

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



COMPROBACION DEL EFECTO DE UNA MEZCLA DE PROBIOTICOS EN
QUESO NO MADURADO DE LECHE DE CABRA CONTRA *Staphylococcus*
aureus

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

KAREN LISSETH SORTO RAMIREZ

ILIANA MARCELA VELIS LEMUS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2018

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia González de Díaz

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE ASESOR

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

AGRADECIMIENTOS

A MSc. María Evelin Sánchez de Ramos, por su dedicación, esfuerzo, paciencia y sabiduría que siempre nos brindó en el momento oportuno, por animarnos a dar lo mejor de nosotras en esta investigación.

Al tribunal calificador: MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, MSc. Coralia González de Díaz y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez por sus consejos y orientación oportuna en el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Microbiología de Alimentos de CENSALUD de la Universidad de El Salvador por habernos brindado la oportunidad de realizar la parte experimental para el desarrollo de nuestro trabajo de graduación, a MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez coordinadora del laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y a la laboratorista Zoily, que nos brindaron su ayuda en todo momento.

DEDICATORIAS

A Jesucristo hijo de Dios sea la gloria por darme vida, fuerza y sabiduría, para alcanzar esta victoria profesional.

A mi abuela Berta Cecilia Ramírez, que Dios tiene en su presencia que me brindó su amor, oraciones y esfuerzo para que pudiera cumplir esta meta.

A mi abuelo que ha sido mi padre dándome consejos y que se ha esforzado para verme alcanzar esta bendición.

A mi madre, mis hermanos, mi novio, mis tías y primos que me impulsaron a luchar y no desmayar en esta carrera, también a mi tío que me ayudo cuando lo necesité.

Al doctor Orantes y su familia que siempre me animaron a seguir hasta el final.

A los hermanos de la Iglesia de Dios Profética Viva y a los hermanos de la Iglesia Evangélica La hora viene San Juan 4:23 que nos llevaron en sus oraciones y a todo aquel que elevó una oración por nosotras.

A mis amigos Francisco Rivera y Jarek Cortez de quienes recibí un apoyo sincero siempre.

A Iliana y su familia que nos aconsejó y apoyo en todo momento.

Karen Lisseth Sorto Ramírez.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme sabiduría para poder culminar mi carrera profesional.

A mi mami, Gloria Esperanza Lemus Cerna y mi papi Ricardo Evelio Velis Baires, por haberme apoyado en todo momento y ser parte esencial de este logro.

A mis hermanos, William Velis y Ricardo Velis, por apoyarme en todo momento.

A mis amigos, Francisco Rivera, Marcela Carías, Marielos Mendoza, Anyoleth Pérez, Melissa Hernández, Joesun Rj Vt por haberme brindado su valiosa amistad en el transcurso de la carrera.

A mi compañera de tesis Karen Sorto por haberme brindado su confianza para poder realizar nuestro trabajo de graduación.

Iliana Marcela Velis Lemus.

INDICE GENERAL

	N° Pág.
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xxv
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	30
3.1 Bacterias ácido lácticas	30
3.2 Características de las bacterias ácido lácticas	31
3.2.1 La familia <i>Lactobacillaceae</i>	31
3.2.2 Clasificación	32
3.3 El género <i>Lactobacillus</i>	33
3.3.1 Carácteres morfológicos	33
3.3.2 Pared celular y ultraestructura	34
3.3.3 Caracteres culturales y de las colonias	34
3.3.4 Nutrición y condiciones de crecimiento	35
3.4 Condiciones ecológicas	36
3.4.1 pH	36
3.4.2 Necesidades de oxígeno	36

3.4.3	Temperatura de crecimiento	36
3.4.4	Metabolismo	37
3.4.5	Sensibilidad a antibióticos y drogas	38
3.4.6	Patogenicidad	38
3.4.7	Hábitat	38
3.4.8	Bacteriocinas	39
3.5	Probióticos	39
3.5.1	Definición	39
3.5.2	Mecanismo de acción	40
3.5.3	Factores biológicos y tecnológicos en el uso de probióticos.	41
3.5.4	Selección de probióticos	41
3.5.5	Propiedades benéficas para la salud.	42
3.5.6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	45
3.6	Efectos de los probióticos en diversas patologías	46
3.6.1	Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales	46
3.6.2	Diarrea aguda	46
3.6.3	Efecto del probiótico sobre la diarrea aguda	46
3.6.4	Diarrea asociada a antibióticos	47
3.6.5	Diarrea del viajero	47

3.6.6	Enfermedad inflamatoria intestinal	47
3.7	Leche	48
3.7.1	Definición	48
3.7.2	Composición general de la leche	48
3.7.3	Grasa	48
3.7.4	Proteína	48
3.7.5	Lactosa	48
3.7.5	Sales o minerales	49
3.7.7	Vitaminas	49
3.8	Leche de cabra y su composición	49
3.8.1	Principales diferencias de la composición de leche de vaca con la leche de cabra.	50
3.8.2	Beneficios a la salud	52
3.9	Grupos más importantes de microorganismos presentes en la leche	52
3.9.1	<i>Escherichia coli</i>	53
3.9.2	<i>Staphylococcus</i>	53
3.9.3	<i>Salmonella</i>	53
3.9.4	<i>Listeria monocitogenes</i>	54
3.10	Quesos	54
3.10.1	Clasificación	54

