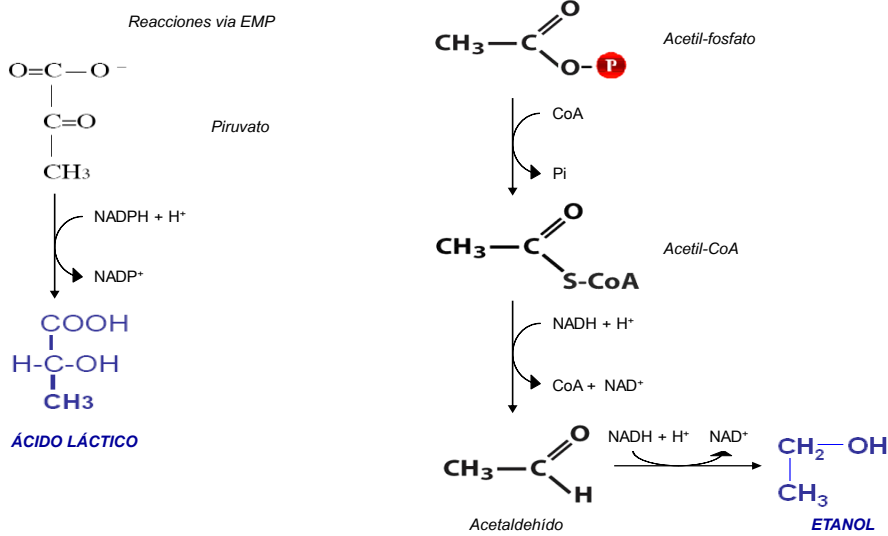
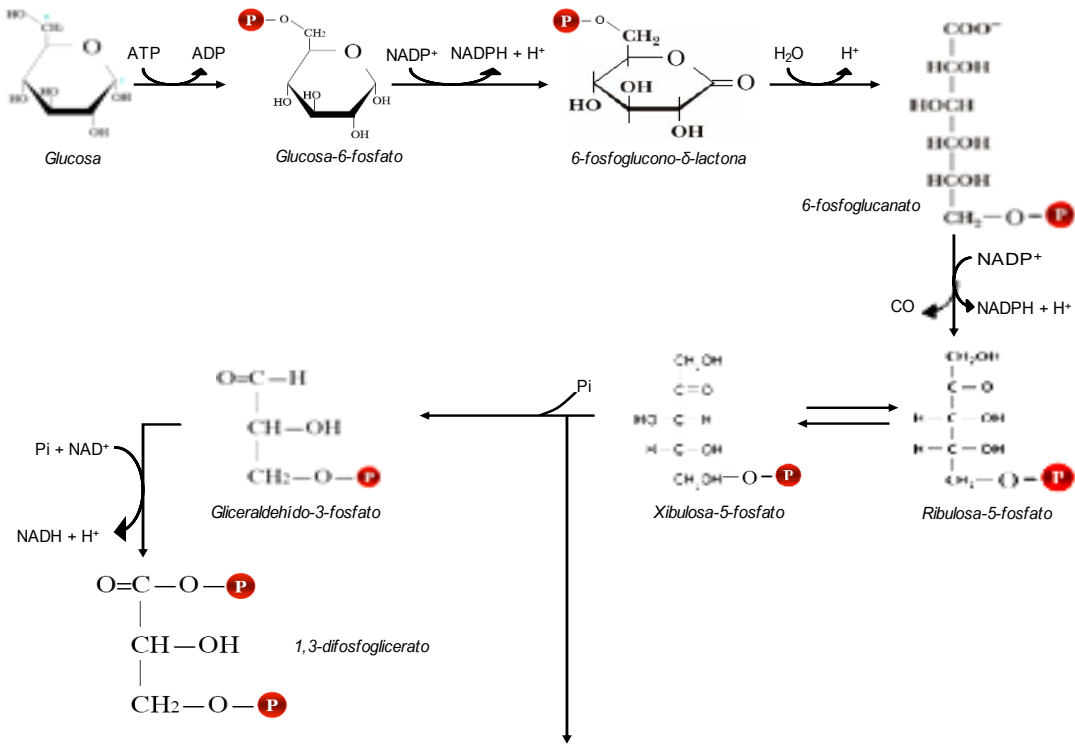


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Stryer, 1990).

2.3.3 Clasificación y géneros representativos de las BAL

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo que comprende alrededor de 20 géneros, de los cuales, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus* y *Oenococcus*, son los que tienen mayor incidencia en los alimentos (Ramírez *et al.*, 2011).

Los géneros que a continuación se describen son los que de mayor importancia en la microbiología de alimentos (Wood y Holzapfel, 1995).

2.3.3.1 *Streptococcus*

Fue la primera bacteria reconocida por los microbiólogos, son bacterias Gram positivas, esféricas u ovoides de 0.8-1.2 μm , no presentan motilidad. Estos microorganismos crecen en cadenas hasta con más de 50 células o pares y son anaerobios facultativos. Tienen la característica de ser homofermentativos ya que transforman la lactosa a ácido láctico, son catalasa y oxidasa negativo, crecen a 37 °C a concentraciones de NaCl menores a 4% (Wood y Holzapfel, 1995). Son sensibles al oxígeno, además tienen una completa necesidad de factores de crecimiento, vitaminas del complejo B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, ésta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche (Charles, 1998).

El género *Streptococcus* contiene una amplia variedad de especies homofermentativas, como productoras de ácido láctico juegan un papel muy importante en la producción de leches fermentadas y otros productos de fermentación. Los más conocidos son *S. lactis* y *S. cremoris*, los cuales son responsables de la acidificación de la leche, mientras que *S. diacetylactis* produce la fermentación del ácido cítrico a diacetilo, sustancia característica del aroma en la mantequilla, también es importante *S. thermophilus* pues es la especie de este género más importante ya que es utilizado como cultivo iniciador para la producción de yogurt y quesos, crece a 45 y 50 °C, pero no a 15 °C (Wood y Holzapfel, 1995).

Este género tiene hábitats diversos y con actividades importantes para el ser humano, ya que algunas de estas especies son patógenas primarias de mamíferos. Para distinguir especies patógenas y no patógenas del ser humano se ha reestructurado el género en tres: *Streptococcus*, *Lactococcus* (estreptococos de importancia en la industria láctea) y *Enterococcus* (estreptococos de origen fecal) (Madigan *et al.*, 2004).

2.3.3.2 *Lactococcus*

Son células ovoides Gram positivas que aparecen aisladas, en pares o en cadenas, crecen a 10 °C pero no a 45 °C, las cuales producen ácido láctico, son catalasa negativo, anaerobios facultativos, son homofermentativas y no forman esporas, tampoco tienen flagelos. Para su nutrición necesitan diversos aminoácidos y son dependientes de diversas vitaminas (Fernández, 2000).

En 1873 se aisló por primera vez a partir de leche fermentada *Lactococcus lactis* por Joseph Lister, se reconoce como el agente primario en la acidificación de la leche coagulada. Es la bacteria ácido láctica empleada como cultivo iniciador en la elaboración de productos lácteos, en especial quesos (Leveau y Bouix, 2000).

Las especies *Lc. lactis* spp. *lactis* y *cremoris* son las más estudiadas por su capacidad de producir y excretar una familia de pequeños polipéptidos de 3,500 Da, frecuentemente en forma de dímeros o tetrámeros considerados antibióticos, estos polipéptidos reciben el nombre de nisina (por: N estreptococci inhibiting substance) y diplococina respectivamente. Su modo de acción se limita a bacterias Gram positivas, también actúa sobre células vegetativas impidiendo la germinación de las esporas de bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*. La nisina además inhibe a las bacterias ácido lácticas, por ejemplo a otras cepas de *Lc. lactis*, en especial a la subespecie *cremoris*, pero por el contrario no muestra actividad contra los lactobacilos y contra *S. thermophilus* (Leveau y Bouix, 2000).

2.3.3.3 *Enterococcus*

Células esféricas, Gram positivas dispuestas en pares o cadenas cortas, catalasa negativas, no esporuladas, algunas cepas presentan motilidad. Crecen a 10 y 45 °C con una concentración de 6.5 % de NaCl y a un pH de 9.6. Son bacterias anaerobias facultativas, homofermentativas produciendo como compuesto principal ácido láctico. Se encuentran comúnmente en una gran variedad de quesos italianos. En muchos quesos se usan como cultivos iniciadores y las células que sobreviven a la pasteurización se muestran activas y participan en la generación de aromas (Wood y Holzappel, 1995; Fernández, 2000).

2.3.3.4 *Leuconostoc*

Los podemos encontrar en productos lácteos y cárnicos, vinos, frutas, hortalizas, vegetales en fermentación y productos de panificación. Son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, pueden ser alargados o elípticos y dispuestos en pares o en cadenas como *Streptococcus*, pero esta bacteria es heterofermentativa, produce ácido láctico, etanol y CO₂. Son bacterias mesófilas cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre 20 y 30 °C, se caracteriza por la producción de diacetilo y acetato (a partir del citrato de la leche). Se encuentran asociadas en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma adecuada son usados en la elaboración de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables (Prescott *et al.*, 1999; Jay, 2000).

2.3.3.5 *Pediococcus*

Las diferentes especies de este género las encontramos en los vegetales en descomposición. Comprende bacterias pertenecientes al grupo de cocos Gram positivos, catalasa negativos, de tamaño uniforme con 0.36-1.43 µm de diámetro, sin motilidad, no esporulados. Crecen bajo condiciones microaerofílicas o anaerobias facultativas, son homofermentativas pues fermentan la glucosa produciendo ácido láctico. Son generalmente acidófilos o acidúricos disminuyendo

el pH de los sustratos en los que crecen hasta por debajo de 4. Crecen a temperaturas desde los 7 hasta los 45 °C, aunque su temperatura óptima está entre 25 y 32 °C. Se presentan en parejas o tétradas como consecuencia de la división celular en dos planos. Necesitan medios complejos para desarrollarse. Se emplean como cultivo iniciador de salchichas semisecas, pueden ser deterioradores de sidra y cerveza, realizando una infección que la enturbia y acidifica con un olor peculiar denominado “enfermedad de la cerveza por sarcinas”. Algunas cepas son productoras de bacteriocinas (Wood y Holzapfel, 1995; Jay, 2000).

2.3.3.6 *Carnobacterium*

Este género se desprendió del *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas de cepas aisladas de carne de vacuno, de pescado y aves envasadas al vacío y almacenadas a bajas temperaturas. Son bacilos Gram positivos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 µm, en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram, son catalasa negativos, psicrótrofos creciendo la mayoría a 0 °C, mientras que a 45 °C no crecen, metabolismo predominantemente homofermentativo, son menos rigurosos en sus demandas nutricionales. Originalmente se distinguen seis especies en el género: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*, *C. gallinarum* y *C. piscícola* (Wood y Holzapfel, 1995).

2.3.3.7 *Vagococcus*

Son cocos Gram positivos dispuestos individualmente, en pares o cadenas, son catalasa negativa, anaerobias facultativas. Son móviles por medio de flagelos peritricos, crecen a 10 °C, pero no a 45 °C. Se encuentran en heces, pescado, agua y otros alimentos. Al menos una especie produce H₂S (Jay, 2000).

2.3.3.8 *Tetragenococcus*

Son cocos Gram positivos, dispuestos en pares o tétradas, son catalasa negativas, anaerobios facultativos, para su crecimiento requiere NaCl a una concentración de 18% (Wood y Holzapfel, 1995).

2.3.3.9 *Lactobacillus*

Bacterias Gram positivas con forma de bacilos o cocobacilos, su tamaño puede variar entre 0.5 y 0.6 μm , generalmente se presentan en cadenas cortas, no esporulados aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), con requerimientos nutricionales complejos, homofermentativas, crecen a 10 °C, pero no a 45 °C. Es común la producción de bacteriocinas (Wood y Holzapfel, 1995). Se encuentran ambientes ricos en carbohidratos, se han aislado de mucosas humanas y animales, productos vegetales, cárnicos y lácteos principalmente (Prescott *et al.*, 1999). Este género es el más grande, comprende alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupos, basados principalmente en las características fermentativas. Grupo 1 formado por especies homofermentativas estrictas. El grupo 2 incluye especies heterofermentativas facultativas. El grupo 3 está formado por especies heterofermentativas estrictas (Jay, 2000). Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales. Las especies heterofermentativas se asocian con alimentos en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente en productos empacados refrigerados, se pueden aislar fácilmente de productos cárnicos, lácteos, frutas y verduras. Los lactobacilos son utilizados en la industria alimentaria, especialmente en la producción de lácteos. Se emplean para producir alimentos fermentados, bebidas, masa agria, quesos, yogurt y embutidos. Dentro de las especies de *Lb. lactis*, dos subespecies, *lactis* y *cremoris* son las que se encuentran ampliamente en las fermentaciones de productos lácteos (Sánchez, 2003). Los lactobacilos causan también problemas, en ocasiones son responsables del deterioro de la cerveza, la leche y la carne (Prescott *et al.*, 1999).

2.3.4 Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son conocidas por producir sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, esta característica se usa para la eliminación de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de alimentos. En la actualidad se considera a las bacterias ácido lácticas microorganismos GRAS por lo que su empleo y/o de sus metabolitos como bioconservantes está recibiendo una gran atención (Leveau y Bouix, 2000). Dentro del metabolismo de las bacterias está la producción de sustancias con capacidad de biopreservación que incluye la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y producción de bacteriocinas (Caplice y Fitzgerald, 1999).

2.3.4.1 Ácidos orgánicos

La fermentación realizada por las bacterias ácido lácticas se caracteriza por la acumulación de ácidos orgánicos, el mecanismo de acción se basa en la disminución del pH del medio aumentando la cantidad de ácidos orgánicos en su forma no disociada. Debido a su naturaleza lipofílica, atraviesan la membrana celular por difusión pasiva disociándose en el citoplasma, ejerciendo su efecto inhibitorio interfiriendo en funciones celulares como la traslocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, provocando una desestabilización de la membrana (De Vuyst, 2000).

2.3.4.1.1 Ácido láctico

Es el metabolito principal producido por las bacterias ácido lácticas homofermentativas donde está en equilibrio con sus formas no disociadas y disociadas, el grado de disociación depende del pH. En pH bajo, una cantidad grande de ácido láctico está en forma no disociada, y es tóxico para muchas bacterias, hongos y levaduras. Este ácido está considerado como GRAS (Signorini y Guerrero, 2009).

2.3.4.2 Peróxido de hidrógeno

Es un compuesto que funciona como un antioxidante produciendo radicales libres bactericidas como el superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA, la acumulación del peróxido en los medios de cultivo, se debe a que las bacterias ácido lácticas en general no poseen catalasa (Vásquez *et al.*, 2009). En la leche cruda, el H_2O_2 activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipocianato ($OSCN^-$), oxiácidos más altos (O_2SCN^- y O_3SCN^-) y productos de oxidación intermedios que inhiben un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2.3.4.3 Dióxido de carbono

Es un compuesto formado en la fermentación heteroláctica por bacterias ácido lácticas el cual puede formar un ambiente anaerobio que se convierte en tóxico para algunos microorganismos al perder la habilidad de reducir el pH interno y externo (Caplice y Fitzgerald, 1999). El CO_2 puede inhibir el crecimiento de varios microorganismos esporulados presentes en alimentos, especialmente bacterias psicrótrofas Gram negativas.

2.3.4.4 Diacetilo

Es el responsable del sabor y aroma de la mantequilla y algunos otros productos lácteos fermentados, proviene del metabolismo del citrato por la fermentación de las hexosas. Las bacterias Gram negativas y las levaduras son más sensibles al diacetilo que las bacterias Gram positivas ya que genera una interferencia en la utilización de la arginina. La mayor resistencia de las bacterias lácticas Gram positivas parecer ser debida a que carecen de proteínas periplásmicas fijadoras similares y a que poseen mayor reserva de aminoácidos (Caplice y Fitzgerald, 1999; Jay, 2000).

2.3.4.5 Bacteriocinas

Son polipéptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Monroy *et al.*, 2009). González *et al.*, (2003), señalan que la acción antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Características de las bacteriocinas (Fernández, 2000):

- Inocuas
- Bactericidas
- Polipéptidos
- Termoresistentes
- Solubles en agua
- Resistentes a proteasas
- No imparten sabor o aromas
- Activas en amplios valores de pH
- Corto espectro de acción antimicrobiana

Las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas, cuando son purificadas solo son activas contra las bacterias Gram positivas. Su espectro de acción con excepción de la nisina y la pediocina A, está restringido a las especies próximas a la cepa productora o presentes en el mismo nicho ecológico. También actúan frente a otros microorganismos entre los que se encuentran muchas bacterias alterantes y patógenas frecuentes en los productos. Su mecanismo de acción se basa en destruir la membrana plasmática microbiana mediante la formación de poros. Para ello, estos péptidos se unen a los fosfolípidos de la membrana con interacciones electrostáticas. Posteriormente se insertan en ella y originan agregados proteicos a partir de los cuales se forman poros. A través de dichos poros se produce la salida

de compuestos imprescindibles para la célula (protones y otros iones, ATP, aminoácidos) lo que desencadena su muerte debido a la inhibición de la síntesis de macromoléculas y la producción de energía (González *et al.*, 2003).

2.4. Microorganismos presentes en los alimentos

Los alimentos contienen nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos, sin embargo, la composición del alimento tiene un efecto selectivo sobre la flora microbiana. Los microorganismos se desarrollan en función de sus características y de los parámetros fisicoquímicos del alimentos (Moreno, 2006).

Existe una gran diversidad de microorganismos en la superficie de los alimentos naturales y en ocasiones, en su interior, como bacterias, hongos, levaduras, ciertas algas microscópicas, excepto en productos que han recibido diversos tratamientos antimicrobianos severos como la pasteurización o alimentos que por su naturaleza no suelen ser contaminados. Algunos microorganismos presentes en los alimentos sobreviven, otros se multiplican y otros se inactivan. Las consecuencias de esta multiplicación microbiana puede ser el deterioro progresivo del alimento o un incremento en el riesgo de salud consecutivo a su consumo (Fernández, 2000; Madigan *et al.*, 2004).

2.4.1 Microorganismos deterioradores

La descomposición de los alimentos es una de las consecuencias de la actividad de los microorganismos que los han contaminado, de la composición del alimento, del tiempo y de las condiciones en las que son almacenados. La acción microbiana predominante sobre las proteínas, lípidos o carbohidratos provoca cambios distintos, aun tratándose del mismo alimento (Fernández, 2000).

2.4.2 Microorganismos patógenos

Microorganismos patógenos se encuentran ocasionalmente en los alimentos. Su consumo puede ocasionar un proceso infeccioso cuando el microorganismo es ingerido en cantidad suficiente en el alimento, seguido del crecimiento del mismo por la invasión de los tejidos, o bien por la ingestión de una toxina ya presente o elaborada tras su multiplicación en el alimento originando una intoxicación (Fernández, 2000).

2.4.3 Microorganismos de importancia para la salud pública

2.4.3.1 *Escherichia coli*

Bacilos cortos Gram negativos, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, no esporulados, catalasa positiva y oxidasa negativa, móviles por flagelos peritricos, fermentan la lactosa y glucosa. Son organismos mesófilos que crecen a temperaturas desde 10 °C a 40 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5, con un pH mínimo de crecimiento de 4, además son capaces de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación por tiempos largos. Es considerada como integrante de la flora normal del tracto intestinal del hombre y animales, se le considera como el indicador más confiable de la presencia de materia fecal en los alimentos (Fernández, 2000; Frazier y Westhoff, 2000).