3.10.2	Los quesos frescos	54
3.10.3	El queso como vehículo de probióticos	55
3.11	Microorganismo patógeno	56
3.11.1	Genero <i>Staphylococcus</i>	56
3.11.2	Características	56
3.11.3	Hábitat de <i>Staphylococcus</i>	57
3.11.4	División de <i>Staphylococcus</i>	57
3.11.5	Aislamiento	58
3.11.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	58
3.11.7	<i>Staphylococcus aureus</i> , el patógeno de los manipuladores	59
3.11.8	Intoxicaciones alimentarias por <i>Staphylococcus aureus</i>	59

CAPITULO IV

4.0	DISEÑO METODOLÓGICO	
4.1	Tipo de estudio	62
4.2	Transversal	62
4.3	Investigación bibliográfica	62
4.4	Investigación de campo	62
4.5	Obtención de materias primas	62
4.5.1	Universo	63
4.5.2	Muestras	63

4.6	Experimental	64
4.7	Parte experimental	65
4.7.1	Pasteurización de leche de cabra	65
4.8	Análisis microbiológico a la leche pasteurizada establecido por el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos	65
4.8.1	Determinación de <i>Escherichia coli</i> por método de tubos múltiples (NMP) en leche de cabra	65
4.8.2	Determinación de <i>Salmonella spp.</i> en leche de cabra	66
4.8.3	Pruebas Bioquímicas para <i>Salmonella spp</i> en leche de cabra	67
4.8.4	Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche de cabra	70
4.8.5	Pruebas presuntivas	70
4.8.6	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche de cabra	71
4.8.7	Determinación de pH de leche de cabra pasteurizada	71
4.9	Aislamiento de mezcla de <i>Lactobacillus spp.</i> de un yogurt comercial que rotula contener <i>Lactobacillus acidophylus</i>	71
4.9.1	Identificación de mezcla de cepas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp</i>	72
4.9.2	Tinción de Gram para identificación de bacterias	73

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp</i>	
4.9.3	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	74
4.9.4	Tinción de Gram	74
4.9.5	Prueba de la catalasa	75
4.9.6	Prueba de la coagulasa para identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	75
4.9.7	Estandarización de las bacterias probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	76
4.9.8	Estandarización de la bacteria patógena <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	77
4.10	Inoculación de la mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	78
4.10.1	Proceso de elaboración de queso no madurado a partir de leche de cabra pasteurizada	78
4.10.2	Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i> 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con la mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g y su respectiva réplica	79
4.10.3	Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i> 1×10^5 UFC/g en queso no madurado con la mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^7 UFC/g y su respectiva réplica	79
4.10.4	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso no	80

	madurado	
4.10.5	Recuento de mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y mezcla de <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> en queso no madurado	81
4.10.6	Determinación del porcentaje de sobrevivencia de bacterias en estudio	81

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1	Comprobación de la calidad microbiológica de la leche de cabra pasteurizada según lo establecido en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos	83
5.2	Resultados de la estandarización de la mezcla de las cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentraciones 1.0×10^5 UFC/g y 1.0×10^7 UFC/g y la cepa patógena <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> a concentraciones de 1×10^3 UFC/g y 1×10^5 UFC/g incorporados en el proceso de elaboración del queso.	83
5.2.1	Estandarización de la cepa patógena <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923.	85
5.3	Elaboración de queso no madurado a partir de leche de cabra pasteurizada con inóculo de una mezcla de las cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp</i> y de la cepa patógena <i>Staphylococcus</i>	87

aureus a diferentes concentraciones.

- 5.4 Determinación de la sobrevivencia de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* en queso no madurado elaborado de leche de cabra y del patógeno *Staphylococcus aureus* a temperatura de refrigeración a través de recuentos en placa a los 0, 5, 8 y 15 días. 88

CAPITULO VI

- 6.0 CONCLUSIONES 95

CAPITULO VII

- 7.0 RECOMENDACIONES 98

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		N° Pág.
1	Morfología de las cepas probióticas, a) <i>Bifidobacterium</i> , b) <i>Lactobacillus</i> .	32
2	Bases teóricas para la selección de microorganismos probióticos.	42
3	Morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4	Quesos no madurados con mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> (a) concentración 1.0×10^5 UFC/g y (b) concentración 1.0×10^7 UFC/g.	87
5	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 de concentración 1×10^3 UFC/g y mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> 1×10^5 UFC/g	88
6	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 de concentración 1×10^5 UFC/g y mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> 1×10^7 UFC/g	91
7	Etiqueta del alimento	112
8	Obtención de materia prima	114
9	Pasteurización de leche de cabra	116
10	Determinación de <i>Escherichia coli</i> por método de tubos múltiples (NMP).	118

11	Determinación de <i>Escherichia coli</i>	121
12	Determinación de <i>Salmonella spp.</i>	123
13	Pruebas bioquímicas: TSI	125
14	Pruebas bioquímicas: Agar Citrato.	126
15	Pruebas bioquímicas: Agar Movilidad.	127
16	Pruebas bioquímicas: Caldo Indol.	128
17	Pruebas bioquímicas: Rojo de Metilo	129
18	Pruebas bioquímicas: Voges Proskauer	130
19	Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche de cabra.	132
20	Test de hemólisis (agar sangre de oveja)	134
21	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche de cabra.	136
22	Determinación de pH leche de cabra pasteurizada.	139
23	Aislamiento de <i>Lactobacillus spp.</i>	141
24	Identificación de la mezcla de las cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	143
25	Tinción Gram para identificación de bacterias <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	145
26	Estandarización de la mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	147
28	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	150
29	Tinción Gram	152

30	Pruebas de identificación: Prueba de la catalasa	154
31	Prueba de la coagulasa para identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	155
32	Estandarización de la Bacteria Patógena <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	157
34	Elaboración de queso no madurado a base de leche de cabra	160
36	Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i> 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g y su respectivo duplicado.	163
37	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> queso no madurado.	165
38	Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> en queso no madurado de leche pasteurizada de cabra.	167

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		N° Pág.
1	Microorganismos ácido – lácticos considerados como probióticos	33
2	Principales efectos beneficiosos atribuidos a las cepas descritas como probióticos	44
3	Comparación de la composición de leche de cabra y leche de vaca	50
4	Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella spp</i>	69
5	Resultado de la calidad microbiológica de leche pasteurizada	83
6	Recuento en placa de mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	85
7	Resultado de pruebas de identificación <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	86
8	Resultados de la estandarización de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	86
9	Sobrevivencia de la cepa patógena y mezcla de cepas probióticas promedio de logaritmo natural de la concentración de recuentos en placa en queso no madurado.	89
10	Sobrevivencia de la cepa patógena y mezcla de cepas probióticas promedio de logaritmo natural de la concentración de recuentos en placa en queso no madurado.	92

11	Tabla para 3 tubos cada uno a 0.1, 0.01 y 0.001g de inóculo, el número mas probable por gramo e intervalos de confianza de 95%.	119
12	Especificaciones microbiológicas para leche establecidos por el REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS RTCA 67.04.50:08.	137
13	Sobrevivencia de mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g.	168
14	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a concentración 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g.	169
15	Sobrevivencia de mezcla cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^7 UFC/g.	170
16	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a concentración 1×10^5 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^7 UFC/g. (L2Q1 y L2Q2)	171

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°		N° Pág.
1	Lista de chequeo	110
2	Formato etiqueta de recolección	112
3	Obtención de materia prima	113
4	Pasteurización de leche de cabra	115
5	Determinación de <i>Escherichia coli</i> por método de tubos múltiples (NMP).	117
6	Tabla para 3 tubos cada uno a 0.1, 0.01 y 0.001g de inóculo, el número mas probable por gramo e intervalos de confianza de 95%.	119
7	Determinación de <i>Escherichia coli</i> .	120
8	Determinación de <i>Salmonella spp.</i>	122
9	Pruebas bioquímicas	124
10	Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche de cabra.	131
11	Test de hemolisis (agar sangre de oveja)	133
12	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche de cabra.	135
13	Especificaciones microbiológicas para leche establecidos por el Reglamento técnico centroamericano alimentos. criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos RTCA 67.04.50:08	137
14	Determinación de pH leche de cabra pasteurizada.	138
15	Aislamiento de <i>Lactobacillus spp.</i>	140
16	Identificación de la mezcla de las cepas probióticas	142

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	
17	Tinción Gram para identificación de bacterias <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	144
18	Estandarización de la mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	146
19	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	149
20	Tinción Gram	151
21	Pruebas de identificación: Prueba de la catalasa	153
21	Pruebas de identificación: Prueba de la coagulasa para identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	155
22	Estandarización de la Bacteria Patógena <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	156
23	Elaboración de queso no madurado a base de leche de cabra	159
24	Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i> 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g y su respectivo duplicado.	162
25	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> queso no madurado	164
26	Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> en queso no madurado de leche pasteurizada de cabra.	166
27	Sobrevivencia de mezcla de probióticos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a	168

	concentración 1×10^5 UFC/g.	
28	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a concentración 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^5 UFC/g.	169
29	Sobrevivencia de mezcla cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^7 UFC/g.	170
30	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a concentración 1×10^5 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> a concentración 1×10^7 UFC/g. (L2Q1 y L2Q2)	171

RESUMEN

En el presente trabajo se pasteurizó leche de cabra, se analizó y comparó con los parámetros establecidos en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos y se verificó el cumplimiento de los mismos. Se inoculó la leche pasteurizada con mezclas de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentraciones 1.0×10^5 UFC/g y 1.0×10^7 UFC/g luego se elaboró artesanalmente dos quesos no madurados de cada concentración y sus réplicas. Se inoculó en los quesos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentraciones 1.0×10^3 UFC/g y 1.0×10^5 UFC/g.

Determinar la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* en el queso probiótico, permitió comprobar el efecto probiótico de cada mezcla. La sobrevivencia de probióticos en queso sin patógeno aseguró la viabilidad de estas. Las muestras se almacenaron a temperatura de refrigeración (5°C), durante los días 0, 5, 8 y 15 tiempo de duración del estudio. La mezcla de probióticos 1.0×10^5 UFC/g actuó contra *Staphylococcus aureus* 1.0×10^3 UFC/g desde el día 0 al 5 inhibiendo el crecimiento, este comportamiento fue constante hasta el día 15, esto permitió mantener una concentración de patógeno aceptable según el reglamento. La mezcla de probióticos 1.0×10^7 UFC/g actuó contra *Staphylococcus aureus* 1.0×10^5 UFC/g, inhibiéndolo del día 0 al 8, pero el efecto inhibitorio se redujo del día 8 al 15 porque se incrementó levemente la concentración de patógeno. En conclusión ambas mezclas inhiben al patógeno debido a que producen bacteriocinas, además de otras sustancias inhibitorias.

Se recomienda pasteurizar la leche previo a la elaboración de quesos, usar la mezcla probiótica 1.0×10^5 UFC/g para biopreservación de quesos siempre que la concentración de patógeno sea menor a 1.0×10^3 UFC/g y mantener la cadena de frío, consumir quesos probióticos para prevenir enfermedades gastrointestinales debido a toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En El Salvador se desconoce la incidencia de las enfermedades ocasionadas por la ingestión de alimentos populares, debido en parte a limitaciones del servicio de información epidemiológica y a dificultades por parte de los laboratorios para identificar los agentes causales.