2.4.3.1.1 *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* enterohemorrágica)

Este microorganismo se ha relacionado con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poca o nada fiebre. Se encuentra típicamente en el ganado vacuno saludable, siendo su principal reservorio el intestino del animal. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales, además en productos industrializados. La transmisión puede darse de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos (Rodríguez, 2002). *E. coli* O157:H7 crece en un amplio rango de temperatura y puede sobrevivir a temperaturas de

congelación y rangos de pH desde 4.4 a 9. La temperatura óptima de crecimiento del patógeno es 3 °C, aunque se ha observado crecimiento a temperaturas de 7 a 44 °C, el proceso de pasteurización o cocción adecuada del alimento a 70 °C por 2 minutos elimina el patógeno (Pearce *et al.*, 2004).

2.4.3.2 *Salmonella*

Son bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae, son móviles por flagelos peritricos, aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la glucosa generalmente con producción de gas. Son organismos no esporulados, catalasa positiva, oxidasa negativa. Tienen una temperatura de crecimiento de 5 °C hasta 47 °C con un crecimiento óptimo de 37 °C. Las especies pertenecientes a este género son resistentes a la congelación y a la deshidratación pero son termosensibles y se destruyen fácilmente por temperaturas de pasteurización (Fernández, 2000; Frazier y Westhoff, 2000).

2.4.3.3 *Staphylococcus aureus*

Consiste en células esféricas organizadas en forma de racimos de uva, en parejas o en formas de cadenas cortas, no esporuladas, inmóviles, son catalasa positiva, oxidasa negativa, aerobios facultativos. Son mesófilos con un intervalo de temperatura de crecimiento entre 7 a 48 °C, con una óptima de 35 a 40 °C. En medios sólidos crece formando colonias de color dorado o amarillas (Fernández, 2000).

2.4.3.4 *Listeria monocytogenes*

Cocobacilos Gram positivos de 0.5 x 1.2 µm, no esporulados que tienden a formar cadenas cortas de 3 a 5 células, son catalasa positiva, anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos. Son organismos psicrótrofos capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. El crecimiento de las cepas es inhibido a valores de

pH inferiores a 5.5, pero el pH mínimo se encuentra entre 4.4 y 5.6 (Fernández, 2000; Frazier y Westhoff, 2000).

2.4.3.5 *Shigella*

Bacilos Gram negativos, inmóviles, anaerobios facultativos, no esporulados, catalasa positiva, oxidasa negativa, no fermentan la lactosa. Son organismos mesófilos cuya temperatura varía entre 10 a 45 °C, crecen a valores de pH de 6 a 8 y no sobreviven a valores de pH inferiores a 4.5. *Shigella* es sensible al calor y muere por calentamiento mayor a 70 °C (Fernández, 2000).

2.5 Comportamiento de bacterias ácido lácticas en quesos

Recientemente se ha incrementado el interés por la incorporación de bacterias probióticas en alimentos lácteos como los quesos; las bifidobacterias son el grupo preferido, ya sea que se incorporen de manera individual o combinada, principalmente con lactobacilos.

El queso Cheddar, es un queso duro, consumido mayormente en los países desarrollados, ha sido la variedad más estudiada en este contexto (Dinakar y Mistry, 1994; Gardiner *et al.*, 1998), ya que actúa como buen vehículo de bacterias probióticas. En general se ha observado una elevada sobrevivencia de las bacterias probióticas en el queso después de uno o dos años de maduración, esto en concentraciones mayores a 10^6 ufc/g hacia el final de la maduración. Entre los probióticos estudiados incluyeron diversas cepas de bifidobacterias, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*. Se han reportado altas concentraciones de *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y tres cepas de bifidobacterias en quesos Cheddar elaborados con cada una de ellas después de 32 semanas de maduración, sin embargo, en las mismas condiciones los autores encontraron una baja sobrevivencia para las cepas de *Lb. acidophilus* que ensayaron (Ong *et al.*, 2006). Este contraste de resultados obtenidos utilizando las mismas cepas en el mismo tipo de queso destaca la

importancia de otros factores para la sobrevivencia, tales como el tiempo y la temperatura de maduración.

Dentro de los quesos blandos con probióticos destaca el desarrollo de los quesos Cottage y Crescenza (Blanchette *et al.*, 1996; Gobbetti *et al.*, 1998; O’Riordan y Fitzgerald, 1998), éstos son considerados el mejor vehículo para mantener la viabilidad de dichos cultivos debido al alto contenido de humedad y el corto tiempo de maduración. Sin embargo se encuentran diferentes resultados en la determinación de la viabilidad de los microorganismos probióticos en dichas variedades de queso, esto podría deberse a la dependencia de las cepas utilizadas y sus combinaciones. En otro estudio la población de *Bifidobacterium infantis* en queso Cottage fue menor a 10^3 ufc/g a los 15 días de maduración e indetectable a los 22 (Blanchette *et al.*, 1996). En otro estudio Buriti *et al.*, (2005) incorporaron *Lb. acidophilus* en queso Minas (queso blando) en combinación con dos cultivos primarios diferentes, y en ambos casos la población de lactobacilos probióticos fue de aproximadamente 10^6 ufc/g a los 21 días. Dentro de los quesos semiduros, existen trabajos referidos al queso Gouda (Gomes *et al.*, 1995) y otras variedades (Songisepp *et al.*, 2004) con la incorporación de bacterias probióticas. Los primeros encontraron una lenta disminución en las poblaciones de *Bifidobacterium lactis* y *Lb. acidophilus* en queso Gouda durante las primeras tres semanas de maduración y un descenso durante las siguientes 6 semanas. Éstos emplearon una cepa de *Bifidobacterium sp.* y una de *Lb. acidophilus* (en forma individual) como fermento primario para la elaboración de queso Gouda y, si bien la sobrevivencia de ambas fue buena a lo largo de la maduración, se emplearon inóculos muy elevados para lograr una buena acidificación. Kasimoglu *et al.*, (2004) encontraron una sobrevivencia de *Lb. acidophilus* en niveles superiores a 10^7 ufc/g en queso semiduro de origen turco (queso blanco) a los 90 días de maduración. En otro estudio realizado en el 2004 por Songisepp *et al.*, resalta la elevada sobrevivencia de aproximadamente 5×10^7 ufc/g de una cepa de *Lb. fermentum* con marcadas propiedades antimicrobianas durante la maduración del queso Pikantne.

La incorporación de cultivos probióticos también se ha llevado a cabo, pero en menor medida, en quesos elaborados con leches de otras especies. Corbo *et al.*, (2001) estudiaron la incorporación de bifidobacterias en quesos elaborados con leche de oveja (Canestrato Pugliese), por otro lado Gomes *et al.*, (1995) desarrollaron un queso probiótico utilizando leche de cabra. El queso Canestrato Pugliese elaborado con la incorporación de dos cepas de bifidobacterias distintas, no resultó significativamente distinto de la variedad tradicional, tanto en sus características sensoriales como en su composición. A pesar de ser una variedad de pasta dura, la viabilidad de cepas probióticas fue buena para una de ellas (10^6 ufc/g) y moderada para la otra (10^5 ufc/g) luego de 56 días de maduración (Corbo *et al.*, 2001). Gomes *et al.*, (1995) elaboraron un queso semiduro con leche de cabra y con adición de *Lb. acidophilus* y *B. lactis*, las concentraciones de probióticos en queso fueron más elevadas (3×10^8 y 6×10^7 ufc/g para *B. lactis* y *Lb. acidophilus*, respectivamente), quizá debido a una mejor sobrevivencia bacteriana en un queso de mayor humedad, aunque este no es el único factor importante, sino también la combinación de cepa-queso en particular.

3. JUSTIFICACIÓN

La alimentación, junto con los estilos de vida propios de las sociedades industrializadas son determinantes en la adquisición de desequilibrios metabólicos crónicos que conducen a determinadas enfermedades de tipo cardiovascular, obesidad y algunos tipos de cáncer.

Debido a esto, durante los últimos años se ha incrementado el interés por la identificación y caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos de elaboración artesanal, ya que éstas tienen un potencial uso en la industria alimentaria donde se emplean con diferentes propósitos.

La identificación de cepas de bacterias ácido lácticas capaces de inhibir el desarrollo de bacterias patógenas o deterioradoras, ofrece una alternativa para el uso bacterias ácido lácticas como cultivos iniciadores en la elaboración de derivados lácteos, ya que incrementan la calidad de los productos y al mismo tiempo disminuye el riesgo de adquirir enfermedad asociada al consumo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar, identificar y evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas obtenidas de diferentes alimentos así como determinar su potencial antimicrobiano en queso fresco contra diferentes microorganismos patógenos.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias ácido lácticas (BALs) a partir de frutas, hortalizas, pulque y quesos elaborados de manera artesanal.
- Determinar el potencial antagónico de las BALs en medio de cultivo contra *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.
- Evaluar *in vitro* el potencial probiótico de las BALs con mayor efecto antagónico mediante pruebas de resistencia a pH, sales biliares y sensibilidad a antibióticos.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas y moleculares el género y especie de las cepas de BALs con mayor efecto antagónico y potencial probiótico.
- Determinar directamente en queso fresco el potencial antagónico de la cepa de BAL con mayor efecto antagónico y potencial probiótico, contra diferentes microorganismos patógenos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material de uso general

Asas para siembra de platino, Bolsas estériles Nasco WHIRL-PAK, Cajas petri estériles desechables, Phoenix Biomedical; Charolas de aluminio; Espátulas; Frascos PIREX con tapón 250, 500 y 1000 mL; Gradillas para tubo; Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL; Mecheros bunsen; Piceta; Pipetas Pasteur; Portaobjetos LAUKA; Probetas graduadas de 50 y 100 mL Kimax; Puntas para micropipetas; Termómetro; Tubos de ensaye con tapón de rosca PIREX; Varilla de vidrio; Vasos de precipitado de 100 mL; Vernier Scala.

5.2 Equipo de laboratorio

Autoclave Felisa Mod FE-399

Autoclave Yamato Scientific. Sterilizer SM 200

Balanza analítica Adam Equipment Mod. AQT 1500

Campana de flujo laminar LABCONCO CORPORATION Mod. 36208-04

Cuenta colonias DARKFIELD QUEBEC Mod. 3325 American Optical

Dispensador Dispensette® III Var. 1-10 mL Brand

Homogeneizador para muestras. Seward Stomacher. Lab Blender. Mod. 400 circulator.

Incubadora LAB-LINE AMBI-HI-LOW

Incubadora bacteriológica blue M Electric Company Mod. 100^a

Incubadora bacteriológica blue M Electric Company Mod. 200^a

Incubadora precision 3BG Serie 30307629

Micropipeta LABMATE* 100-1000 µL

Micropipeta LABMATE* 20-200 µL

Microscopio Motic® Mod. SFC-28 Instrumentos Ópticos de Precisión S.A. de C.V.

Parrilla de calentamiento. Barnstead Thermolyne. Cimarec

Potenciómetro Thermo Electron Corporation. Orión Star Series

Refrigerador LAB-LINE Environeers REB800/804

Vortex 2 Genie Mod. G-560 Scientific Industries

5.3 Reactivos y medios de cultivo

Agar bacteriológico Bioxon de México

Agar para métodos estándar Bioxon, Becton Dickinson

Agua destilada

Agua oxigenada al 3 %

Alcohol etílico 96 °G. L. sin desnaturalizar grado reactivo

Antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, sulfisoxazol, colistina, estreptomicina, eritromicina, ácido nalidíxico, kanamicina, neomicina, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol, amikacina, trimetoprim/sulfametoxazol, ceftriaxon y ciprofloxacina)

Caldo MRS Difco™, Becton Dickinson

Caldo soya tripticaseína Bioxon, Becton Dickinson

Cloruro de Calcio, Baker Analyzed

Colorantes GRAM, Reactivos Químicos HYCEL

Cuajo

Cultivos lácticos LYOBAC – D, Mofin Alce Group

HCl J. T. Baker

Hidratos de carbono, Reactivos Químicos HYCEL (Ácido pirúvico, arabinosa, arginina, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, Melibiosa, Rafinosa, Ramnosa, ribosa, sacarosa, sorbitol, Trealosa, xilosa)

Leche pasteurizada

Peptona de caseína Bioxon, Becton Dickinson

Reactivo de Ehrlich, modificación de Kovacs Reactivos Químicos HYCEL

Solución buffer pH 4, 7 y 10. Thermo Electron Corporation

5.4 Material biológico

Los microorganismos patógenos de prueba resistentes a rifampicina fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* O157:H7 E09 donada por el Dr. Eduardo Fernández Escartín de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.5 Aislamiento y selección de las cepas

La selección de los alimentos para la obtención de las cepas de bacterias ácido lácticas se realizó teniendo en cuenta que fueran elaborados de manera artesanal en el estado de Hidalgo (queso ranchero, queso tenate, queso Oaxaca, queso panela, pulque), además de frutas y hortalizas. Dichos productos se compraron en diversos establecimientos y fueron transportados en una hielera al laboratorio de Microbiología de Alimentos de Química de Alimentos en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde se llevó a cabo su análisis.

5.6 Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se realizaron diluciones decimales de cada una de las muestras. Para ello se pesaron 25 g de la muestra en una bolsa estéril y se suspendieron en 225 mL de diluyente de peptona. Posteriormente se realizaron diluciones mediante la transferencia de 1 mL de la muestra a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de diluyente de peptona, considerando ésta como la dilución 10^{-1} . De

esta dilución se tomó 1 mL y se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

5.6.1 Bacterias ácido lácticas

Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas se empleó la técnica de extensión por superficie; para ello, se inocularon 100 μ L de cada una de las diluciones sobre placa de agar MRS conteniendo el antibiótico natamicina para inhibir el crecimiento de levaduras. El inóculo fue extendido con varilla de vidrio. Las placas inoculadas se incubaron a 30 °C durante 24-72 h.

5.6.2 Selección de bacterias ácido lácticas

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas de MRS se seleccionaron 10 colonias que presentaron la morfología macroscópica típica de las bacterias ácido lácticas (tamaño entre 2.0 y 5.0 mm de diámetro; color: blanco, amarillo, beige; opacidad: transparente, opaca; consistencia: cremosa, pastosa, dura) y posteriormente se resembraron por estría en agar nuevas cajas de agar MRS y se incubaron a 30 °C durante 24-48 h. Posteriormente se realizaron las siguientes pruebas: tinción de Gram, prueba de catalasa y prueba de oxidasa para confirmar por medio de estas técnicas que las colonias seleccionadas realmente fueron bacterias ácido lácticas.

5.6.2.1 Tinción Gram

Se colocó una gota de agua en un portaobjetos, se tomó con la ayuda de un asa bacteriológica una fracción de una colonia y se extendió en el portaobjetos, se mezcló uniformemente con el agua. La muestra se fijó a la flama, se adicionaron unas gotas de cristal violeta hasta cubrir la muestra, se dejó por 1 minuto, el exceso se eliminó con agua corriente, después se le adicionó lugol por 1 minuto y se lavó con agua, después se adicionó una solución de alcohol por 20 segundos para decolorar, se enjuagó con agua para eliminar el alcohol y se agregó safranina por 1

minuto; por último, se lavó con agua destilada y se dejó secar la muestra al aire. Las tinciones se observaron al microscopio a 100x para buscar características típicas de las bacterias ácido lácticas (figura 3).

5.6.2.2 Prueba de catalasa

Se tomó con un asa estéril una fracción de una colonia de cultivo de 18 a 24 h de desarrollo en agar MRS y se colocó sobre un portaobjetos, se le agregó una gota de H₂O₂, si no hubo formación de burbujas se consideraron catalasa negativa, siendo esta una característica propia de las bacterias ácido lácticas (Mac Faddin, 1990).

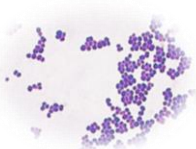

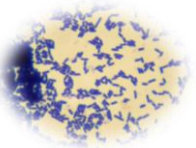

Morfología	Gram positivas	Gram negativas
Cocos		
Bacilos		

Figura 3. Identificación morfológica microscópica de las BAL.

5.6.2.3 Prueba de la oxidasa

En un trozo de papel filtro de aproximadamente 3 x 3 cm, se colocaron unas gotas del reactivo de Kovacs para oxidasa (clorhidrato u oxalato de tetrametil-p-

fenilendiamina al 1 %). Se tomó con un asa estéril una colonia y se colocó sobre el papel filtro extendiéndola cuidadosamente. Se esperó por 1 minuto para observar si existía algún cambio en la coloración. Se consideró oxidasa negativo a las que no presentaron dicho cambio (Mac Faddin, 1990).

5.7 Evaluación *in vitro* del potencial probiótico

5.7.1 Actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron a cada una de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas. Los microorganismos patógenos que se utilizaron para este ensayo fueron: *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Las bacterias patógenas fueron inoculadas en caldo soya tripticaseína (CST) a 37 °C por 48 h, transcurrido este tiempo se realizaron diluciones hasta llegar a 10⁻³, de esta última dilución se tomó 1 mL y se colocó en una caja de petri, se adicionó agar métodos estándar (AME), se homogeneizó y dejó solidificar, después se procedió a la realización de 6 pozos por cada caja de aproximadamente 5 mm de diámetro.

En cada pozo se añadieron 50 µL de la bacteria láctica previamente cultivada en agar MRS a 30 °C durante 48 h, se dejó secar y difundir por 2 h y después se incubaron a 37 °C durante 24 h, posterior a este tiempo se midieron los halos de inhibición como se muestra en la figura 4. Las bacterias ácido lácticas que mostraron actividad inhibitoria frente a los patógenos, se les determinó su resistencia al pH, resistencia a sales biliares, sensibilidad frente a diversos antibióticos y se les realizó su identificación bioquímica y molecular.

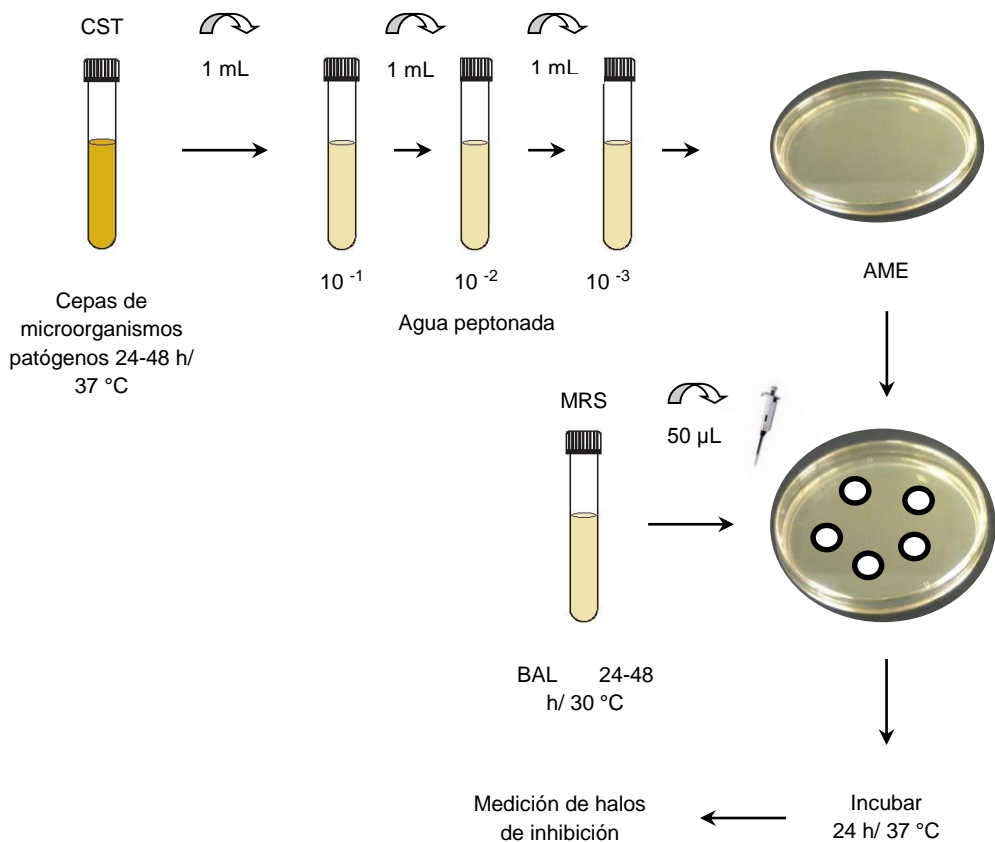


Figura 4. Procedimiento para la determinación de actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas frente a patógenos por la técnica de difusión en pozos.

5.7.2 Resistencia a pH

Las bacterias ácido lácticas se cultivaron en caldo MRS y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, el cultivo se homogeneizó y se realizaron diluciones con agua peptonada hasta llegar a una concentración aproximada de 10⁵ ufc/mL. Paralelamente se prepararon tubos de agua peptonada ajustando a pH 2 y 3. Por separado, se inocularon los tubos de agua peptonada con 1 mL del inoculo (10⁵ ufc) de cada cepa, se homogeneizó y los tubos se almacenaron por 2 horas. A los tiempos 0, 1 y 2 horas se efectuó el conteo de las bacterias sobrevivientes por medio de la técnica de vertido en placa; para ello, por separado, se tomó 1 ml de cada microorganismo y de cada tubo, se colocó en una caja de petri y se le adicionó agar MRS, se homogeneizó y se dejó solidificar, por último se incubó a 30 °C/ 48h

y se realizó el conteo para evaluar la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas a las condiciones de pH (figura 5).

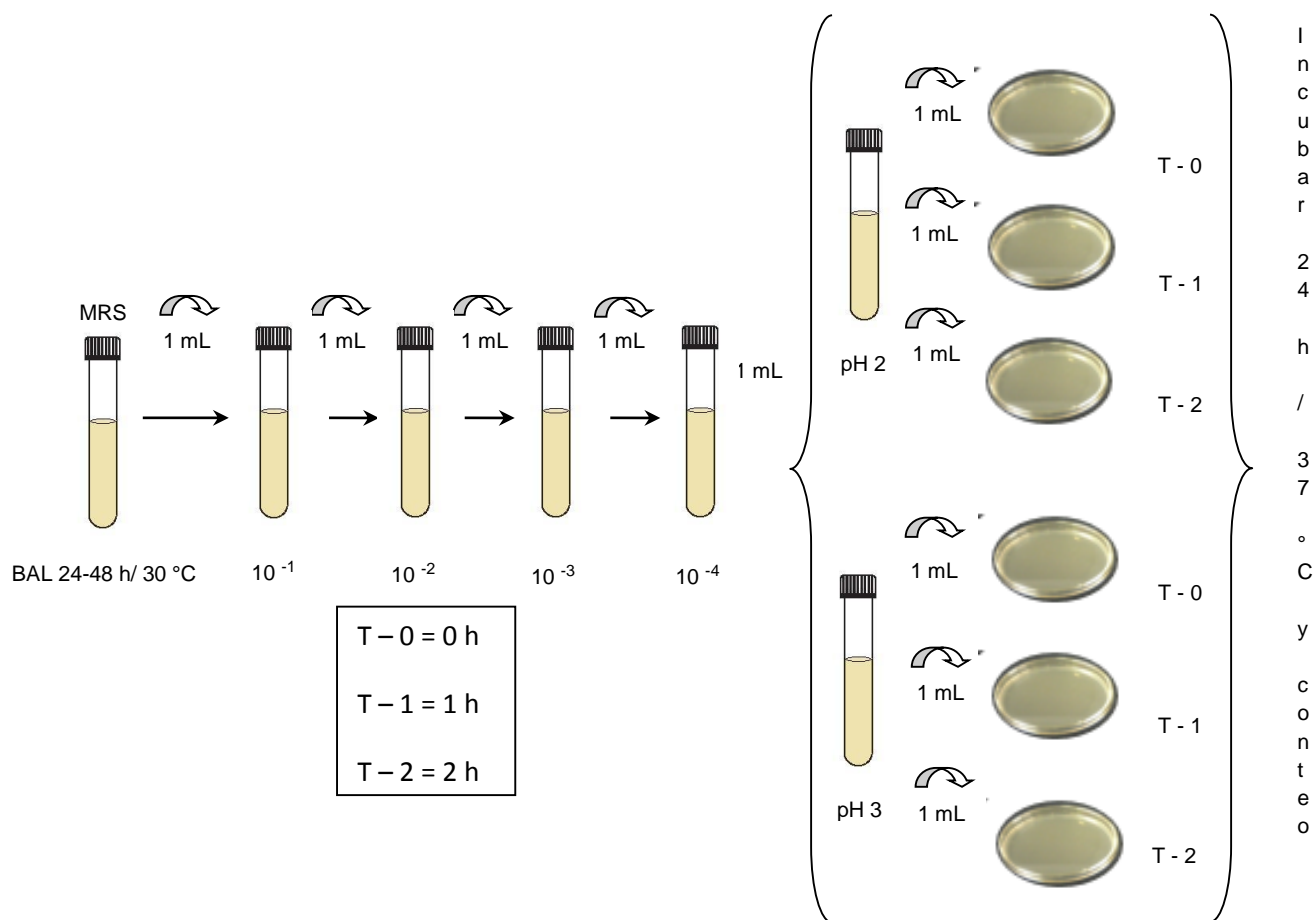


Figura 5. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a pH.

5.7.3 Resistencia a sales biliares

Para la evaluación de la resistencia de las cepas a sales biliares, se reactivaron las bacterias ácido lácticas en caldo MRS y se incubaron a 30 °C por 24 h. Se prepararon tubos de CST conteniendo bilis deshidratada de buey a una concentración final de 0.15, 0.3, 0.5 y 1 %, se tomaron 10 μ L del cultivo directo (concentración del inóculo: 10^6 ufc), se inocularon en los tubos de CST y se incubaron a 30 °C durante 48 h; pasado el tiempo únicamente se observó si existía o no turbidez (figura 6).

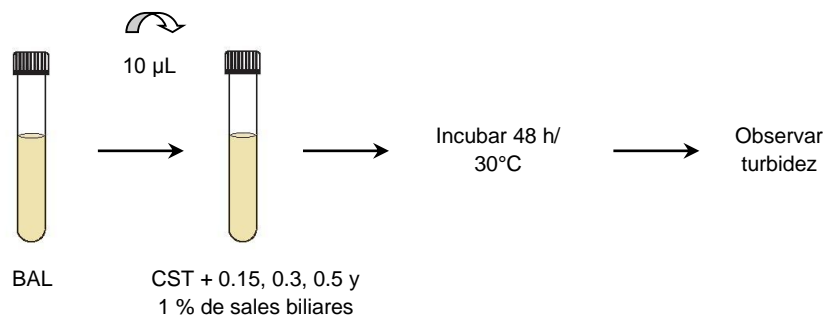


Figura 6. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares.

5.7.4 Sensibilidad a antibióticos

Se utilizó la técnica de difusión en disco sobre agar MRS de Kirby-Bauer. Se tomó una colonia de la cepa a ensayar, se sembró en caldo MRS e incubó a 30 °C por 18 h. Después de transcurrido este tiempo se obtuvo un cultivo joven del cual se tomaron 100 µL conteniendo éste una concentración aproximada de 10^6 - 10^7 ufc/mL, se colocó sobre agar MRS solidificado y se extendió con ayuda de una varilla de vidrio, se colocaron los discos sobre la placa y a continuación se depositaron 10 µL de los antibióticos a evaluar, se dejó difundir por completo en campana de flujo laminar y finalmente se incubaron a 30 °C por 24 h. Pasado este tiempo se midieron con un Vernier los halos de inhibición. Por este método se midió la sensibilidad de las bacterias ácido lácticas frente a los antibióticos (figura 7). Los antibióticos utilizados para el ensayo fueron: ampicilina 10 µg/mL, amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg/mL, sulfisoxazol 250 µg/mL, colistina 10 µg/mL, estreptomicina 10 µg/mL, eritromicina 15 µg/mL, ácido nalidíxico 30 µg/mL, kanamicina 30 µg/mL, neomicina 10 µg/mL, tetraciclina 30 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL, cloranfenicol 30 µg/mL, amikacina 30 µg/mL, trimetoprim/sulfametoxazol 1.25/23.75 µg/mL, ceftriaxon 30 µg/mL y ciprofloxacina 5 µg/mL.

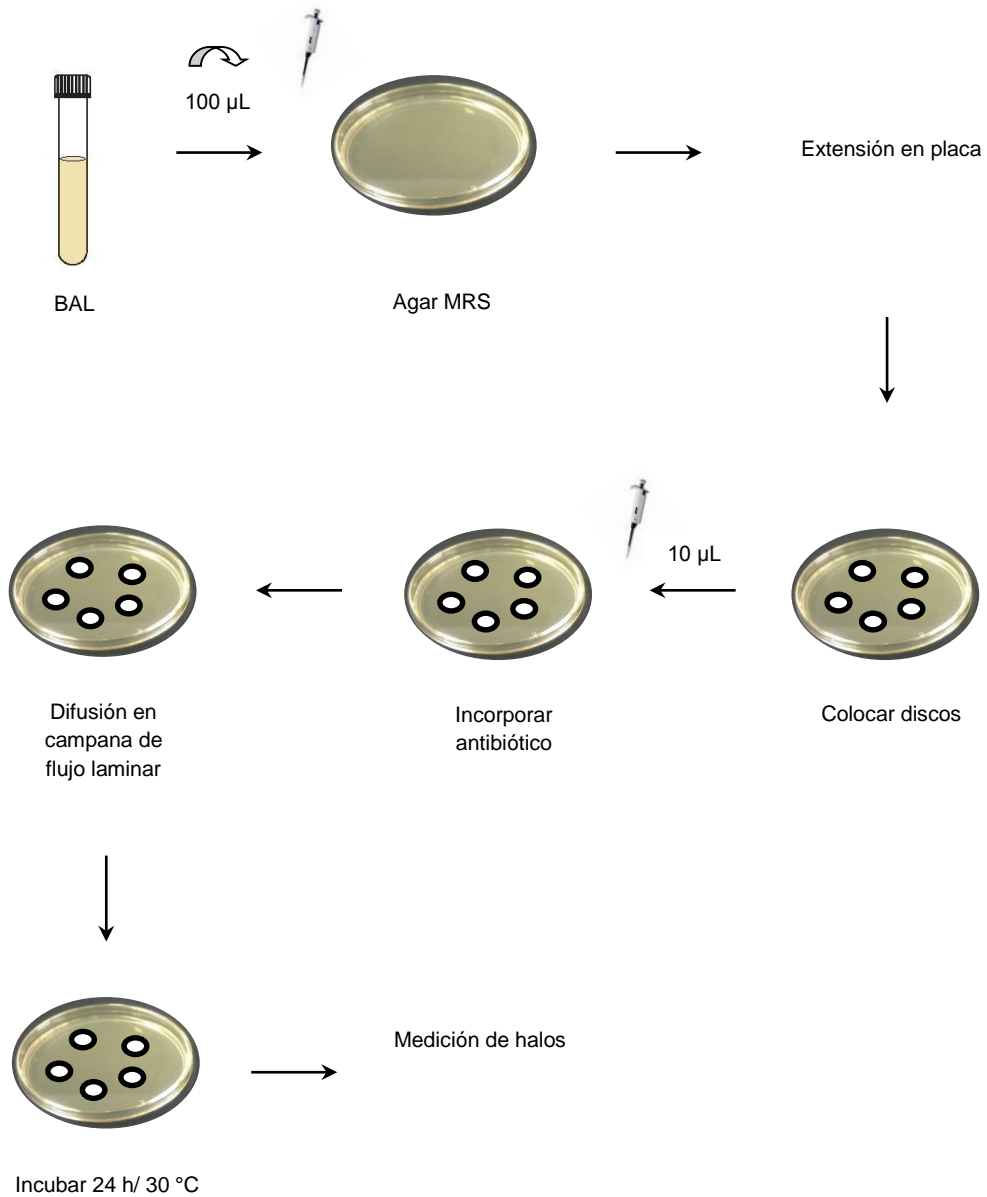


Figura 7. Técnica para la prueba de sensibilidad de bacterias ácido lácticas a antibióticos.

5.8 Identificación bioquímica

Las cepas Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas con actividad antimicrobiana se identificaron mediante pruebas bioquímicas.

5.8.1 Desarrollo a diferente pH

Las cepas de BAL fueron incubadas en tubos con 3 mL de caldo soya tripticaseína a 30 °C durante 7 días a diferentes valores de pH: 4.5, 6.5 y 9.5 (el pH se ajustó con una solución de NaOH 1N y HCl 0.5 M), cada 24 h se revisaron los tubos para buscar desarrollo visible (turbidez) de las cepas de los tubos de cultivo.

5.8.2 Desarrollo a diferente temperatura

Se inocularon las cepas de BAL en tubos con 3 mL de caldo MRS y se incubaron durante 7 días a diferentes temperaturas: 10 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C, cada 24 h se revisaron los tubos para buscar desarrollo visible (turbidez) de las cepas de los tubos de cultivo.

5.8.3 Desarrollo a diferente concentración de NaCl

Las cepas de BAL se incubaron en tubos con 3 mL de caldo soya tripticaseína y diferentes concentraciones de NaCl: 2, 3, 4, 6.5 y 10 % a 30 °C durante 7 días; cada 24 h se revisaron los tubos para buscar desarrollo visible (turbidez) de las cepas de los tubos de cultivo.

5.8.4 Producción de CO₂

Para determinar si las cepas de BAL fueron homofermentativas o heterofermentativas, se inocularon en tubos con 3 mL de caldo MRS con campanas Durham en baño María a 45 °C durante 48 h, la formación de gas en la campana se tomó como indicativo de heterofermentativas.

5.8.5 Prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer (MR-VP)

Las cepas de BAL fueron inoculadas en tubos con 3 mL de caldo MR-VP e incubadas a 30 °C durante 72 h, posteriormente se agregaron 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo, la aparición de un color rojo indicó una reacción positiva. Para el caso de la reacción de VP, se utilizó el mismo tipo de caldo, solo que a los tubos de caldo en lugar del reactivo de rojo de metilo se les agregó, dos gotas de solución de alfa naftol, dos gotas de la solución de hidróxido de potasio al 5 % y unos cristales de creatinina, en el orden señalado. Después de dos horas a temperatura ambiente, la aparición de un color rosa reveló la presencia de acetil metil carbonil ó acetoína lo que se consideró positivo para la prueba de VP o una coloración amarilla indicó reacción negativa.

5.8.6 Sobrevivencia a tratamiento térmico

Las cepas de BAL fueron incubadas a 30 °C durante 24 h en tubos con 3 mL de caldo MRS, transcurrido este tiempo se colocaron en baño María a 63 °C durante 30 min, se tomaron 100 µL y se vertieron en cajas petri con agar MRS previamente solidificado, se realizó una extensión en placa e incubó a 30 °C durante 24 h, posteriormente se observó si hubo crecimiento de colonias en las cajas inoculadas.

5.8.7 Fermentación de azúcares

Después de incubar las cepas de BAL en tubos con 3 mL de caldo MRS a 30 °C durante 24 h, por separado se tomaron 10 µL de cada cultivo y se inocularon los tubos con los 20 azúcares a probar. Los azúcares se prepararon al 1% en caldo nutritivo, agregando 1 mL de caldo-azúcar a cada tubo, se incubaron a 30 °C durante 24-48 h; los azúcares utilizados fueron:

Ácido pirúvico	Inositol	Ramnosa
Arabinosa	Lactosa	Ribosa
Arginina	Maltosa	Sacarosa
Esculina	Manitol	Sorbitol
Fructosa	Manosa	Trealosa
Galactosa	Melibiosa	Xilosa
Glucosa	Rafinosa	

5.9 Identificación molecular

Después de la identificación bioquímica se sometió solo a 4 cepas de bacterias ácido lácticas a una identificación molecularmente mediante secuenciación de la subunidad 16S Ribosomal. Para el proceso de identificación se llevarán a cabo las siguientes actividades: 1) Diseño de primers para las especies en estudio. 2) Desarrollo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la amplificación de fragmentos de DNA seleccionados. 3) Verificación de amplímeros para secuenciación mediante electroforesis y 4) Secuenciación genómica.

5.10 Desarrollo de queso fresco con potencial probiótico

Par este estudio final solo se empleó una cepa del bacteria acido láctica (BAL) la denominada QT 20, ello porque fue la cepa de BAL que mostro el mayor potencial probiótico en los estudios efectuados *in vitro* (mayor efecto antagónico, y mayor resistencia al pH, sales biliares, alta temperatura y resistencia a antibióticos). Se preparó dos tipos de queso: uno conteniendo a la BAL QT 20 (queso T1) y otro que no contenía a esta BAL (queso T2).

A continuación se muestran las principales etapas en la elaboración del queso fresco conteniendo y no la BAL denominada QT 20 (figura 8).

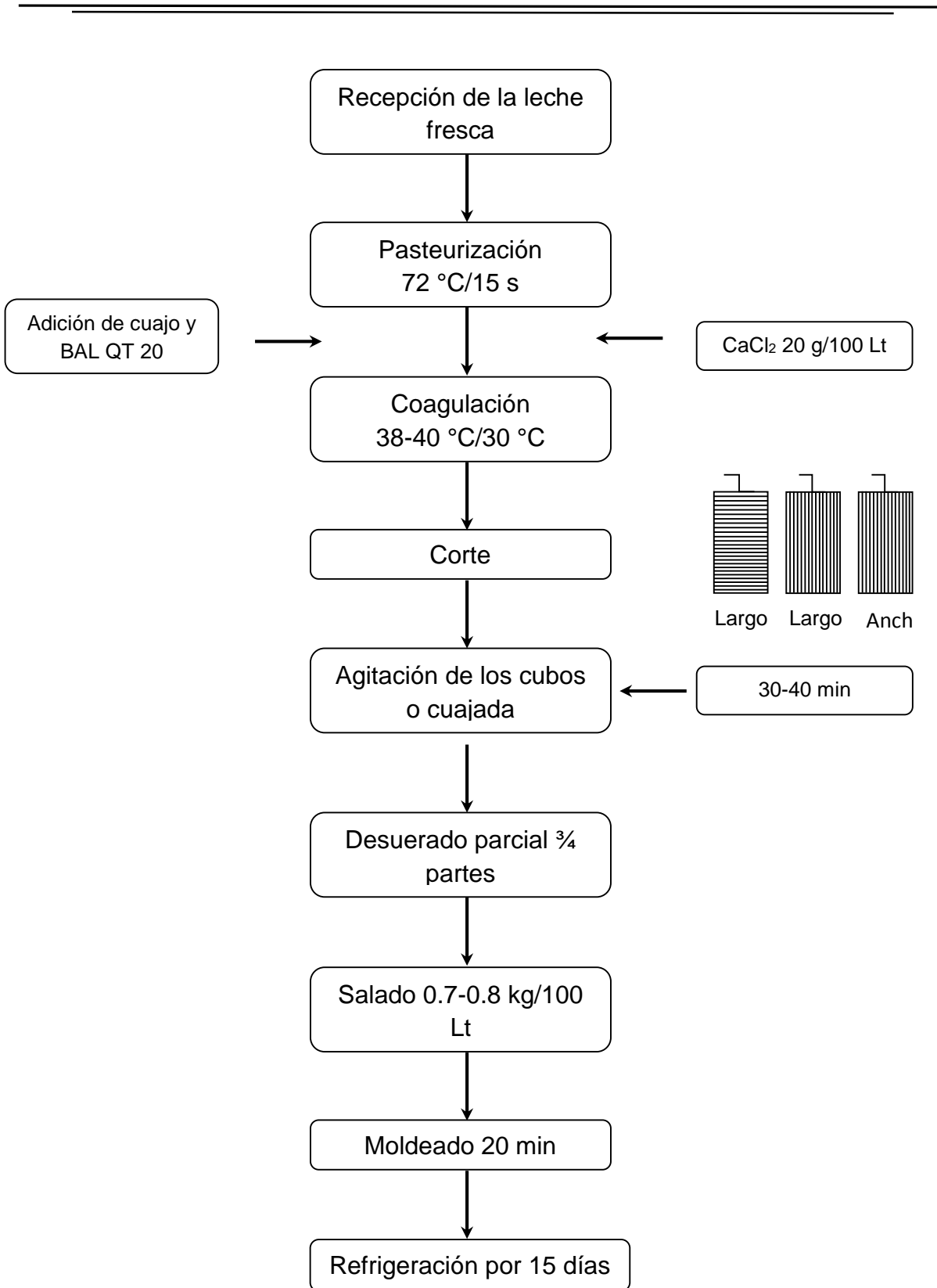


Figura 8. Etapas principales en la elaboración de queso fresco con potencial probiótico.