Los microorganismos patógenos presentes en los alimentos de mayor consumo en El Salvador ponen de manifiesto los riesgos ocasionados por el incumplimiento de la aplicación de buenas prácticas de manufactura y de buenas prácticas de higiene por parte de los manipuladores de alimentos.

En la mayoría de los productos lácteos se encuentra falta de pasteurización y en los productos pasteurizados hay falta de registros de temperatura, presencia de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, Hepatitis A, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp*, *Listeria monocytogenes* y Leptospirosis por falta de aplicación de normas higiénicas.

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos detectados en alimentos, indican la contaminación a la que están expuestos los salvadoreños al consumirlos.

La leche caprina no es diferente de la de otras especies en lo que a calidad de proteínas se refiere. Su leche es una fuente excelente de proteína animal que puede ser consumida por los niños y la familia en forma de leche fresca o transformada en queso.

Por todo lo anterior, se comprobó el efecto de la mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp*. en queso no madurado elaborado de leche de cabra contra *Staphylococcus aureus*, esta leche se ha vuelto popular por ser de fácil acceso, pero sus condiciones inadecuadas de transporte e higiene, pueden desencadenar enfermedades en los consumidores.

La leche se pasteurizó y se analizó para verificar el cumplimiento del RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos, se estandarizó la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentraciones 1.0×10^5 UFC/g y 1.0×10^7 UFC/g y se adicionaron a la leche pasteurizada, se elaboraron dos quesos y sus réplicas. En cada queso se inoculó el microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentraciones de 1.0×10^3 UFC/g y 1.0×10^5 UFC/g. Luego se realizaron los recuentos en placa a los días 0, 5, 8 y 15 del microorganismo patógeno en queso con mezcla de probióticos para comprobar el efecto inhibitorio y también se realizaron recuentos en queso con mezcla de probióticos sin patógeno verificando la viabilidad de esta.

La investigación se realizó en el Laboratorio Microbiológico de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en el período comprendido entre Septiembre a Noviembre del año 2017.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Comprobar el efecto de una mezcla de probióticos en queso no madurado de leche de cabra contra *Staphylococcus aureus*

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Comprobar la calidad microbiológica de la leche de cabra pasteurizada según lo establecido en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.

2.2.2 Estandarizar la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentraciones 1.0×10^5 UFC/g y 1.0×10^7 UFC/g y la cepa patógena *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 1.0×10^3 UFC/g y 1.0×10^5 UFC/g incorporados en el proceso de elaboración del queso.

2.2.3 Elaborar queso no madurado a partir de leche de cabra pasteurizada con inóculo de una mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* y de la cepa patógena *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones.

2.2.4 Determinar la sobrevivencia de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* en queso no madurado elaborado de leche de cabra y del patógeno *Staphylococcus aureus* a temperatura de refrigeración a través de recuentos en placa a los 0, 5, 8 y 15 días.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1. Bacterias ácido lácticas ^{(13) (41)}

Los alimentos además de ser una fuente de nutrientes, a menudo constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación microbiana. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como leche, carne y vegetales, para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. asimismo las BAL son de gran utilidad en la producción de vinos y cervezas.

Las BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Además los probióticos son cultivos puros o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al estar en cantidades adecuadas mejoran la salud. En este sentido, la mayoría de los probióticos pertenecen a las BAL y son usadas en la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud; estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto posteriormente. Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha podido comprobar que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal. Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de

ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros. Las bacterias lácticas pueden ser utilizadas en la prevención y el control de determinadas enfermedades, así como en el mejoramiento de la calidad de conservación de ciertos alimentos, por lo que su valor radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos que sirvan como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal.

3.2 Características de las bacterias ácido lácticas ^{(13) (41)}

3.2.1 La familia *Lactobacillaceae*

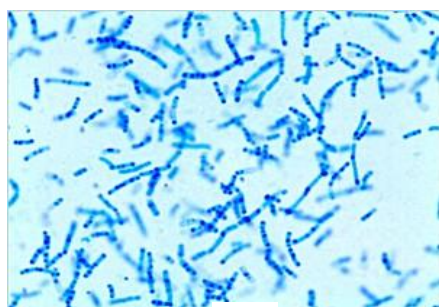
Las bacterias ácido lácticas se ubican en la familia *Lactobacillaceae*, la cual se caracteriza porque sus miembros pueden ser bacilos largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados. Estas bacterias son normalmente no móviles, aunque también pueden serlo. Las especies móviles presentan flagelación peritrica. Son Gram positivas, con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo. Las especies microaerófilas raras veces licúan la gelatina, sin embargo, las anaerobias estrictas lo hacen más comúnmente. Presentan pobre o ningún crecimiento superficial en cualquier medio. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar a ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono (CO_2) como subproductos. No producen nitritos a partir de los nitratos, pero entre los anaerobios estrictos hay algunas especies

que reducen los nitratos y otras que no se han probado con esta reacción. Son microaerófilas hacia la anaerobiosis. Se encuentran regularmente en la boca, en el tracto intestinal del hombre y otros animales, en alimentos, productos lácteos y en jugos vegetales fermentados. Unas pocas especies son altamente patógenas.