5.10.1 Evaluación del potencial antagónico de queso fresco elaborado con la cepa de BAL QT 20.

Queso fresco conteniendo y no la BAL QT 20 fue cortado en trozos de aproximadamente 2 x 2 cm. Paralelamente, cultivos de 18 h en CST de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* fueron lavados en SSI por centrifugación y se preparan diluciones en diluyente de peptona a una concentración aproximada de 10^5 ufc/ml. Por separado, cada trozo fue inoculado con 10 μ l de los cultivos lavados y diluidos de los microorganismos patógenos para tener una concentración final por trozo de queso de aproximadamente 10^3 ufc. El queso se refrigeró durante 15 días y durante este tiempo se realizaron conteos microbiológicos diarios mediante la técnica de vertido en placa utilizando AST con rifampicina (100 mg/L) con el fin de evaluar la sobrevivencia de los microorganismos patógenos (figura 9).

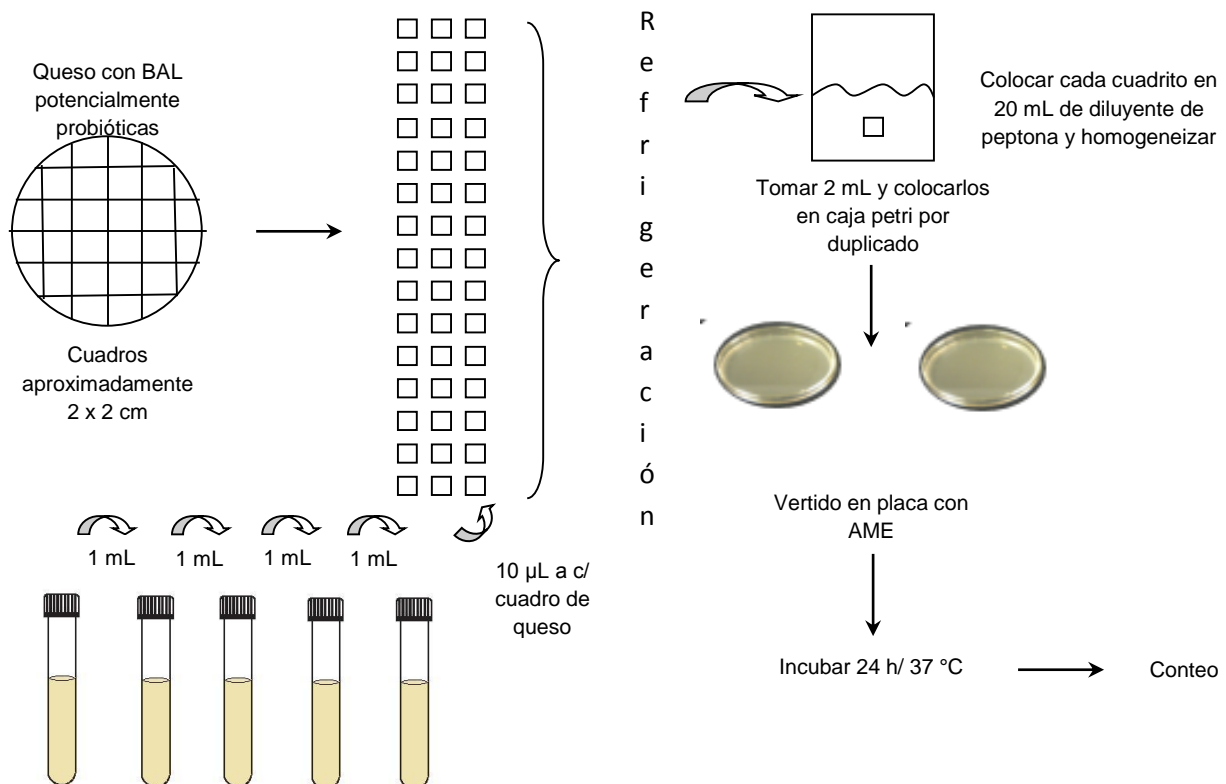


Figura 9. Diagrama de la evaluación del comportamiento de microorganismos patógenos en queso adicionado con la BAL QT 20.

6. Resultados y Discusión

6.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se analizaron un total de 14 muestras de alimentos, entre los cuales había productos lácteos elaborados de manera artesanal, frutas, hortalizas y pulque. Los productos analizados se adquirieron en mercados públicos y tiendas provenientes de distintas localidades en el estado de Hidalgo.

De las 14 muestras de alimentos analizadas, cuatro correspondieron a quesos (Oaxaca, panela, tenate y ranchero), siete a frutas y hortalizas (zanahoria, zarzamora, uvas, piña, nopal y germinado de alfalfa y frijol mungo), una a carne molida de res, una a pulque y una a leche búlgara.

De cada muestra se seleccionaron de 5 a 7 colonias presuntivas de BAL basándose en su morfología macroscópica, figura 10 (colonias blancas, pequeñas, translúcidas, redondas de aspecto cremoso, de bordes enteros, aspecto puntiforme y de superficie convexa), morfología microscópica, bacilar y cocoide, Gram positivas, y por medio de pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa negativas), tabla 4 (Wood y Holzapfel, 1995).

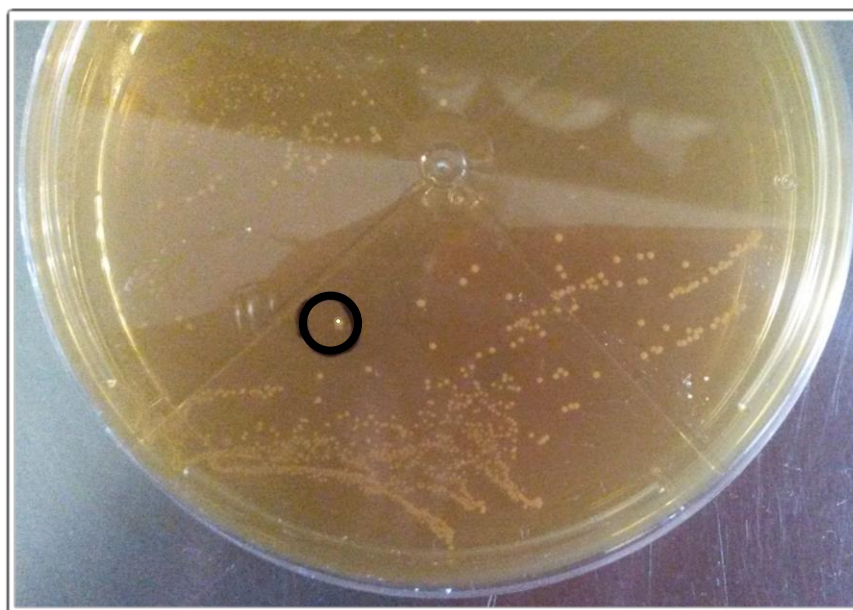


Figura 10. Crecimiento típico de BAL en medio de cultivo sólido.

Para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas (principalmente *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*) se utiliza comúnmente el medio MRS, ya que este, es un medio de cultivo selectivo en el cual tienen buen desarrollo estas bacterias al agrupar el citrato, acetato, Tween 80, Mg²⁺ y Mn²⁺, estos actúan como factores de crecimiento para las bacterias ácido lácticas, principalmente lactobacilos (Charles, 1998).

Se aisló un total de 117 cepas de las muestras analizadas; no obstante sólo 42 cumplieron con las características morfológicas y bioquímicas para ser consideradas como bacterias ácido lácticas (tabla 4). Con cada una de las 42 cepas identificadas como bacteria ácido láctica, se procedió a evaluar la actividad antagonista en medio de cultivo.

Tabla 4. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas presuntivas BAL aisladas de diversos alimentos

Fuente de Aislamiento	Código de cepas	Morfología	Características		
			Gram	Catalasa	Oxidasa
Pulque	SA1	Bacilo	+	-	-
Pulque	SA2	Bacilo	+	-	-
Pulque	M2	Coco	+	-	-
Pulque	M3	Bacilo	+	-	-
Pulque	M4	Coco	+	-	-
Pulque	EP5	Coco	+	-	-
Pulque	T1	Coco	+	-	-
Pulque	T2	Coco	+	-	-
Pulque	T3	Coco	+	-	-
Pulque	1B	Coco	+	-	-
Pulque	P20	Coco	+	-	-
Zanahoria	Zh13a	Cocobacilo	+	-	-
Zanahoria	Zh13b	Cocobacilo	+	-	-
Zanahoria	Zh13c	Cocobacilo	+	-	-
Zanahoria	Zh13d	Cocobacilo	+	-	-
Zanahoria	Zh23a	Cocobacilo	+	-	-
Zanahoria	Zh24b	Cocobacilo	+	-	-
Queso Oaxaca	Qo13d	Cocobacilo	+	-	-
Queso Oaxaca	Qo23c	Bacilo	+	-	-
Carne molida	20b	Coco	+	-	-
Carne molida	21	Coco	+	-	-
Zarzamora	28	Coco	+	-	-
Zarzamora	41	Bacilo	+	-	-
Corteza de piña	46	Coco	+	-	-
Corteza de piña	48	Bacilo	+	-	-
Germinado frijol	Gf2a	Bacilo	+	-	-
Búlgaros	B1-1	Cocobacilo	+	-	-
Queso Panela	QP2x	Coco	+	-	-

Queso Panela	QP2y	Coco	+	-	-
Queso rancho	QR5	Bacilo	+	-	-
Queso rancho	QR7	Cocobacilo	+	-	-
Queso rancho	QR24	Bacilo	+	-	-
Queso rancho	QR25	Bacilo	+	-	-
Queso rancho	QR26	Coco	+	-	-
Queso rancho	QR27	Cocobacilo	+	-	-
Queso rancho	QR49	Cocobacilo	+	-	-
Queso tenate	QT12	Bacilo	+	-	-
Queso tenate	QT17	Bacilo	+	-	-
Queso tenate	QT19	Bacilo	+	-	-
Queso tenate	QT20	Bacilo	+	-	-
Queso tenate	QT21	Coco	+	-	-
Queso tenate	QT22	Coco	+	-	-

6.2 Actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas

La actividad inhibitoria o antagónica de las 42 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas se evaluó contra 4 microorganismos patógenos: *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*, mediante la técnica de difusión en pozos. De las 42 cepas analizadas, 40 mostraron actividad antimicrobiana contra alguno de los patógenos de prueba (tabla 5). El patógeno con mayor sensibilidad al compuesto o compuestos generados por las bacterias ácido lácticas fue *Salmonella*, estos resultados concuerdan con los reportados por González *et al.*, (2004); mientras que *E. coli* O157:H7 fue el microorganismo patógeno más resistente. Por otro lado, 24 cepas mostraron un efecto inhibitorio contra los 4 patógenos de prueba, 13 de ellas fueron aisladas de muestras de queso tenate y queso rancho, las otras 11 provienen de muestras de pulque.

Tabla 5. Efecto inhibitorio o antagónico de bacterias ácido lácticas (mm) contra diferentes bacterias patógenas por la técnica de difusión en pozos.

Diámetro de inhibición en mm, desviación estándar (\pm)				
BAL	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
SA1	18.0 \pm 0.9	18.0 \pm 0.7	18.0 \pm 0.7	19.0 \pm 1.5
SA2	12.0 \pm 1.2	12.0 \pm 1.1	14.5 \pm 1.2	14.0 \pm 1.2
M2	11.0 \pm 0.7	11.0 \pm 0.5	14.0 \pm 1.6	14.0 \pm 0.9
M3	17.0 \pm 1.5	10.5 \pm 0.4	15.0 \pm 0.9	10.5 \pm 0.5
M4	12.0 \pm 0.8	11.0 \pm 1.2	14.0 \pm 0.3	14.0 \pm 1.4
EP5	13.5 \pm 1.3	11.5 \pm 0.6	12.0 \pm 0.8	12.0 \pm 0.6
T1	14.0 \pm 2.1	11.0 \pm 0.5	13.0 \pm 0.5	9.0 \pm 0.8
T2	14.0 \pm 0.6	13.0 \pm 1.2	13.0 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6
T3	15.0 \pm 0.9	10.0 \pm 1.2	13.0 \pm 0.5	10.5 \pm 0.3
1B	14.0 \pm 1.3	15.0 \pm 0.5	14.0 \pm 0.6	13.0 \pm 1.2
P20	13.3 \pm 0.2	14.3 \pm 1.3	12.7 \pm 1.4	14.0 \pm 0.2
Zh13a	12.5 \pm 0.6	15.0 \pm 0.9	14.5 \pm 0.7	13.6 \pm 0.8
Zh13b	13.6 \pm 0.6	16.5 \pm 0.5	14.5 \pm 0.9	14.6 \pm 0.5
Zh13c	13.0 \pm 1.0	15.5 \pm 0.5	13.3 \pm 0.5	14.1 \pm 0.4
Zh13d	13.1 \pm 0.2	14.5 \pm 0.6	14.1 \pm 0.9	13.2 \pm 0.8
Zh23a	12.6 \pm 0.6	14.3 \pm 2.6	13.5 \pm 0.4	13.8 \pm 1.2
Zh24b	12.3 \pm 0.3	13.1 \pm 0.4	13.8 \pm 0.6	13.6 \pm 0.8
Qo13d	13.6 \pm 0.6	13.2 \pm 0.3	13.1 \pm 0.3	13.9 \pm 0.8
20b	12.1 \pm 0.4	11.8 \pm 1.6	13.2 \pm 1.1	12.6 \pm 0.4
21	12.4 \pm 2.0	12.2 \pm 2.4	12.4 \pm 0.5	10.9 \pm 0.7
28	12.8 \pm 0.8	13.7 \pm 1.2	12.9 \pm 0.9	13.1 \pm 0.7
41	12.6 \pm 0.7	13.4 \pm 0.4	12.8 \pm 0.8	13.0 \pm 0.5
46	12.0 \pm 0.6	13.0 \pm 0.2	12.4 \pm 0.4	12.6 \pm 0.3
48	10.7 \pm 0.9	12.5 \pm 0.4	11.6 \pm 0.7	12.1 \pm 0.4
Gf2a	15.0 \pm 1.0	18.7 \pm 1.2	16.2 \pm 0.8	17.4 \pm 0.5
B1-1	12.7 \pm 0.4	13.4 \pm 0.7	13.2 \pm 0.4	12.8 \pm 0.6
QP2x	10.1 \pm 0.2	12.1 \pm 1.5	11.5 \pm 0.4	10.9 \pm 0.3

QP2y	6.7 ± 5.9	13.1 ± 0.3	9.4 ± 0.8	11.3 ± 0.4
QR5	17.0 ± 6.1	17.7 ± 1.5	17.0 ± 3.6	17.0 ± 1.7
QR7	17.7 ± 3.5	18.3 ± 2.0	17.7 ± 3.5	16.7 ± 1.1
QR24	16.3 ± 2.5	19.3 ± 2.8	17.0 ± 4.5	16.7 ± 1.5
QR25	14.3 ± 1.5	18.7 ± 1.5	16.3 ± 3.5	17.3 ± 1.1
QR26	14.8 ± 3.2	16.0 ± 3.5	14.3 ± 3.5	15.3 ± 2.2
QR27	16.3 ± 1.2	18.0 ± 1.0	17.0 ± 4.3	16.7 ± 1.5
QR49	17.7 ± 3.2	16.7 ± 0.5	16.3 ± 4.0	15.0 ± 0.0
QT12	12.5 ± 0.8	12.7 ± 1.9	13.0 ± 2.8	14.0 ± 1.6
QT17	14.5 ± 2.3	13.0 ± 2.7	14.0 ± 0.8	14.0 ± 1.5
QT19	12.5 ± 1.8	9.5 ± 7.4	13.8 ± 1.4	14.8 ± 0.9
QT20	16.9 ± 1.2	14.1 ± 0.9	16.2 ± 1.1	15.7 ± 1.5
QT21	13.5 ± 2.4	13.0 ± 1.5	14.3 ± 2.2	14.0 ± 1.0
QT22	11.7 ± 1.0	13.3 ± 1.3	12.8 ± 0.9	13.0 ± 1.0

Las cepas aisladas de los quesos tenate y ranchero, así como de una muestra de pulque, mostraron mayor actividad inhibitoria, quizá al ser productos elaborados de manera artesanal y que no reciben ningún tratamiento térmico que afecte la flora microbiana nativa. Como se observa en la tabla 5 la mayoría de éstas cepas presentan halos de inhibición superiores a los 13 mm de diámetro (figura 11). Sólo una cepa aislada del pulque tuvo un comportamiento similar, mientras que el resto de las cepas aisladas del mismo producto, mostraron un efecto menor al de las mencionadas anteriormente.

Las BAL se han utilizado en la alimentación desde tiempo atrás, es posible encontrarlas en diversos alimentos como la leche cruda, yogurt, quesos frescos y madurados, estos últimos se consideran un reservorio importante de este tipo de microorganismos como se pudo comprobar en este estudio que se aislaron 117 cepas de 14 muestras de alimentos.

El pulque es una bebida fermentada acida-alcohólica; se ha reportado que se han recuperado más de 50 géneros diferentes en muestras de pulque, entre los géneros identificados se encuentran *Lactobacilos*, *Leuconostoc*, *Micrococcos*, entre otros (Cervantes y Pedroza, 2008).

Además de los productos lácteos, se obtuvieron cepas de bacterias ácido lácticas de alimentos cárnicos, y de frutas y hortalizas, los cuales tuvieron actividad inhibitoria contra especies de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* que son microorganismos de importancia en la salud pública (González *et al.*, 2004 y Yang, 2000).

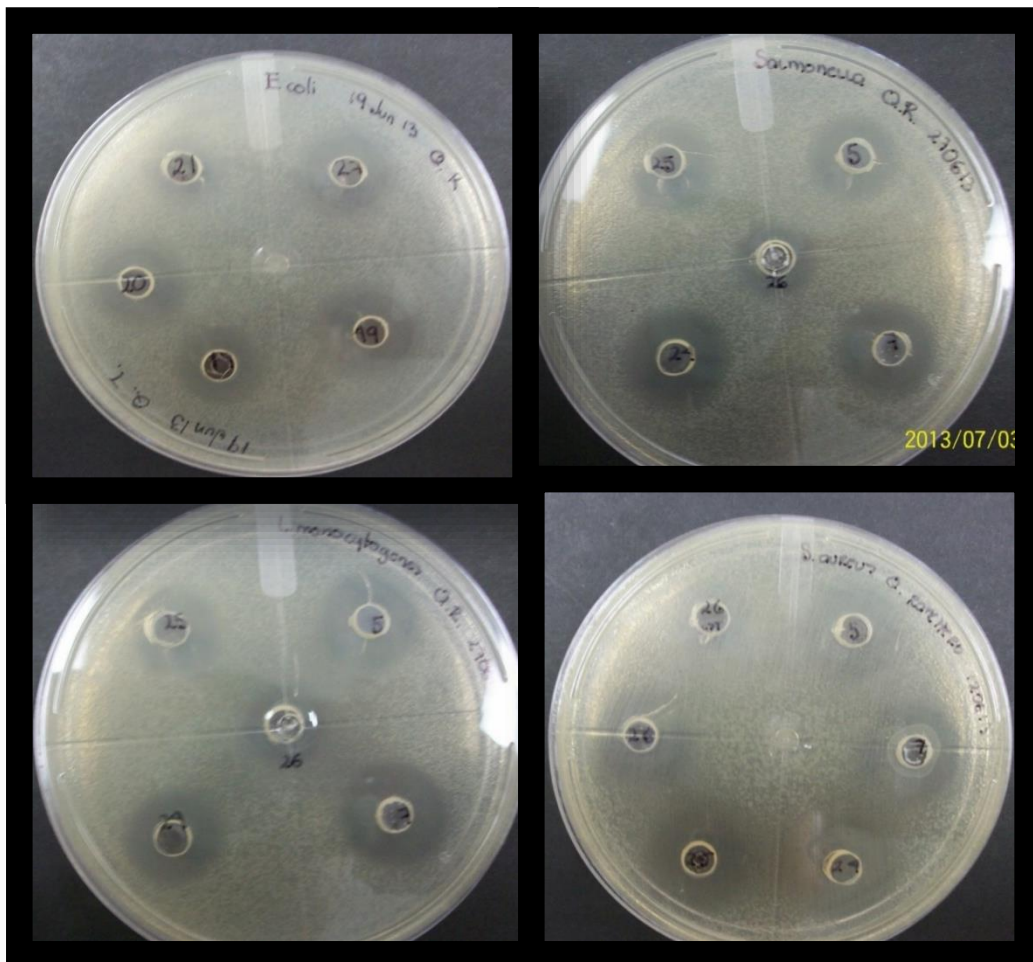


Figura 11. Actividad inhibitoria o antagónica de cepas de BAL contra *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

La actividad inhibitoria mostrada por bacterias ácido lácticas contra *L. monocytogenes*, es de gran importancia ya que éste es un microorganismo que origina problemas en la salud, infecciones en la gestación, meningoencefalitis, entre otros. Este microorganismo es termolábil y puede ser destruido durante la cocción, sin embargo es más resistente al calor que otros patógenos (Torres, 2002).

La resistencia que presentó *E. coli* O157:H7 ante las bacterias ácido lácticas podría deberse a que al ser una bacteria Gram negativa, contiene aparte de la pared celular, una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de ciertas macromoléculas como lo son las bacteriocinas o enzimas. Esta membrana consiste en una capa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos (capa externa) y proteínas que la atraviesan, que delimitan poros hidrófilos (porinas) que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular por lo que la sensibilidad es diferente (Prescott *et al.*, 1999).

Las sustancias de bajo peso molecular (diacetilo, peróxido de hidrógeno y ácido láctico) producidas por las bacterias ácido lácticas pasan a través de las porinas dañando la permeabilidad de la membrana exterior hasta debilitarla.

Algunas de las bacterias ácido lácticas evaluadas inhibieron efectivamente el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, lo cual es importante por el efecto que estas bacterias ácido lácticas pudieran tener a nivel gastrointestinal, evitando la colonización de patógenos y pudiendo participar en los procesos de defensa del organismo.

Existen numerosos trabajos enfocados a la actividad antimicrobiana de las bacteria ácido lácticas (De Martinis *et al.*, 2001; Savadogo *et al.*, 2004) en donde se ha observado la acción de estos microorganismos contra más de un microorganismo de prueba. Trabajos como el de Murry *et al* (2004), muestran la actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas contra algunos microorganismos patógenos como es el caso de *E. coli*, *S. Typhimurium* y *C. perfringes*, pero se desconoce el metabolito responsable de dicha actividad.

La capacidad que presentan las bacterias ácido lácticas para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos podría también deberse a la reducción del pH generado por la fermentación de los carbohidratos disponibles en el medio,

también existen otros metabolitos con efecto inhibitorio como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, antibióticos y bacteriocinas (Davidson y Hoover, 1993; González *et al.*, 2004; Milena *et al.*, 2009).

6.3 Resistencia de las bacterias ácido lácticas a pH

Para la realización de este ensayo se seleccionaron las cepas de bacterias ácido lácticas que mostraron mayor efecto antimicrobiano contra los patógenos evaluados (tabla 6).

En la tabla 6 se muestra la resistencia / sensibilidad de las cepas de bacterias ácido lácticas a valores de pH 2 y 3 después de 0, 1 y 2 h de contacto. Todas las cepas mostraron una reducción progresiva en su concentración a pH 2 durante el almacenamiento, de hecho el efecto se observó en algunas de las cepas desde el tiempo 0 (Tabla 6); el tiempo "0" se refiere a que inmediatamente que fueron inoculadas las cepas en los caldos a pH 2, se agitó y se tomó una alícuota para efectuar el recuento de los microorganismos por la técnica de vertido en placa. A pH 2 ninguna de las cepas resistió una hora o más. Resultados similares obtuvieron Darilmaz y Beyatli, (2012). No obstante, a pH 3 la mayoría de las cepas sobrevivieron bien aun después de 2 horas de contacto (tabla 6).

Los datos muestran que las cepas tienen un comportamiento distinto ante el efecto del pH y el tiempo de incubación y además que estos factores influyen de manera importante sobre su viabilidad. Se observó que algunas cepas fueron más resistentes y lograron sobrevivir en pH ácidos, mientras que otras no fueron capaces de soportar los bajos niveles de pH disminuyendo su población significativamente. Las cepas que presentaron mayor resistencia al nivel de pH 3 fueron las cepas QT 17, QT 19 y QT 20 (tabla 6). Por otro lado las cepas QR 24, QR 49, P 20 y Zh13b, no soportaron las condiciones de acidez del medio y desde el tiempo cero (pH 2) comenzaron a disminuir su concentración (tabla 6).

Tabla 6. Resistencia /sensibilidad de las bacterias ácido lácticas a 2 niveles de pH evaluados y 3 tiempos de contacto.

Clave BAL	pH 2			pH 3		
	Tiempo (h)			Tiempo (h)		
	0	1	2	0	1	2
QR5	Incontable	-	-	Incontable	235	70
QR24	-	-	-	36	-	-
QR25	Incontable	-	-	Incontable	632	204
QR26	3	-	-	Incontable	1	-
QR27	10	-	-	448	-	-
QR49	-	-	-	408	8	4
QT12	79	-	-	715	611	159
QT17	Incontable	-	-	Incontable	Incontable	Incontable
QT19	Incontable	-	-	Incontable	Incontable	Incontable
QT20	Incontable	-	-	564	480	444
P20	-	-	-	Incontable	-	-
1B	448	-	-	Incontable	2	-
M2	212	-	-	Incontable	4	-
M4	80	-	-	Incontable	51	-
Zh13b	-	-	-	368	8	6
20b	1	-	-	Incontable	28	12
Gf2a	896	-	-	Incontable	Incontable	Incontable

La diferente capacidad de sobrevivir en los valores de pH de estudio sugiere que esta tolerancia se debe a la cepa específica y estos valores de pH (2 y 3) podrían ser considerados como críticos para la selección de potencial probiótico y para su selección de manera natural en alimentos ácido.

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas QR 25, QT 17, QT 19, QT 20 y 1B, podrían tolerar las condiciones de pH ácido del estómago durante su tránsito por él y que sus poblaciones podrían mantenerse viables al llegar al intestinal donde podrían adherirse y efectuar su función fisiológica.

Es sabido que la acidez producida por el estómago (pH de entre 2 a 3) constituye una de las principales barreras contra muchos microorganismos que transitan el tracto gastrointestinal (Alvarado y Díaz, 2009). En condiciones normales el tiempo

de tránsito gastrointestinal comprende de 2 a 4 h y varía según el individuo (Cueto *et al.*, 2010).

Así, el estrés celular para las bacterias que ingresan junto con los alimentos, incluidas bacterias patógenas, inicia en el estómago y posteriormente al entran al tracto gastrointestinal donde son secretadas las sales biliares. A estos dos factores importante, las bacterias ácido lácticas tiene que sobrevivir para posteriormente implantarse en el intestino.

6.4 Resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares

La mayor dificultad que presentan las bacterias ácido lácticas para ser utilizadas como probiótico es su baja capacidad de sobrevivencia durante su paso por el estómago, es decir, después de la acidez gástrica, el microorganismo probiótico encuentra en el intestino delgado la presencia de sales biliares, por lo que para ejercer sus efectos beneficiosos no deben sucumbir a la acción de estos bactericida natural (Zamudio y Zavaleta, 2003; González *et al.*, 2013). Es difícil predecir la concentración de bilis en el intestino ya que esta es muy variada en cada individuo. Las concentraciones de bilis utilizadas comúnmente en estudios de selección de cepas resistentes se sitúan entre 0.1 y 1 % (Anukam y Koyama, 2007). Por ello, en éste estudio se utilizaron concentraciones de 0.15, 0.3, 0.5 y 1% de sales biliares. Se seleccionaron para su uso como potencialmente probióticas aquellas cepas que fueran más resistentes a dichas concentraciones.

De las 17 cepas que se estudiaron en el ensayo de resistencia a pH, se seleccionaron únicamente 7 que superaron esta barrera y se logró constatar que todas ellas fueron capaces de resistir las 4 concentraciones de sales biliares empleadas.

Los resultados obtenidos en éste experimento con las sales biliares coinciden con los reportados por otros autores quienes obtuvieron una cepa de *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* capaz de sobrevivir en presencia de sales biliares a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1% como condición extrema.

Las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, son capaces de producir una enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación pudiera ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de esta enzima se incrementa al disminuir el pH por la producción de ácidos orgánicos (Lara y Burgos, 2012).

6.5 Sensibilidad a antibióticos

La capacidad que manifiestan determinadas cepas de bacterias ácido lácticas de ser resistentes a los antibióticos, es un criterio determinante para su selección como posibles microorganismos probióticos.

Después de evaluar la resistencia de las bacterias ácido lácticas al pH y sales biliares, se seleccionó aquella cepa que presentó la mayor resistencia al pH, sales biliares y mayor potencial antagonico *in vitro* contra los patógenos de estudio, como cepa potencialmente probiótica para evaluar su sensibilidad a 16 antibióticos (tabla 7); esta fue la cepa QT 20.

Los antimicrobianos analizados incluyeron inhibidores de la síntesis de pared celular (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico), inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclina, eritromicina, estreptomina, cloranfenicol, kanamicina) e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (ácido nalidíxico). Los resultados de este estudio de resistencia/sensibilidad a los antibióticos por parte de la cepa de BAL QT 20 se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7. Sensibilidad a antibióticos presentada por la BAL QT 20.

Antibiótico	Halo de inhibición (mm)
Ácido nalidíxico (Nal)	R ¹
Amikacina (Amk)	² 8.16 ± 1.60 ³
Amoxicilina/ácido clavulánico (Amc)	R
Ampicilina (Amp)	25.00 ± 1.26
Ceftriaxona (Cro)	11.83 ± 2.40
Ciprofloxacina (Cip)	R
Cloranfenicol (Chl)	38.33 ± 1.63
Colistina (Col)	R
Eritromicina (Eri)	36.16 ± 1.83
Estreptomina (Str)	R
Gentamicina (Gen)	11.83 ± 2.48
Kanamicina (K)	R
Neomicina (Neo)	R
Sulfisoxazol (Sox)	9.16 ± 0.40
Tetraciclina (Tcy)	13.33 ± 1.96
Trimetoprim/sulfametoxazol (Sxt)	R

¹ Resistente a antibiótico, ²Promedio de triplicado, ³desviación estándar

Como se puede observar en la tabla la cepa QT 20 fue resistente al 50% de los antibióticos ensayados, mientras que para el 50% fue sensible, mostrando halos de inhibición de 25.00 ± 1.26 mm para ampicilina a una concentración de 10 µg/mL, para sulfisoxazol (250 µg/mL) el diámetro de inhibición fue de 9.16 ± 0.40 mm, en el caso de la eritromicina se observó un halo de inhibición de 36.16 ± 1.83 mm a una concentración de 15 µg/mL, para tetraciclina (30 µg/mL) los halos de inhibición mostrados fueron de alrededor de 13.33 ± 1.96 mm, la gentamicina presentó una inhibición de 11.83 ± 2.48 mm a una concentración de 10 µg/mL, el cloranfenicol inhibió a la bacteria ácido láctica exhibiendo un diámetro de 38.33 ± 1.63 mm a una concentración de 30 µg/mL, la amikacina (30 µg/mL) fue el antibiótico que mostró diámetros de inhibición menores a los 10 mm (8.16 ± 1.60 mm), por último la ceftriaxona (30 µg/mL) presentó inhibición contra la bacteria ácido láctica mostrando halos de 11.5 ± 1 mm (figura 12).

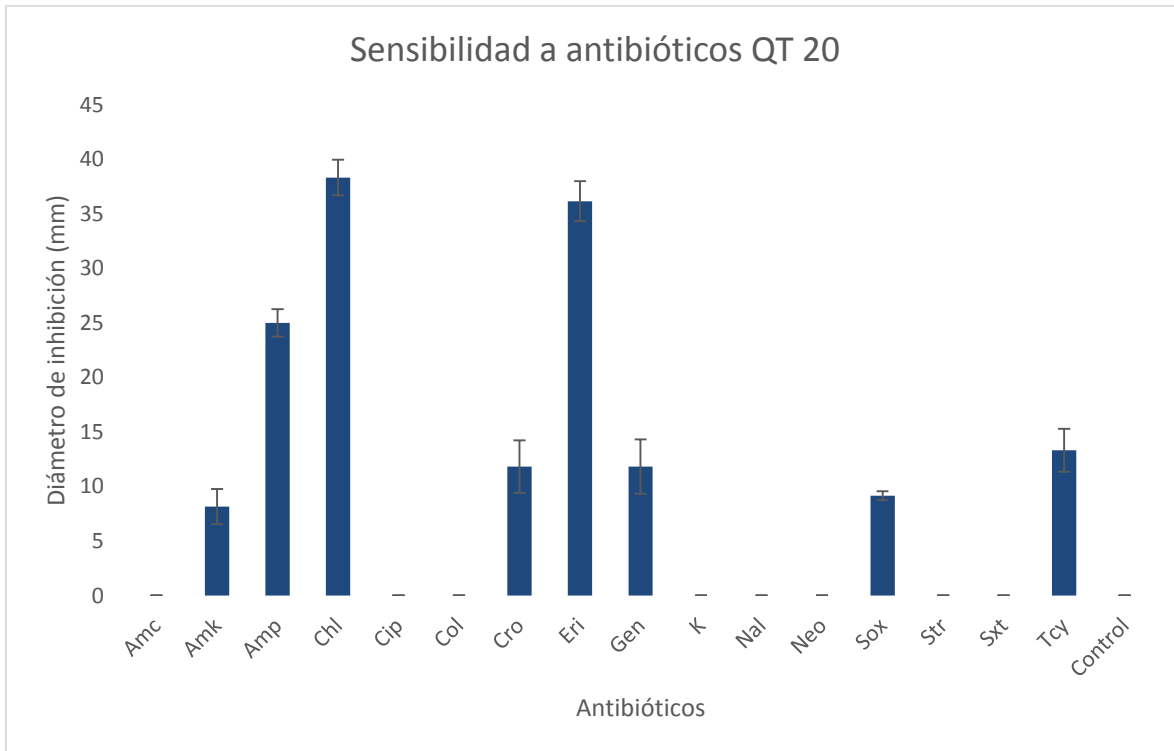


Figura 12. Sensibilidad de la cepa QT 20 a antibióticos.

La ampicilina es un antibiótico que pertenece al grupo de los inhibidores de la pared celular, se utiliza en veterinaria ya que constituye una alternativa eficaz en las patologías infecciosas, su uso está aprobado por la FDA.

Nuestros resultados tienen similitud con los reportados por Mejía *et al.*, (2007) quienes aislaron 360 cepas de bacterias ácido lácticas a partir de heces de niños lactantes y muestras vaginales de 10 mujeres (todos sin problemas de salud) y probaron su sensibilidad a 10 µg/mL de ampicilina, mostrando halos de inhibición entre 12 y 30 mm, mientras que en nuestro estudio, obtuvimos halos de 9 hasta 25.00 mm (figura 13).

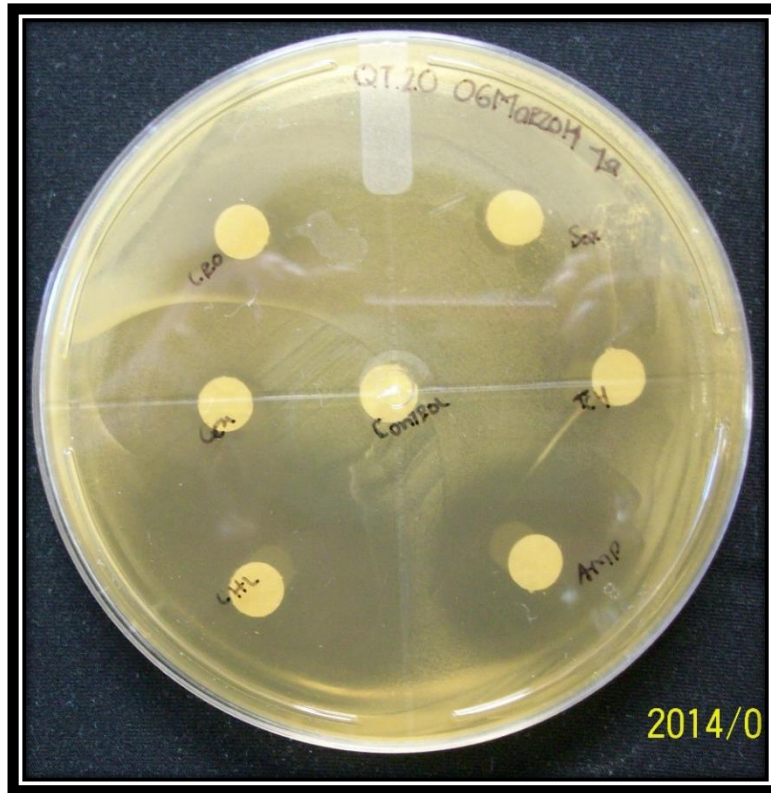


Figura 13. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de ampicilina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Estudios llevados a cabo por Danielsen y Wind (2003) y Coppola *et al.*, (2005) con respecto a los inhibidores de pared celular, señalan que los lactobacilos son frecuentemente sensibles a ampicilina y penicilina.

Otro antibiótico perteneciente al grupo de los inhibidores de pared celular es la amoxicilina, en este estudio la cepa ensayada mostró resistencia hacia ese antibiótico. Flórez *et al.*, (2005) aislaron 146 cepas de bacterias ácido lácticas a partir de queso azul elaborado con leche de cabra sin tratamiento térmico, de las cuales 21 pertenecían al género *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuc. Pseudomesenteroides*; determinaron la CMI de amoxicilina en un rango de diluciones de 0.25 a 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniendo los siguientes resultados: 3 cepas fueron sensibles a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La susceptibilidad mostrada por estas cepas se puede encontrar en función de su membrana externa, ya que en las bacterias Gram positivas no es una barrera

importante para evitar la penetración del antibiótico. Por otro lado algunas bacterias pueden presentar cierta tolerancia como fue nuestro caso, aunque este no es un verdadero mecanismo de resistencia. Cuando esto sucede, las bacterias son inhibidas pero no lisadas, a no ser que se empleen concentraciones muy elevadas.