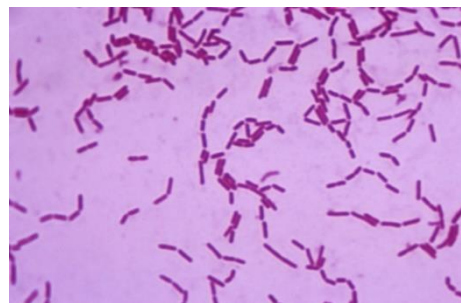
3.2.2 Clasificación ⁽⁴¹⁾

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina.

En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.



a)



b)

Figura N°1. Morfología de las cepas probióticas, a) *Bifidobacterium*, b) *Lactobacillus*.

TABLA N° 1. MICROORGANISMOS ÁCIDO – LÁCTICOS CONSIDERADOS COMO PROBIOTICOS⁽³⁹⁾

Especies <i>Lactobacillus</i>	Especies Bifidobacterias	Otras bacterias Ácido- Lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescencis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. amylovarus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> sup. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pedicococcus acidilactici</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B (bifidobacterium)</i>	-----
<i>L. paracasei</i>	-----	-----
<i>L. plantarum</i>	-----	-----
<i>L. reuteri</i>	-----	-----
<i>L. rhamnosus</i>	-----	-----
<i>L (lactobacillus)</i>	-----	-----
<i>L. fermentum</i>	-----	-----

3.3 El género *Lactobacillus*

3.3.1 Carácteres morfológicos ⁽¹³⁾

El género *Lactobacillus* (lactis - leche; bacillus – pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco - bacilos coryneformes, lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no mótiles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de

Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

3.3.2 Pared celular y ultraestructura ⁽¹³⁾

La pared celular de *Lactobacillus*, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina – D – Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicóicos relacionados a ella en algunas especies. También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género.

3.3.3 Caracteres culturales y de las colonias ⁽¹³⁾

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2- 5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas, otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción.

Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares.

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Las bacterias del género *Lactobacillus* no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas

cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni ácido sulfhídrico (H₂S).

Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa.

En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. *Lactobacillus* no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados, sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso.

3.3.4 Nutrición y condiciones de crecimiento ⁽¹³⁾

Lactobacillus presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de *Lactobacillus* contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales. Debido a que las bacterias ácido lácticas (BAL) poseen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares; su

clasificación se ha tornado difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural.

Debido a la alta variabilidad de esta región entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de bacterias ácido lácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR.

3.4 Condiciones ecológicas ⁽¹³⁾

3.4.1 pH

Lactobacillus crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.5 - 4.5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6 en dependencia de especies y cepas, disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras.

3.4.2 Necesidades de oxígeno ⁽¹³⁾

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.

3.4.3 Temperatura de crecimiento ⁽¹³⁾

La mayor parte de *Lactobacillus* son mesófilos (30 - 40°C), con un límite

superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados).

Los llamados *Lactobacillus* “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos *Lactobacillus* termófilos que crezcan por encima de 55°C.

3.4.4 Metabolismo ⁽¹³⁾

En su metabolismo, *Lactobacillus* van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas.

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación, constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado. Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por fermentación homoláctica y la vía del 6 - fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica. En condiciones aerobias, la mayoría de las cepas reoxidan el NADH₂ utilizando el O₂ como aceptor final de electrones, de modo que el Acetil-CoA no es, o al menos no es completamente reducido a etanol. De esta manera, se forma ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como proporciones variables de ácido acético y etanol, en dependencia del suministro de oxígeno. En cuanto a los niveles

enzimáticos, *Lactobacillus* heterofermentativos poseen fosfocetolasas, pero no FDP aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfocetolasas.

3.4.5 Sensibilidad a antibióticos y drogas ⁽¹³⁾

Lactobacillus son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de *Lactobacillus* intestinales ante antibióticos empleados como aditivos alimenticios.

3.4.6 Patogenicidad ⁽¹³⁾

Aparte de las caries dentales, la patogenicidad de *Lactobacillus* es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius*.

Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen.

3.4.7 Hábitat ⁽¹³⁾

Lactobacillus pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la microbiota normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en hábitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos,

que son de hecho sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos.

3.4.8 Bacteriocinas ⁽¹³⁾

La utilización de las BAL y/o sus metabolitos para la preservación de alimentos es generalmente aceptado por consumidores como algo “natural” y “promotores de salud”.

Las BAL producen un conjunto de sustancias antimicrobianas (como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoína, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas) que han sido utilizadas como biopreservadoras en productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos no madurados y madurados con el objeto de evitar proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* y *Staphylococcus aureus*.

Las bacteriocinas son componentes proteínicos antibacterianos que son producidos por BAL comúnmente presentes en alimentos. Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. Han sido objeto de muchas investigaciones en recientes años por su novedoso uso potencial como preservante natural en alimentos y propósitos médicos.

Aunque las bacteriocinas se pueden sintetizar por levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, son las producidas por las bacterias ácidos lácticas las que han recibido mayor atención porque, además de conservar a los alimentos, provienen de un grupo bacteriano, por excelencia, saludable. ⁽⁴⁷⁾

3.5 Probióticos

3.5.1 Definición ^{(31) (4)}

Los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como “microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped”. La

mayoría de los probióticos, son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces*.

La definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que integran un producto probiótico durante todo el período de su vida útil, ya que esto condicionará su efectividad.

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos:

Los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen, principalmente, con fines nutritivos (yogures, leche, quesos.)

Las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila.)

Los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas. Los de mayor aceptación son el yogur y las leches fermentadas por constituir un buen vehículo para el aporte de un elevado número de bacterias viables y de nutrientes altamente biodisponibles. Esto se debe, a que la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en las leches fermentadas alcanzan valores altos entre 1.0×10^5 - 1.0×10^9 UFC/mL.