El cloranfenicol es el primer antibiótico de amplio espectro descubierto y utilizado en medicina. Fue aislado de una cepa de *Streptomyces venezuelae* encontrada en el suelo de Venezuela en 1947. Herreros *et al.*, (2005) aislaron bacterias ácido lácticas de queso Armada, probaron el efecto de antibióticos frente a éstas obteniendo los siguientes resultados, 6 cepas de *Lc. lactis* de 9 ensayadas fueron resistentes a 30 µg/mL de cloranfenicol, 2 cepas de *Leuc. mesenteroides*, 1 *Lb. brevis* y 3 cepas *Lb. casei* fueron resistentes a la misma concentración del antibiótico, mientras que en nuestro estudio la cepa QT 20 fue sensible a la misma concentración del antibiótico 30 µg/mL, mostrando halos de inhibición de 38.33 ± 1.63 mm figura 14.

La exposición a éste antibiótico da lugar al cese de la síntesis de proteínas pero no a la de ácidos nucleicos, con lo cual el efecto conseguido es bacteriostático al inhibirse la multiplicación bacteriana (Yunis, 1989).

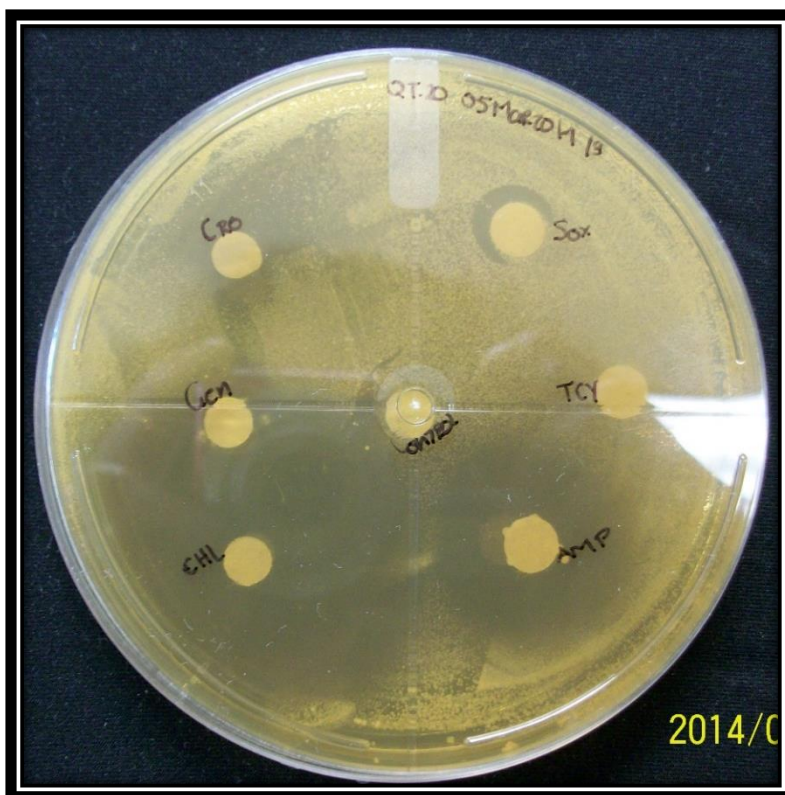


Figura 14. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de cloranfenicol 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La eritromicina es un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, actualmente se encuentra aprobado por la FDA y la OMS. Flórez *et al.*, (2005) señalan haber aislado 23 cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. paraplantarum* aisladas de queso azul, los resultados obtenidos por los autores muestran que 22 cepas presentaron sensibilidad a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico, mientras que la cepa restante fue sensible a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; estos resultados difieren con los nuestros, sin embargo Zhou *et al.*, (2005) probaron la sensibilidad de 2 cepas de *Lb. rhamnosus* de actividad probiótica contra 18 antibióticos de uso común, comparándolas con 5 cepas comerciales de probióticos, en las cuales se encontraba una cepa de *Lb. rhamnosus* y una *Lb. plantarum*, reportando una sensibilidad a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina, misma concentración utilizada en este estudio para la que se obtuvieron halos de inhibición de 36.16 ± 1.83 mm, figura 15. La resistencia presentada por nuestra cepa puede deberse a una disminución del ingreso del antibiótico a la célula, frecuentemente este es el principal mecanismo de resistencia (Escolar *et al.*, 1998).

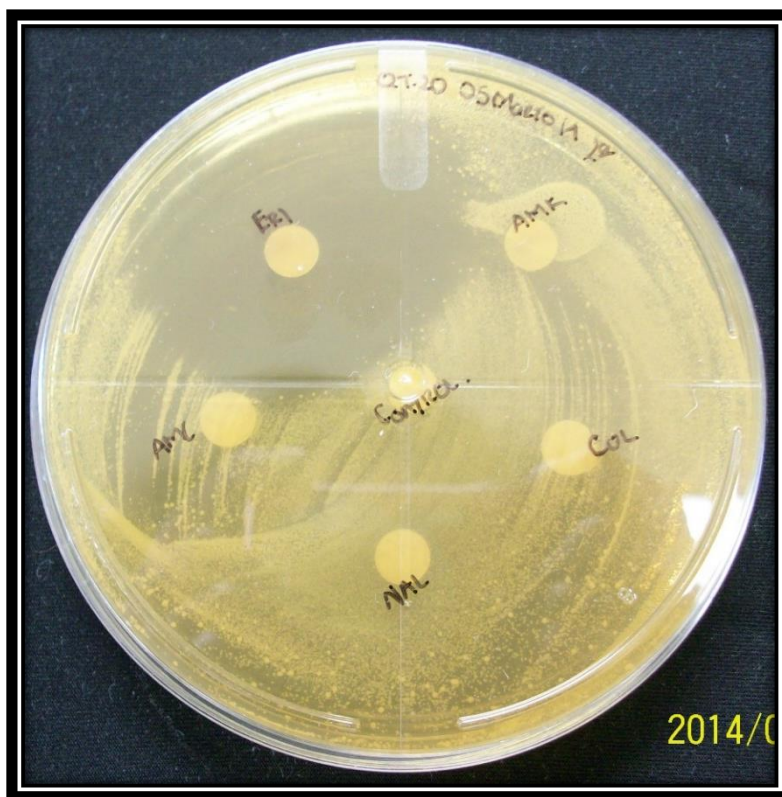


Figura 15. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de eritromicina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La estreptomina es un antibiótico perteneciente al grupo de los inhibidores de la síntesis de proteínas para el cual las bacterias ácido lácticas muestran mayor resistencia. Charteris *et al.*, (1998) así como Coppola *et al.*, (2005) han mencionado que los lactobacilos son resistentes a estreptomina, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio ya que no se obtuvieron halos de inhibición a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De igual manera Rojo *et al.*, (2006) han hecho mención de tal resistencia al encontrar una CMI de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 38 cepas de *Lb. plantarum*, valores similares fueron observados por Elkins y Mullis (2004) quienes muestran que los lactobacilos presentan una resistencia intrínseca a los aminoglucósidos (estreptomina), según ellos, debida a la permeabilidad de su membrana. La resistencia a estreptomina está considerada intrínseca en las bacterias ácido lácticas (Katla *et al.*, 2001; Danielsen y Wind, 2003), siendo atribuida a la ausencia de citocromos en la cadena transportadora de electrones (Charteris *et al.*, 1998), a la estructura de la pared celular y a la impermeabilidad de la

membrana, que juega un papel importante en esta resistencia (Elkins y Mullis, 2004). Además de todo esto los aminoglucósidos son mucho más activos a pH alcalino que en pH ácido (Brooks *et al.*, 2005).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos que actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesaria su difusión pasiva por la membrana celular exterior, requiriendo de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna (Rodríguez *et al.*, 1998). En el estudio realizado por Zhou *et al.*, (2005) encontraron que cepas con potencial probiótico de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum* fueron susceptibles a 30 µg/mL de este antibiótico. En ese mismo año, Herreros *et al.*, (2005) reportaron sensibilidad a 30 µg/mL para cepas de *Lb. plantarum* aisladas a partir de queso elaborado artesanalmente, estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo donde se obtuvieron halos de inhibición de 13.33 ± 1.96 mm (figura 16).

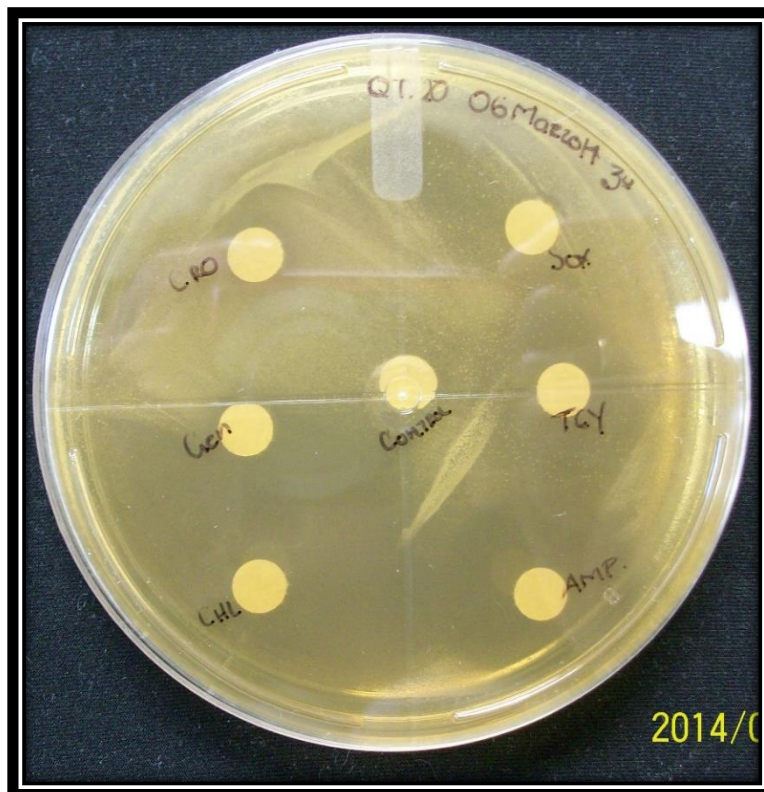


Figura 16. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de tetraciclina 30 µg/mL.

La gentamicina es un antibiótico perteneciente a los aminoglucósidos, se emplea para erradicar infecciones contra bacterias sensibles. Interfiere en la síntesis normal de proteínas originando proteínas no funcionales en microorganismos susceptibles. En este estudio se observó que la bacteria ácido láctica QT 20 presentó sensibilidad a la acción de este antibiótico al presentar halos de inhibición de 11.83 ± 2.48 mm a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$. Darilmaz y Beyatli (2012) aislaron de queso Turco elaborado artesanalmente 29 cepas de propionibacteria y encontraron que 26 cepas fueron sensibles a la acción de gentamicina. No obstante, estos resultados difieren con los reportados por Córdoba *et al.*, (2009) quienes aislaron bacterias ácido lácticas a partir de diversos productos lácteos (yogurt, leche agria) y reportaron resistencia de las cepas a la misma concentración del antibiótico estableciendo que esta resistencia es de carácter intrínseco y la atribuyen a la ausencia de transporte de electrones mediado por citocromo. Rojo *et al.*, (2006) reportan cepas de *Lb. acidophilus* y *Lb. casei* resistentes a penicilinas y gentamicina.

La kanamicina es un antibiótico de amplio espectro, bactericida perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, bloquea la síntesis proteica bacteriana y produce errores en la lectura del código genético. En un estudio realizado por Temmerman *et al.*, (2002), un total de 55 productos probióticos fueron evaluados, se obtuvieron 187 cepas de bacterias ácido lácticas, se evaluó su resistencia contra algunos antibióticos utilizando el método de difusión en disco y se determinó que el 79% de los aislados presentó resistencia frente a kanamicina, los mecanismos de resistencia son desconocidos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo, ya que la cepa evaluada fue resistente a la acción de este antibiótico al ser estudiado en una concentración de $30 \mu\text{g/mL}$ (figura 17).

En el trabajo realizado por Darilmaz y Beyatli (2012), mencionan que cepas de propionibacteria mostraron baja resistencia a kanamicina (20%) a una concentración de $30 \mu\text{g/mL}$. Alvarado *et al.*, (2007) aislaron bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal y encontraron que todas sus cepas fueron resistentes a kanamicina $25 \mu\text{g/mL}$.

La amikacina es otro antibiótico bactericida que inhibe la síntesis de proteínas, pertenece al grupo de los aminoglucósidos y es utilizado para el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas. Alvarado y Díaz (2009), estudiaron el potencial probiótico de 10 cepas de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera, 6 *Lb. plantarum*, 2 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, 1 *Lb. brevis* y 1 *Lb. pentosus*, manifestando que todos los lactobacilos estudiados mostraron resistencia a amikacina, 30 µg/mL. Nuestros resultados no coinciden con los del autor ya que nuestra cepa QT 20 resultó sensible a este antibiótico al obtener halos de inhibición de 8.16 ± 1.60 mm a una concentración de 30 µg/mL.

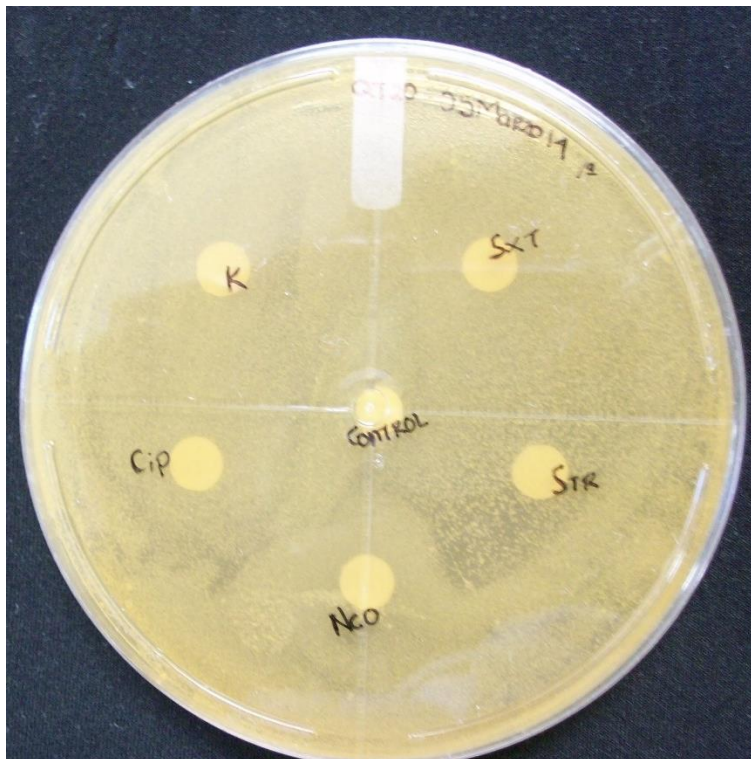


Figura 17. Sensibilidad mostrada por la bacteria ácido láctica QT 20 a la acción de kanamicina 30 µg/mL.

Las bacterias ácido lácticas al ser evaluadas frente a la acción de estos antibióticos ácido nalidíxico 30 µg/mL, ciprofloxacina 5 µg/mL, colistina 10 µg/mL, neomicina 10 µg/mL, trimetoprim/sulfametoxazol 1.25/23.75 µg/mL, mostraron ser resistentes a las concentraciones evaluadas. En el trabajo realizado por Alvarado y Díaz (2009),

indican las cepas de lactobacilos en su totalidad fueron resistentes a ciprofloxacina 5 µg/mL, coincidiendo estos resultados con los nuestros. Un grupo de 26 bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño por Cueto *et al.*, (2010) se evaluaron frente a la acción de ácido nalidíxico y observaron que 25 de ellas presentaron resistencia al antibiótico, solo una cepa mostró ser sensible. Darilmaz y Beyatli (2012) también probaron el efecto que tenía el ácido nalidíxico (30 µg/mL) frente a las cepas aisladas y observaron que todas fueron resistentes al antibiótico.

Uno de los requisitos que deben cumplir las bacterias ácido lácticas probióticas es la ausencia de resistencia a antimicrobianos, porque debe evitarse el riesgo de que estas cepas puedan transferir genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas presentes en el tracto gastrointestinal del hospedador, es por esto que en la caracterización y selección de especies con potencialidades probióticas se incluya la evaluación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos. En nuestro caso, la cepa QT 20 mostro sensibilidad a los antibióticos esperados y resistencia a la mayoría también esperados, es decir la resistencia observada, como se discutió, es inherente o natural, en tal caso no se considera como un resistencia tal.

6.6 Identificación Bioquímica de las cepas QT 20

La identificación bioquímica únicamente se le realizó a la bacteria ácido láctico QT 20 aislada a partir de queso tenate, esto por ser ella la que presentó mejores características para considerarse como probiótica. En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos para su identificación.

La identificación del género de la bacteria ácido láctica QT 20 se comparó con los datos descritos por Axelsson (1993) y Wood y Holzapfel (1995), logrando identificarla dentro del género de *Lactobacillus*. Para la identificación de la especie se utilizó la fermentación de carbohidratos (tabla 9) comparando los datos con el Manual de Bergey de Bacteriología Sistémica, 2009 y Mac Faddin (1990).

Así, la cepa identificada correspondió al género *Lactobacillus* y a la especie *pentosus*. Los *Lactobacillus pentosus* tienen forma alargada (1-1.2 µm por 2-5 µm),

se puede encontrar en parejas o en cadenas cortas, es Gram positivo, inmóvil, crece a 10 y 40 °C, es anaerobio facultativo, es heterofermentativo, Voges-Proskauer positivo, Zanoni *et al.*, 1987.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa QT 20

PRUEBAS		BAL	QT 20
Producción de CO ₂			-
pH	4.5		+
	6.5		+
	9.5		-
NaCl	2%		+
	3%		+
	4%		-
	6.5%		-
	10%		-
MR-VP			+
Temperatura	10°C		+
	15°C		+
	37°C		+
	45°C		+
	55°C		-
Tratamiento térmico 63°C/30 min			+

Crecimiento positivo (+); crecimiento negativo (-)

Sin embargo es necesaria la aplicación de otros métodos como el análisis de rRNA 16^a para obtener un alto porcentaje de similitud en la identificación de la bacteria ácido láctica a nivel de especie complementándolo con pruebas bioquímicas y los sistemas miniaturizados API 50CHL. La identificación clásica de las bacterias ácido lácticas depende principalmente de métodos fenotípicos, como son la morfología, propiedades fisiológicas, bioquímicas y por la estructura de sus componentes celulares, por otro lado, la identificación a nivel de especie conlleva más tiempo y cierto grado de incertidumbre en los resultados al existir cepas atípicas que no comparten ciertas características con el resto del grupo (Amann y Kühn, 1998).

Tabla 9. Fermentación de azúcares de la bacteria ácido láctica QT 20.

Fermentación de azúcares	BAL
	QT 20
Ácido Pirúvico	+
Arabinosa	-
Arginina	+
Esculina	+
Fructosa	-
Galactosa	+
Glucosa	+
Inositol	+
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Manosa	+
Melibiosa	-
Rafinosa	+
Ramnosa	+
Ribosa	+
Sacarosa	-
Sorbitol	+
Trealosa	+
Xilosa	+

Acido (+): color rosa/rojo

Alcalino (-): color amarillo/anaranjado

6.7 Identificación molecular

La identificación molecular se le realizó a la bacteria ácido láctica QT 20, por ser ésta cepa la que se seleccionó para la elaboración del queso potencialmente probiótico ya que resistió satisfactoriamente todas las pruebas *in vitro*.

La bacteria ácido láctica se cultivó en medio MRS, después se llevó a cabo la identificación del género por ribotipificación mediante la amplificación y secuenciación del ADNr 16S. Al momento esta cepa se ha identificado como una bacteria ácido láctica perteneciente al género *Lactobacillus*, lo cual coincide con los resultados obtenidos con la identificación bioquímica.

Actualmente la identificación de especie se está realizando, también por secuenciación; no obstante, por falta de tiempo los resultados de la especie no serán reportados en éste trabajo. Los datos precisos de la especie de la cepa QT 20 obtenidos ribotipificación serán reportados en trabajos posteriores.

6.8 Evaluación de la viabilidad y comportamiento me microorganismos patógenos en queso fresco con potencial probiótico.

En México como en otros países de América Latina, la calidad del queso fresco está estrechamente relacionada con la región de producción y sus tradiciones. El queso fresco es la variedad más popular que se consume en México. El queso fresco es generalmente elaborado en pequeña escala usando técnicas artesanales que incluyen la acidificación por bacterias ácido lácticas y/o la adición de renina (Torres *et al.*, 2006).

La falta de uniformidad, deficiente calidad sanitaria y la corta vida útil limita su distribución a nivel regional. Existen escasa referencias sobre su microbiología y participación como vehículos de agentes patógenos (Fernández, 2000).

La Norma Oficial Mexicana 121-SSA-1994 exige que la leche sea pasteurizada, ya que esto permite obtener productos lácteos inocuos microbiológicamente hablando. Sin embargo, para que se pueda fabricar el queso con leche pasteurizada, es necesario agregar microorganismos acidificantes a la leche para cubrir esta parte del proceso. Los microorganismos a utilizar deben ser parte de la biota responsable de impartir características típicas de los quesos que se requiere fabricar (Ramos *et al.*, 2009).

Existe un gran interés en el estudio de los cultivos lácticos autóctonos para emplearlos en la producción industrial de quesos tradicionales que conserven sus propiedades típicas y sean simultáneamente seguros desde el punto de vista higiénico. Se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas y probióticas en algunos alimentos provocan la inhibición de microorganismos, con esto contribuyen a controlar microorganismos que son potencialmente patógenos como *Salmonella*, y algunas especies de *Staphylococcus* y *Listeria*, las que pueden dañar la salud de quien los consume. Este efecto bioconservador se debe principalmente a la producción de bacteriocinas y otros compuestos inhibidores del crecimiento microbiano como ácido láctico y otros ácido de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno y diacetilo (González *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica QT 20 aislada de queso tenate se trabajó con diferentes microorganismos de interés en la industria de los alimentos a nivel mundial: *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, a continuación se muestran los resultados obtenidos para cada microorganismo estudiado.

Para el caso de *E. coli* O157:H7, en un inicio éste microorganismo mostró un comportamiento semejante tanto en queso contenido la cepa QT 20 como en el queso que no la contenía (figura 18). No obstante, durante el almacenamiento, la concentración del patógeno se redujo mayormente en el queso adicionado de la cepa QT 20 (figura 18). Más específicamente, inicialmente se registró una concentración de 3.04 log UFC/trozo en el queso con la cepa QT 20 y 3.6 log UFC/trozo en el queso sin la cepa QT 20 para el tiempo cero, hasta el día 6 el comportamiento de los microorganismos fue similar entre los dos tipos de quesos; no obstante, a partir del día 12, mientras que en el queso control la concentración permaneció constante en el queso que contenía la cepa QT 20 se observó una disminución significativa y progresiva hasta llegar a un nivel de 2.7 log UFC/trozo para el día 15. Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Ramos *et al.*, (2009), ellos no observaron diferencia significativa en la concentración y comportamiento de *E. coli* en un tipo de queso crema elaborado con y sin la adición

de bacterias ácido lácticas. Por otro lado, Zamora *et al.*, (2012) elaboraron un queso contenido bacterias probióticas y observaron efecto de los probióticos sobre bacterias mesófilas aerobias, hongos, levaduras, coliformes totales y *S. aureus*, pero no contra *E. coli* y *Salmonella*.

La presencia de bacterias lácticas en la fabricación de los quesos podría restringir el desarrollo de otras bacterias, ya sea por competencia o por la producción de sustancias antimicrobianas.

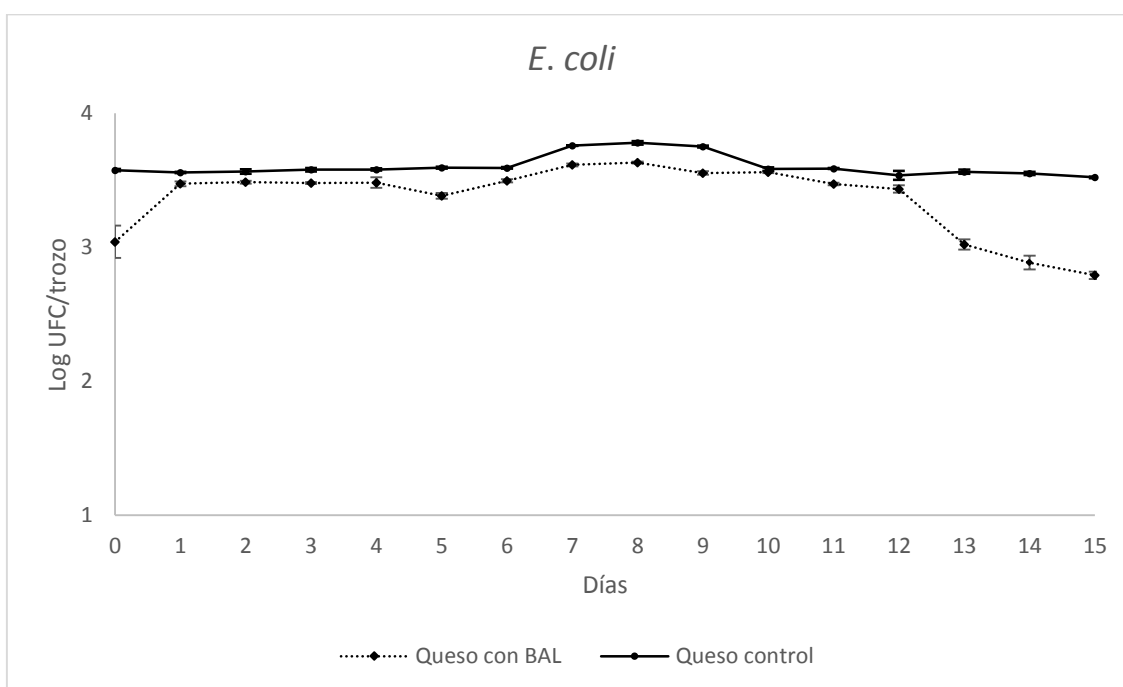


Figura 18. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.

En la figura 19 se muestra el comportamiento que tuvo *S. Typhimurium* en queso fresco adicionado y no de la cepa QT 20. Como se observa, para el tiempo cero *Salmonella* se encontró a una concentración de 3.44 log UFC/trozo en el queso control, mientras que la concentración del mismo microorganismo en el queso adicionado con la cepa QT 20 fue de 2.99 log UFC/ trozo. Para el día 15, la concentración del patógenos fue 3.02 log y 2.56 UFC/trozo en queso sin la cepa QT

20 y en queso con la cepa QT 20, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportado por González *et al.*, (2006), ellos evaluaron el efecto de microorganismos probióticos adicionados a queso sobre el crecimiento de *S. enteritidis* ser. Typhimurium, los resultados muestran que en el queso sin probiótico el microorganismo patógeno se detectó en un mayor porcentaje en contraste con el queso con probiótico. Estos resultados son similares a los descritos por Saad *et al.*, (2001) quienes estudiaron la inhibición del patógeno en queso minas conteniendo *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno, lo que demuestra que la adición de cultivos probióticos puede ser efectiva para disminuir los riesgos en quesos frescos, que por sus características son muy vulnerables a la contaminación. El riesgo por *Salmonella* en quesos frescos es mayor por sus características de acidez moderada y alto contenido de humedad, además, el riesgo se incrementa en queso elaborados con leche no pasteurizada (González *et al.*, 2006).

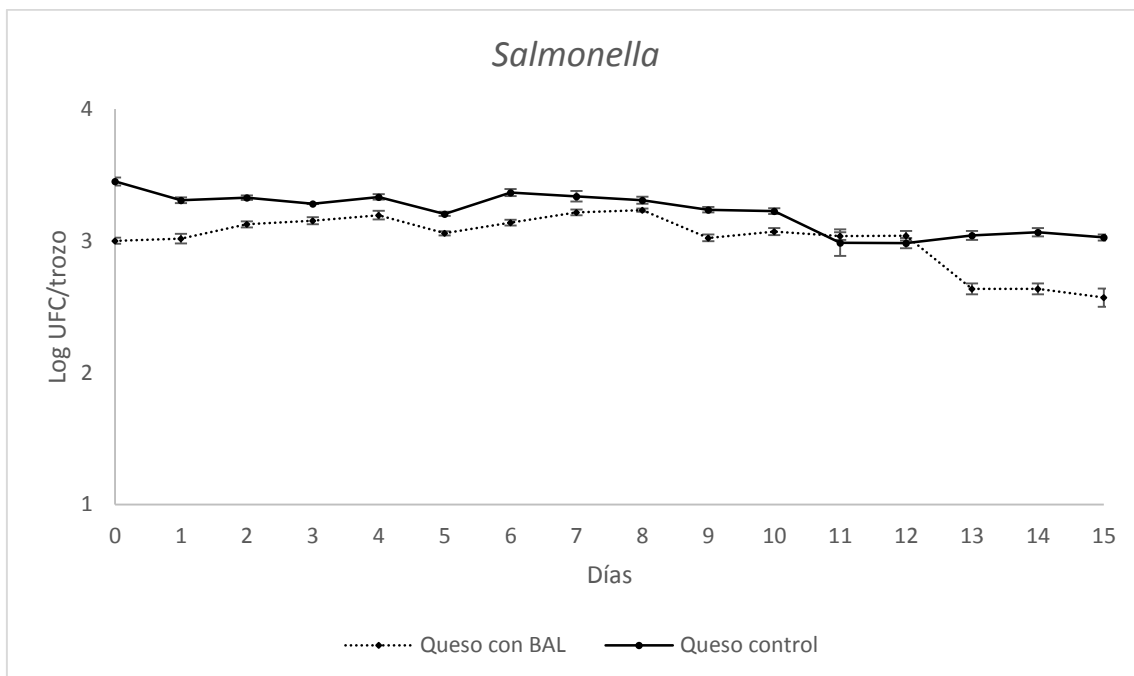


Figura 19. Comportamiento de *S. Typhimurium* en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.

Para el caso de *L. monocytogenes*, éste patógeno mostró también un comportamiento semejante en el queso con y sin la cepa de bacteria ácido láctica (figura 20); no obstante, desde el tiempo 0 se observó una diferencia significativa en la concentración del patógeno en ambos tipos de quesos; en el queso conteniendo la cepa QT 20 la concentración del patógeno fue en general menor que en el queso sin la cepa QT 20. A partir de los 12 días de almacenamiento en refrigeración se observó una clara diferencia en la concentración de *L. monocytogenes* en ambos tipos de quesos (figura 20); a partir de ese tiempo, la concentración del patógenos se redujo en mayor medida en el queso adicionado de la cepa QT 20.

González *et al.*, (2013) estudiaron la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas aisladas del queso Genestino durante su maduración observando que éstas solo tuvieron efecto contra *Enterococcus faecalis* y no frente a *L. monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum* y *S. aureus*.

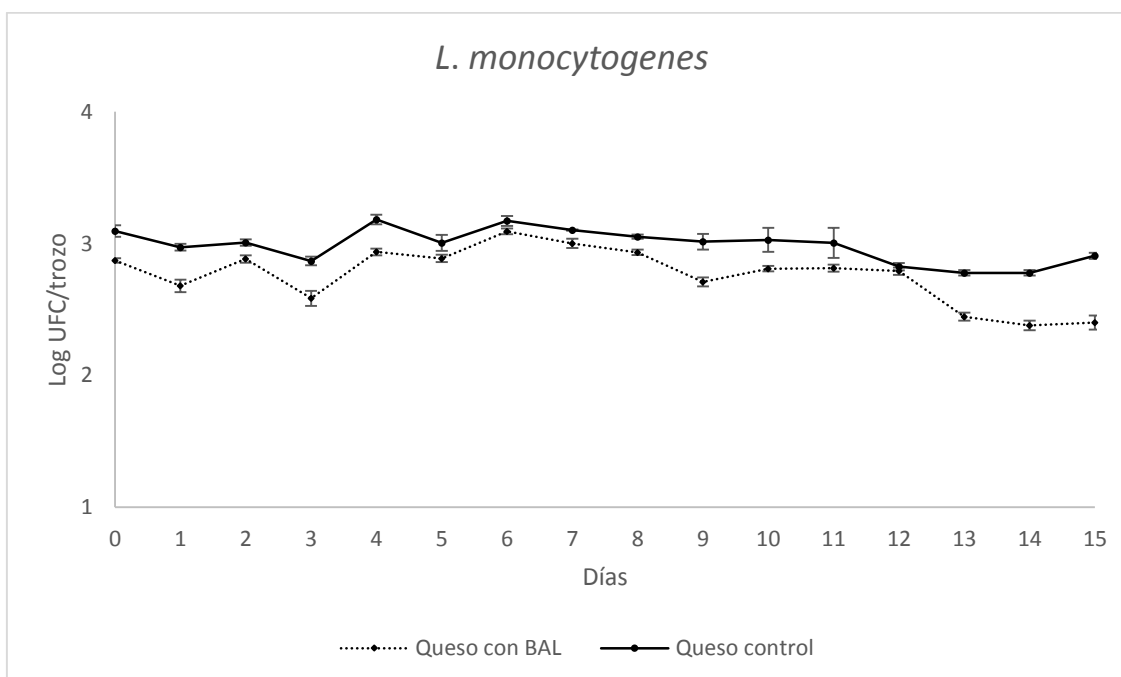


Figura 20. Comportamiento de *L. monocytogenes* en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.

El *S. aureus* también mostro un comportamiento semejante al de *L. monocytogenes* en ambos tipos de queso (figura 21). Y de igual manera, a partir del día 12 de almacenamiento en refrigeración, se observó la mayor inactivación de *S. aureus*.

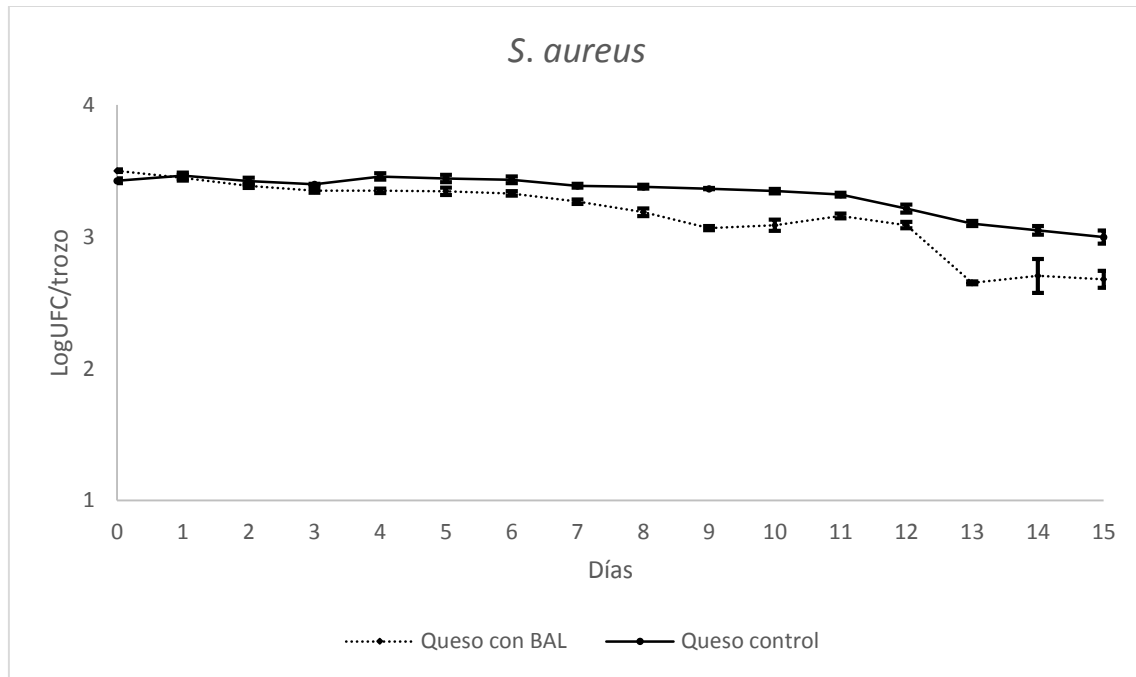


Figura 21. Comportamiento de *S. aureus* en queso fresco conteniendo y no la cepa QT 20 y almacenado en refrigeración.

En el estudio realizado por Zamora *et al.*, (2012) al incorporar el cultivo probiótico en un queso fresco se observó que hubo una disminución en la presencia de *S. aureus*, estos resultados concuerdan con los nuestros. Cerón, (2008) observó que al adicionar un cultivo probiótico de *Lb. casei* en queso fresco se redujo una concentración de 2.75 log UFC/g de queso con respecto al control. Obando *et al.*, (2010) estudiaron la viabilidad de tres microorganismos probióticos, *Lb. casei* 01, *Bifidobacterium* BB12 y *Lb. acidophilus* La-5, durante la vida útil del queso y su influencia en la calidad microbiológica de los productos se observó que *S. aureus*, mohos, levaduras y enterobacterias fueron inhibidos por las bacterias ácido lácticas.

Los resultados muestran mayor efecto inhibitorio contra los microorganismos Gram positivos, siendo las cepas *L. monocytogenes* y *S. aureus* las más sensibles, mientras que *S. Typhimurium* y *E. coli* presentaron mayor resistencia. Estos resultados se atribuyen a las diferencias estructurales que existen entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que las negativas contienen aparte de la pared celular una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias (como bacteriocinas). Esta membrana consiste en una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas que la atraviesan y que delimitan poros hidrófilos (porinas) que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular (Prescott *et al.*, 1999).

S. aureus es un microorganismo dinámico, ya que se encuentra en las mucosas, cavidad nasal y piel de los animales, razón por la cual es muy frecuente que se encuentre en alimentos como los quesos (Díaz y García, 2001).

Existen otros ensayos enfocados en la obtención de quesos adicionados de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico como los que se mencionan a continuación: El queso Cheddar, según Gardiner *et al.*, (1998) tiene ciertas ventajas como vehículo de microorganismos probióticos por tener un pH más alto que otros productos lácteos fermentados (yogurt), lo que provee de un medio más estable para soportar su sobrevivencia, y su alto contenido de grasa ofrece protección a las bacterias probióticas durante su paso a través del tracto gastrointestinal.

Algunos investigadores han logrado con éxito introducir bacterias con potencial probiótico a diferentes variedades de queso. Con respecto al uso de bifidobacterias, Dinakar y Mistry (1994), elaboraron un queso Cheddar adicionando estos cultivos y observaron que es posible mantener la viabilidad del probiótico durante 6 meses. Por su parte Gobetti *et al.*, (1998) incorporaron bifidobacterias en queso Crescenza dando como resultado un queso de características muy similares al queso Crescenza tradicional.

Kasimoglu *et al.*, (2004), elaboraron un queso blanco adicionado de bacterias ácido lácticas, como *Lc. acidophilus* y encontraron que es mejor envasarlo al vacío para lograr un adecuado nivel de proteólisis y características sensoriales óptimas.

Fernández y Rodríguez (2005), adicionaron *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* como adjunto en un queso elaborado artesanalmente a partir de leche de cabra y observaron que la cepa mantuvo viabilidad a lo largo de la maduración en niveles superiores a 10^8 UFC/g.

Los resultados que hemos obtenido son importantes ya que simulan las condiciones que ocurrirían en un queso elaborado con leche no pasteurizada. De hecho, en el estado de Hidalgo, un gran porcentaje de queso que son producidos y consumidos en el estado son elaborados con leche no pasteurizada, los cuales se fermentan sin la adición de cultivos iniciadores, y en general sin las medidas adecuadas de higiene.