3.5.2 Mecanismo de acción ⁽³⁹⁾

Los mecanismos que pueden estar implicados en la acción de los probióticos en la salud humana incluyen:

- La producción de sustancias inhibitorias antimicrobianas como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, antibióticos y ácidos biliares.

- Actuación como antagonista competitivo, por ejemplo, competición por la adhesión de sitios y nutrientes.
- Estimulación del sistema inmune.

Otros posibles mecanismos como: mejoramiento de las funciones de la barrera intestinal, control en la transferencia de antígenos dietarios, y estimulación de la mucosa e inmunidad sistémica del huésped.

3.5.3 Factores biológicos y tecnológicos en el uso de probióticos. ⁽²⁹⁾

Los factores que deberían ser considerados en el desarrollo de alimentos que contengan probióticos son:

Selección de la cepa (con respecto a sus propiedades biológicas y tecnológicas), nivel de inóculo, toxicidad, adaptación al proceso (principalmente tipo de sustrato, competencia con otros cultivos lácticos, calentamiento), identificación y enumeración de la población viable, estabilidad durante el almacenamiento (pH, oxígeno), cambios en las propiedades sensoriales.

3.5.4 Selección de probióticos ⁽³⁹⁾

Para la selección de microorganismos probióticos se debe tener en cuenta que las cepas para la utilización humana sean preferiblemente de origen humano y aisladas del tracto gastrointestinal; además, no deben tener un historial de patogenicidad ni asociación con enfermedades y por último, no deben transmitir resistencia genética a antibióticos. Además de lo anterior se espera que los probióticos tengan las siguientes características (figura N°2):

Fácil reproducibilidad, capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales en las que actúan, genéticamente estable, la ausencia de toxinas y reacciones cancerígenas, capacidad para seguir siendo viable durante la elaboración y capacidad para fijarse y colonizar el lugar donde están activos.



Figura N°2. Bases teóricas para la selección de microorganismos probióticos. ⁽³⁹⁾

3.5.5 Propiedades benéficas para la salud. ⁽³⁷⁾

En los recientes años, ha surgido un interés renovado en el uso de microorganismos en alimentos debido a su aporte en el sabor y aroma, pero principalmente por sus aspectos beneficiosos en la restauración de la salud y tratamiento de enfermedades. Bajo condiciones naturales, se desarrolla una microbiota protectora en el intestino y no es necesario un suplemento bacteriano, pero los cambios en los hábitos alimenticios y el estilo de vida han hecho que se consuman alimentos procesados y estériles, sustancias

antibacterianas desde vinagre hasta antibióticos, lo que afecta el acceso y la colonización de ciertos tipos de bacterias.

Los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo y que también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolácticos.

Los sinónimos que se han adquirido los microorganismos benéficos se basan en los estudios con sólido apoyo experimental que han puesto de manifiesto las bondades de su uso en prevenir las infecciones gastrointestinales y el efecto estimulador que tienen en el sistema inmune.

Al estar en contacto con el exterior, el sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunológico, que recibe diariamente una enorme carga antigénica.

Los elementos potencialmente patógenos y antígenos inocuos como son las proteínas de la dieta y las bacterias comensales deben ser diferenciados en él.

Los principales efectos benéficos para la salud de humanos y animales de los probióticos son el balance de la microbiota intestinal, el mejoramiento del sistema inmune y prevención de cáncer.

Los alimentos probióticos poseen niveles importantes de estas bacterias las cuales producen una serie de componentes biológicamente activos que ofrecen efectos fisiológicos deseables más allá de sus efectos nutricionales.

En la siguiente tabla, se aporta un resumen de los principales efectos beneficiosos atribuidos a las cepas principales descritas como probióticos

TABLA N°2. PRINCIPALES EFECTOS BENEFICIOSOS ATRIBUIDOS A LAS CEPAS DESCRITAS COMO PROBIÓTICOS. ⁽²⁶⁾

CEPA	EFECTO BENEFICIOSO
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Adherencia al epitelio intestinal humano. Equilibrio de la microbiota intestinal. Mejora de la respuesta inmune.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Prevención de la diarrea asociada a antibióticos. Tratamiento de la diarrea por Rotavirus. Tratamiento de la diarrea causada por <i>Clostridium difficile</i> . Mejoras en la enfermedad de Chron.
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Prevención de la alteración de la microbiota intestinal. Efectos positivos para prevenir el cáncer de vejiga.
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Reducción de los enzimas carcinógenos.
<i>Bacillus subtilis</i>	Utilización para bacterioterapia oral Restauración de la microbiota normal. Inmunoestimulación.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Prevención de la diarrea viral
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Crecimiento y estimulación de otras bacterias beneficiosas.

3.5.6 *Lactobacillus rhamnosus*.⁽⁵⁾⁽¹⁹⁾

Es el probiótico con más de 100 ensayos clínicos publicados que han estudiado sus efectos sobre la salud. Numerosos estudios han evaluado los efectos de *Lactobacillus rhamnosus*, en el tratamiento de la diarrea aguda, mostrando que no afectaba el volumen de deposición emitida pero disminuía significativamente la duración de los episodios de diarrea, particularmente en aquellos producidos por rotavirus, además de disminuir el riesgo de diarrea y la duración de hospitalización.

Concluyeron que *Lactobacillus rhamnosus* también podía ejercer un efecto preventivo de la diarrea (diarrea asociada a antibióticos y diarrea del viajero).