Es recomendable la elaboración de queso utilizando leche pasteurizada y cultivos de bacterias iniciadoras para asegurar la inocuidad de los quesos. Además, mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas como la cepa QT 20, es posible la generación de quesos con potencial probiótico, el cual no solo protegería la inocuidad a los quesos contra bacterias patógenas, sino además, podría proporcionar al consumidor microorganismos que colonicen su intestino y lo protejan *in vivo* contra bacterias patógenas.

Por último, es necesario realizar estudios directamente en animales con las cepas de bacterias ácido lácticas que se aislaron de los alimentos analizados y que mostraron el mayor potencial probiótico (como la cepa QT 20) para determinar si realmente podrían considerarse como microorganismos probiótico.

7. Conclusiones

- Se aislaron 117 cepas de bacterias ácido lácticas de los alimentos analizados.
- Solo el 26.5% de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas mostraron efecto antagónico contra al menos una de las bacterias patógenas utilizadas.
- Con los ensayos realizados *in vitro*, simulando condiciones del tracto gastrointestinal para evaluar el potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas se pudo comprobar que el 20% de las cepas que mostraron actividad antagónica, fueron resistentes a las condiciones de pH evaluadas (pH 2 y 3), mientras que para la prueba de resistencia a sales biliares, todas mostraron ser resistentes a tales concentraciones (0.15, 0.3, 0.5 y 1%).
- La cepa QT 20 fue sensible al 50% de los antibióticos analizados, mostrando mayor sensibilidad a cloranfenicol.
- Mediante el análisis bioquímico y molecular de la cepa QT 20 se logró determinar que se trata de *Lactobacillus pentosus*.
- *Lactobacillus pentosus* (cepa QT 20) mostró efecto antagónico significativo contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso fresco almacenado en refrigeración.
- *Lactobacillus pentosus* tiene gran potencial para considerarse probiótico ya que fue capaz de adaptarse y resistir las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, además de que podría ser utilizada en los alimentos como conservadores o antimicrobianos naturales.

8. Referencias

1. Alais, Ch. 1998. Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. México. Compañía editorial Continental, S.A. de C. V.
2. Alvarado, R. C. C., Díaz, R. C. G. 2009. Preliminary studio of probiotic potential of lactobacilli isolated from grass milking farm. Rev Fac Farm 51 (1), 8-14.
3. Alvarado, R. C., Chacón, R. Z., Rojas, J. O., Guerrero, C. B., López, C. G. 2007. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso Venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. Revista Científica, FCV-LUZ. 17 (3), 301-308.
4. Amann, R. y Kühn, M. 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. Curr. Opin. Microbiol. 1, 252-258.
5. Amiot, J. 1991 Ciencia y tecnología de la leche: Principios y aplicaciones. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S. A.
6. Anukam, K. C., Koyama, T. E. 2007. Bile and acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A potential probiotic agent. Int. J. of Dairy Science 2 (3), 275-280.
7. Anukam, K. C. y Reid, G. 2007. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. Communicating current research and educational topics and trend in applied microbiology. Recuperado de: http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/ressources/histoire/texts_integraux/metchnikoff/formatexmetabio2007anukam.pdf
8. Arribas, B., Rodríguez, ME., Camuesco, D., Zarzuelo, A., Gálvez, J. 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. Ars Pharm, 49 (1), 5-30.
9. Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., y Zuccotti, G. V. 2011. Probiotics and health: An evidence-based review. Review in Pharmacological research, 63, 366-376. doi: 10.1016/j.phrs.2011.02.006
10. Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.). Lactic acid bacteria:

-
- microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-66
11. Barakat, R. K., Griffiths, M. W., Haris, L. J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* sp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. Int. J. Food Microbiol. 62:83-94.
 12. Blanchette, L., Roy, D., Bélanger, G. y Gauthier, S. F. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. J. Dairy Sci. 79 (1), 8-15.
 13. Boza, M. E., Morales, H. I., Henderson, G. M. 2010. Desarrollo de un queso maduro con adición del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* LC-01. Rev Chil Nutr. 37 (2), 215-223.
 14. Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Ed. El manual moderno. México, D. F. pp. 181-186.
 15. Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., Assis, E. G., Saad, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei* LWT-Food Sci. Technol. 38 (2), 173-180.
 16. Cagigas, R. A. L. y Blanco, A. J. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista cubana aliment Nutr. 16 (1), 63-68.
 17. Caplice, E. y Fitzgerald F. G. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in Food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 131-149.
 18. Castro, B. L. A., Rovetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica. Colomb Med, 37 (4), 308-314.
 19. Cerón, C.T.G. 2008. Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* encapsulado. Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Puebla, Puebla, México.
 20. Cervantes, C. M. Pedroza, R. A. M. 2008. Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. NOVA. 5 (8), 135-146

-
21. Charles, A. 1998. Ciencia de la leche. Principios de la Técnica Lechera. México. Continental.
 22. Charteris, W. P., Kelley, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1998. Antibiotics susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food Pro. 61, 1636-1643
 23. Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano reggiano cheese. Lait. 85, 193-204.
 24. Corbo, M. R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A. y Gobbetti, M. 2001. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. J. Dairy Sci. 84, 551-561.
 25. Córdoba, M., Chaves, C., Arias, M. L. 2009. Identificación, cuantificación y determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias prebióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica. Archivos latinoamericanos de nutrición. 59 (2), 179-183.
 26. Coronado, H. M., Vega, L. S., Gutiérrez, T. R., Díaz, G. G., Pérez, G. J. J. 2007. Alimentos funcionales y salud humana: probióticos en leches fermentadas. Univa. Recuperado de: <http://revista.univa.mx/n58/Art.%20CoronadoRepor.html>
 27. Cueto, V. M. C., Acuña, M. Y., Valenzuela, R. J. 2010. In vitro evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from coastal serum. Actual Biol 32 (93), 129-138.
 28. Danielsen, M., Wind, A. A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 82, 1-11.
 29. Darilmaz, D. O. y Beyatli, Y. 2012. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. Anaerobe 18, 122-127.
 30. Davison, P. M. y Hoover, D. G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria, Salminen, S. y Von Wright, A. Nueva York, Marcel Dekker.

-
31. De Martinis, E. C. P., Públío M. R. P., Santarosa P. R. y Freitas F. Z. 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32(1).
 32. De Vuyst, L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Review in food technol, biotechnol*, 38 (2), 105-112.
 33. Díaz R. C., García, G. B. 2001. *Stapylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad microbiana. *Rev. Salud Pública Nutr. RESPYN*, 2: 1-9.
 34. Dinakar, P., Mistry, V. V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 77 (10), 2854-2864.
 35. Early, R., 1998. *Tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S. A.
 36. Elkins, C. A., Mullis, L. B. 2004. Bile-mediated sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7200-7209.
 37. Escolar, J. M., Azanza, P. J. R., Sábada, D. B., Honorato, P. J. 1998. Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Medicine*. 7 (76), 3524-3532.
 38. Esquivel, I. I., Guerrero, R., Mendoza, J. E. Navarrete, A. 1987. *Introducción a la tecnología de alimentos*". México, E.N.C.B. del I.P.N.
 39. Fernández, E. E. 2000. *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. México, Universidad Autónoma de Querétaro.
 40. Fernández, F. y Rodríguez, A. 2005. Queso probiótico, un ejemplo de queso funcional. *Mundo lácteo y cárnico*. Mayo/Junio, 19-23. Recuperado de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/5777/1/QuesoprobiooticoAGROCSIC.pdf>
 41. Flórez, B. A., Delgado, S., Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from cheese enviroment. *Can. J. Microbiol.* 51, 51-58.
 42. Frazier, W. C. y Westhoff, D. C. 2000. *Microbiología de Alimentos*. Zaragoza, España. Acribia.
 43. Fuller, R. 1992. *Probiotics. The scientific basis. History and development of probiotics*. Eds. Chapman y Hall.

-
44. Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G. Staton, C. 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (6), 2192-2199.
45. Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. 1994. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Critical review in the journal of nutrition*. 1401-1412.
46. Gimeno, C. E. 2004. Alimentos prebióticos y probióticos, la polémica científica sobre sus beneficios. *OFFARM*, 23 (5), 90-98.
47. Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., De Angelis, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacterias. *Journal of Dairy Science*. 81 (1), 37-47.
48. Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M. y Grande, H. G. 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Neth. Milk Dairy J*. 49.
49. Gómez, D. G. J. 2003. Los probióticos, una alternativa en el tratamiento de enfermedades. Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>
50. González, A. L., Arenas, R., Sacristán, N., González, P. J., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. 2013. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso durante su maduración. Tesis doctoral. Universidad de León, España.
51. González, M. B. E., Gómez, T. M., Jiménez, S. Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista de la facultad de Salud Pública y Nutrición*. 4 (2).
52. González, M. B. E., Gómez, T. M., Jiménez, S. Z., 2004. Actividad antimicrobiana in vitro de cepas de probióticos aisladas de alimentos. *Revista de la facultad de Salud Pública y Nutrición*. 4-2005.
53. González, M. B. E., Jiménez, S. Z., Heredia, R. N. L., Villarreal, T. L., García, D. G., Gómez, T. M. 2006. Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium. *Ciencia UANL*. 9 (4).

-
54. Granato, D., Branco, G. F., Gomes, C. A., Fonseca, F. J. A., Shah, N. P. 2010. Probiotic dairy products as Functional foods: Comprehensive reviews in food science and food safety, 9, 455-470. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x
55. Hernández, P.E., Rodríguez, J.M., Cintas, L. M., Moreira, G.L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., Sanz, B. 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. Microbiología Sem 9, 37-48.
56. Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. F., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol 22, 455-459.
57. Jay, J. M. 2000. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza, España. Acribia.
58. Kasimoglu, A., Göncüoglu, M., Akgün, S. 2004. Probiotic White cheese with *Lactobacillus acidophilus*. International Dairy Journal. 14, 1067-1073.
59. Katla, K. A., Krusc, H., Johnsen, H., Herikstad, H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Int. J. Food Microbiol. 67, 147-152.
60. Lara, M. C., Burgos, P. A. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Rev. Colomb. Biotecnol. 14 (1), 31-40.
61. Leveau, J. Y., Bouix, M. 2000. Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza, España. Acribia.
62. Mac Faddin, J. F. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Argentina. Médica Panamericana.
63. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. Madrid, España. Prentice Hall.
64. Madrid, A. V. 1999. Tecnología Quesera. Madrid, España. Editorial Mundi-Prensa.

-
65. Magariños, H. H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. Guatemala, Guatemala. Editorial. Producción y Servicios incorporados S.A.
66. Martínez. B. I. K., González, M. B. E., Campos, G. E., Barba, de la R. A. P. 2008. Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: Comparación con métodos bioquímicos. *Revista Salud Pública y Nutrición* 9 (4). Recuperado de: <http://www.respyn.uanl.mx/ix/4/articulos/identificacionmolecularprobioticos.htm>
67. Mejía, R. J. A., Chacón, R. Z., Guerrero, C. B., Otoniel, R. J., López, C. G. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. *Rev. Científica, FCV-LUZ*. 17 (2), 178-185.
68. Milena, V. M. S., Suárez, M. H. y Zapata, B. S. 2009. Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Rev Chil Nutr* 1 (36) 64-71.
69. Monroy D., M. C., Castro B., T., Fernández P., F. J., Mayorga R., L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*. 73, 63-72.
70. Moreno, V. J. M. 2006. Flora bacteriana intestinal. *An Pediatr Monogr*. 4 (1), 12-19.
71. Murry, A. C., Hinton, A. y Morrison, H. 2004. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Clostridia perfringes* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science* 3 (9), 603-607.
72. NOM-121-SSA-1994. Quesos frescos madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Reglamentos de Control Sanitario de Productos y Servicios de la Secretaría de Salud, 1999.
73. Obando, C. M., Brito, C. C. S., Schöbitz R. P. T., Baez, M. L. A., Horzella, R. M. Y. 2010. Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso Cottage. *Rev. Fac. Quím. Farmac.* 17:141-148.

-
74. Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., Montonati, M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA* 25 (121), 20-33.
75. Ong, L., Henriksson, A. y Shah, N.P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J*, 16, 446-456.
76. O'Riordan, K. y Fitzgerald, G. F. 1998. Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *J. Appl. Microbiology*. 85 (1), 103-114.
77. Ouwehand, A. C.; Salminen, S., e Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
78. Parra, H. R. A. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 8 (1); 93-105.
79. Pearce M. C: Fenlon D., Low J.C., Smith A.W., Knight H. I., Evans J., Fostes G., Syngé B. A. and Gunn G. J. 2004. Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 70 (10), 5737.
80. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. 1999. *Microbiología*. Zaragoza, España. McGraw Hill Interamericana.
81. Ramírez, R. J. C., Rosas, U. P., Velázquez, G. M. Y., Arce, R. F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, (7), 1-16.
82. Ramos, I. B., Bucio, G. A., Bautista, M. C., Aranda, I. E., Izquierdo, R. F. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia, trópico húmedo*. 25 (2), 159-171.
83. Reyes, E. J. A., Rodríguez, F. L. 2010. ¿Qué sabe Ud. acerca de... los probióticos? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41 (1), 60-63.

-
84. Robinson, R. K., Wilbey, R. A. 1998. Fabricación de queso. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S. A.
85. Rodríguez, A. G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública. 44 (5), 464-475.
86. Rodríguez, R. M. A., González, P. J. G., Barreto, P. J., Lim, A. N., Areu, A., Pardo, N. A. 1998. Tetraciclinas. Acta médica. 8 (1), 75-79.
87. Rojo, B. B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz, L., F., Torres, C. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility whitening lactic acid bacteria strain isolated from wine. Int. J. Food Microbiol. 111, 234-240.
88. Saad, S. M. I., Vanzin, C., Oliveira, M. N., Franco, B. D. G. M. 2001. Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5 °C. J. Food Protect, 64 (8), 1151-1155.
89. Sablon, E., Contreras, B. y Vandamme, E.J. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 21-60.
90. Sánchez, O. I. 2003. Uso del permeado de suero suplementado en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro.
91. Sanz, Y., Collado M. C., Dalmau, J., 2003. "Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo". Acta Pediátrica Española, 61 (9), 476-482.
92. Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole I. H. N. y Traore A. S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition. 3(3): 174-179.
93. Sbodio, O. A., Revelli, G. R. 2012. Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el monitoreo *online* del proceso. Avances en la Argentina. Revista de investigaciones agropecuarias. 38 (3) 236-246.
94. Signorini, M. I. Guerrero, I. L. 2009. Producción de aminos biogénicos en carne de bovino conservada con ácido láctico de origen químico y bacteriano. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 8 (1), 41-49.
95. Slover, C., Danziger, L. 2008. Lactobacillus: A review. Clinical Microbiology Newsletter, 23-27.

-
96. Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M. 2004. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *J. Dairy Sci.* 87 (7), 2017-2023.
97. Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. 1990. *Bioquímica*. Barcelona, España Reverté, S. A.
98. Taranto, M. P., Médici, M., Valdez, G. F. 2005. Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*, (1), 26-34.
99. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2002. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10.
100. Torres, V. M. R. 2002. *Agentes patógenos transmitidos por alimentos*, Vol.1 Universidad de Guadalajara, México.
101. Torres, L. M. J., Vallejo, C., Díaz, C. M. E., Mazorra, M. M. A., González, C. A. F. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control.* 17, 683-690.
102. Vanegas, L. M. C., González, G. L. M., Arévalo, M. S. A., Villanueva, C. 2012. Evaluación del potencial probiótico de cepas *Lactobacillus* colombianas aisladas de leche materna. *Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 21 (26), 1-11.
103. Vásquez, M. S. M., Suárez, M. H., Zapata, B. S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición.* 36 (1), 64-71.
104. Villegas de, G. A. 2004. *Tecnología Quesera*. México. Editorial Trillas S. A. de C. V.
105. Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30, 404-427. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x
106. Vitoria, M. I. 2007. Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatr Integral* 11 (5), 425-433.
107. Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H. 1995. *The Lactic Acid Bacteria*. "The genera of lactic Acid Bacteria" Blackie Academic & Professional, UK.

-
108. Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology, pp. 9-13.
109. Yunis, A. A. 1989. Cloramphenicol toxicity: 25 years of research. Am. J. Med. 261, 1318-1321.
110. Zamora, V. R., Martínez, F. H. E., Montañez, S. J. L., Huerta, S. U., Pérez, S. R. E. 2012. Estudio microbiológico de queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii*. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 14 (2), 37-41.
111. Zamudio, K., Zavaleta, A. I. 2003. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de Fuentes naturales. Ciencia e Investigación 6 (1), 30-35.
112. Zannoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Collins, M. D. 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 37 (4), 339-341.
113. Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., Gill, H. S. 2005. Antibiotics susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Int. J. Food Microbiol. 98, 211-217.

XV Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos

XXX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos

31 de Octubre y 1 noviembre 2013, Guadalajara, Jalisco, México

La Universidad de Guadalajara otorga la presente

CONSTANCIA

A: Mora-Peñaflor, N., Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C.A., Torres-Vitela, M.R., Villarruel-López, A., y Castro-Rosas, J.

por su participación como:

Autores del trabajo libre presentado en modalidad cartel

“BEHAVIOR OF DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* PATHOTYPES ON WHOLE CARROTS AND IN UNPASTEURIZED CARROT JUICE”


Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento


Dr. Cesar Octavio Manzón
Rector del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías


Dr. Arturo Chávez Chávez
Director de la División de Ciencias Básicas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías



XV Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos

XXX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos

31 de Octubre y 1 noviembre 2013, Guadalajara, Jalisco, México

La Universidad de Guadalajara otorga la presente

CONSTANCIA

A: Mora-Peñaflor N., Gómez-Aldapa, C.A.,
Rangel-Vargas, E. y Castro-Rosas, J.

por su participación como:

Autores del trabajo libre presentado en modalidad cartel

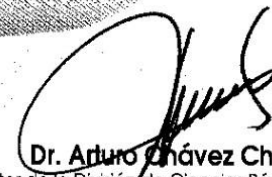
“BEHAVIOR OF DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* PATHOTYPES ON WHOLE AND SLICED JALAPEÑO AND SERRANO PEPPERS AND CHILI SAUCES”



Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento



Dr. Cesar Octavio Monzon
Rector del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías



Dr. Arturo Chávez Chávez
Director de la División de Ciencias Básicas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías





Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala

AWARDS THIS
CERTIFICATE OF PRESENTATION

to:

**Nancy Mora, Javier Castro, Carlos A. Gómez, Otilio A. Acevedo
and Melitón J. Franco**

for presenting the contribution entitled:
**COMPORTAMIENTO DE Escherichia coli O157:H7, Salmonella
Typhimurium, Listeria monocytogenes Y Staphylococcus aureus EN
QUESO FRESCO ADICIONADO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON
POTENCIAL PROBIÓTICO**


IN THE

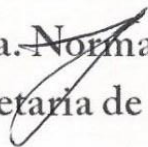
**1ST BIOTECHNOLOGY
WORLD SYMPOSIUM**


&

**9^o ENCUENTRO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN**

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.


Dra. Myrna Solis Oba
residente del comité organizador


Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla
Secretaría de Investigación y Posgrado


Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
Director CIBA Tlaxcala

Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos

XXXI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos

6, 7 y 8 de noviembre 2014, Nuevo Vallarta, Nayarit, México

La Universidad de Guadalajara otorga la presente

CONSTANCIA

A: Fabiola Arellano Chapa, Nancy Mora Peñaflor, Carlos A. Gómez Aldapa y Javier Castro Rosas.

por su participación como:

Autores del trabajo libre presentado en modalidad cartel

“INCREMENTO DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE UNA CEPA DE *Lactobacillus pentosus* PROVOCADO POR MUTACIÓN ESPONTÁNEA”


Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento


Dr. Cesar Octavio Monzón
Rector del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías


Dr. Arturo Chávez Chávez
Director de la División de Ciencias Básicas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