Dicho efecto podría deberse a las propiedades antibacterianas o inmunoestimulantes de este. Cabe destacar, sin embargo, que *Lactobacillus rhamnosus* no ejerce un efecto inhibitor frente a *Helicobacter pylori*; no obstante, suministrado simultáneamente con el tratamiento antibiótico, tiende a disminuir los efectos adversos asociados a su administración.

A propósito del uso de probióticos por diarrea asociada a antibióticos, un estudio realizado en Polonia, no abordó directamente los mecanismos por los cuales las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* reducen el riesgo de desarrollar diarrea durante la terapia con antibióticos.

Sin embargo, la justificación para el uso de probióticos se basa en el supuesto de que el uso de antibióticos conduce a una alteración en la microbiota intestinal normal y que éste es un factor clave en la patogénesis de DAA (Diarrea Asociada a Antibióticos) y la infección por *Clostridium difficile*.

Se cree que los probióticos para restablecer el equilibrio de la microbiota intestinal alterada. Se han propuesto varios posibles mecanismos mediante los cuales los probióticos podrían ejercer su actividad contra los enteropatógenos

en seres humanos, basados principalmente en los resultados de estudios in vitro y en animales.

Estos incluyen la síntesis de sustancias antimicrobianas, la competencia por los nutrientes necesarios para el crecimiento de patógenos, la inhibición competitiva de la adhesión de patógenos, y la modificación de las toxinas o receptores de la toxina.

Es probable que varios de los mecanismos descritos anteriormente funcionan simultáneamente y que bien pueden diferir dependiendo de las propiedades de un patógeno entérico y de la cepa probiótica.

3.6 Efectos de los probióticos en diversas patologías ⁽²⁰⁾

Los efectos de los probióticos son varios incluyendo la modificación de la flora, evitando la colonización patógena, la prevención del desequilibrio de la flora intestinal, la reducción de la incidencia y duración de diarreas, el mantenimiento de la integridad de las mucosas, la modulación de la inmunidad al evitar la translocación bacteriana, la producción de vitaminas como la B₂, B₆ y biotina, la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral.

3.6.1 Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales ⁽²⁰⁾

3.6.2 Diarrea aguda

La diarrea modifica la función normal del tracto gastrointestinal como: la digestión, absorción e inmuno modulación, para combatir las diarreas se usan estrategias como las antibioterapias, que lleva implícito el riesgo de desarrollo de resistencia y disminución de la flora no patógena.

El uso de probióticos representa una alternativa prometedora en la prevención y tratamiento de diarreas.

3.6.3 Efecto del probiótico sobre la diarrea aguda ⁽²⁰⁾

-Producción de sustancias antibacterianas: bacteriocinas, lactocinas, helveticinas, bifidinas.

-Producción de ácidos grasos que acidifican el lumen intestinal, inhibiendo bacterias y manteniendo el buen funcionamiento de la mucosa intestinal.

-Disminución de la permeabilidad intestinal.

-Acción competitiva.

-Inmunomodulación y aumento de la IgA, regulación de citocinas y de la respuesta inmunitaria.

3.6.4. Diarrea asociada a antibióticos ⁽²⁰⁾

El uso de antibióticos puede producir diarrea, al alterar el equilibrio de la flora intestinal con descenso de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son los responsables de la resistencia a la colonización por patógenos, produciéndose infecciones por microorganismos oportunistas como: *Clostridium difficile*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Candida sp*, *Salmonella sp*.

3.6.5 Diarrea del viajero ⁽²⁰⁾

Muchos viajeros pueden desarrollar una diarrea aguda cuando visitan zonas de alto riesgo, la mayoría de casos no es severa, sin embargo la profilaxis es efectiva según los estudios, mediante la administración de *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*.

3.6.6 Enfermedad inflamatoria intestinal ⁽²⁰⁾

La predisposición genética, las alteraciones inmunológicas y las bacterias patógenas interactúan como agentes desencadenantes y perpetuadores de la enfermedad inflamatoria intestinal. La administración de probióticos empleada como una terapia de antagonismo bacteriano, es capaz de desplazar a las bacterias con potencial patógeno, con el subsiguiente

aumento de bífido bacterias, modificando favorablemente la exagerada respuesta inflamatoria, mejorando el epitelio intestinal y disminuyendo sus síntomas.

3.7 Leche

3.7.1 Definición ⁽³⁰⁾

Leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenidos mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinados al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior.

3.7.2 Composición general de la leche ⁽⁴⁶⁾

3.7.3 Grasa:

La grasa se encuentra en la leche en forma de diminutos glóbulos rodeados de una envoltura proteica, cuando se deja en reposo la leche, se produce la separación formándose una capa de nata, por su bajo peso específico.

El contenido graso de la leche depende mucho de la raza, alimentación y manejo de los animales.

3.7.4 Proteína:

La proteína de la leche está constituida por una serie de unidades fundamentales llamadas aminoácidos. La proteína de la leche contiene grandes cantidades de aminoácidos esenciales, los cuales son imprescindibles para el organismo humano ya que este no puede sintetizarlos y deben ingresar con los alimentos.

Esto es lo que hace que la proteína de la leche sea más valiosa que la proteína vegetal.

3.7.5 Lactosa:

La lactosa o azúcar de la leche es el nutriente necesario para las bacterias ácido lácticas que participan en la transformación de la leche en queso produzcan ácido láctico. Este hecho desempeña un papel esencial en la coagulación de la leche y es también responsable del sabor y consistencia del queso.

3.7.6 Sales o minerales:

Encontramos elementos como el calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio y cloro y en pequeñísimas cantidades hierro, cobre, molibdeno, cinc, manganeso, yodo y flúor.

Estos unidos a otros componentes de la leche son los responsables del alto valor nutritivo.

Para la fabricación del queso resulta de gran importancia el contenido de calcio, porque es necesario para la coagulación de la leche con el cuajo. La insuficiencia de calcio puede compensarse con el agregado de cloruro de calcio en la elaboración de queso

3.7.7 Vitaminas:

La leche contiene todas las vitaminas importantes para la vida, como la A, B, B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico y vitaminas C, D y E.

3.8 Leche de cabra y su composición. (4)(40)

Es una emulsión de grasa en una solución de agua, cuya composición varía según la especie. La mayoría de los componentes son similares a la leche de vaca en el contenido de sólidos totales, grasa, lactosa y los componentes nitrogenados que se dividen en componentes no-nitrogenados y proteínas. En las proteínas se encuentran las proteínas del suero (proteínas solubles, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas) y las caseínas.

Las proteínas solubles se encuentran en pequeñas cantidades junto con las proteasas-peptonas. Por su parte, las caseínas, que son las proteínas que coagulan en la leche, presentan marcadas diferencias respecto a la leche de vaca, esencialmente estas diferencias ocurren en el polimorfismo genético así como en la estructura, composición y tamaños de las micelas de las caseínas.

TABLA N°3. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LECHE DE CABRA Y LECHE DE VACA ^{(4) (40)}

COMPOSICIÓN	VACA	CABRA
Rendimiento (litros)	500-1000	3500-5000
Materia seca (g)	115-130	115-130
Lactosa (%)	40-50	45-50
Nitrógeno (%)	28-35	30-35
Grasa (%)	30-38	35-40
Minerales (%)	7-9	7-9
Proteínas (%)	3.2	3.3

3.8.1 Principales diferencias de la composición de leche de vaca con la leche de cabra. ⁽⁴⁾⁽⁴⁰⁾

En la leche de vaca la α -S1 caseína es la principal caseína con 6 diferentes tipos A, B, C, E, F y “nula”. Por otro lado, las caseínas en la leche de cabra están constituidas por cuatro fracciones principales: α -S1, α -S2, beta y kappa. En la leche de vaca es la α -S1 la caseína más abundante, mientras que en la leche de cabra es la variante α -S2. Las diferencias en los tipos de variantes genéticas son debidas a los aminoácidos presentes en las cadenas de las proteínas, los cuales son los responsables de las diferencias en la digestibilidad, en las propiedades para la elaboración de quesos y en los sabores generados a los productos de la leche de cabra. La acción de las proteasas sobre las caseínas de la leche de cabra genera péptidos de sabor

menos amargo que los obtenidos de las caseínas de leche de vaca. Las micelas de las caseínas de leche de cabra tienen un rango de dispersión más elevado, mayor mineralización y un nivel más bajo de hidratación que las micelas de la leche de vaca. La acidez de la leche de cabra (6.4%) es ligeramente menos ácida que la de vaca (6.7%). La leche de cabra no contiene carotenos por lo que sus productos no son de color amarillos como ocurre con los productos de la leche de vaca.

En relación a la grasa, la leche de cabra contiene glóbulos de grasa más pequeños que los de la leche de vaca. La presencia de estos glóbulos de grasa pequeños en la leche de cabra se ha relacionado con una leche más digerible y con propiedades nutricionales importantes. El contenido de los ácidos: butírico, caproico, caprílico, cáprico, laúrico, mirístico, palmítico y linoleico es mayor, pero menor en el ácido esteárico y oleico. Tres de los triglicéridos de cadena media son llamados de “cabra” debido a que predominan en la leche de cabra.

En los últimos años, la leche de cabra ha sido objeto de diversos estudios, los mismos han demostrado una serie de ventajas con respecto a la leche de otras especies. Es una fuente excelente de proteínas y provee un gran número de aminoácidos esenciales. Es además rica en calcio y muchas vitaminas (A, D, B₁, B₂, B₁₂).

La leche de cabra, tiene la ventaja de ser mucho más digerible para los pacientes que no toleran la leche de vaca por alergia a sus proteínas o por el tamaño de sus glóbulos de grasa, más pequeños (aproximadamente 2 μm) que los de vaca (aproximadamente de 2,5 a 3,5 μm) y a la ausencia de la proteína aglutinina, que une los glóbulos de grasa. El sector lácteo se ha caracterizado por el dinamismo y diversificación de productos, basado de manera casi exclusiva en derivados de la leche de vaca.

La leche cruda es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos. Aunado a esto, la microbiota normal tiene gran influencia sobre la calidad de la leche cruda.

Sin embargo, diversos estudios demuestran que los factores principales, responsables de los casos o brotes de intoxicación por alimentos se deben al manejo deficiente de ellos. La frecuencia de brotes de intoxicación asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones de ordeña, transporte y procesamiento de la leche.

3.8.2 Beneficios a la salud ⁽⁴⁾

- Los tres triglicéridos de cadena media (C₆-C₁₄) han sido utilizados clínicamente en tratamientos médicos de diversos desórdenes clínicos como: Síndrome de la mala absorción, alimentación de bebés prematuros, desnutrición infantil, fibrosis quística, epilepsia, etc. debido a que estos ácidos proveen directamente la energía en lugar de ser depositados en tejido adiposo.
- El consumo de leche de cabra reduce los niveles de colesterol y mantiene normales los niveles de triglicéridos, HDL, GOT y GPT.

3.9 Grupos más importantes de microorganismos presentes en la leche ⁽⁴⁶⁾

A los microorganismos los podemos clasificar en patógenos y beneficiosos.

Son beneficiosos aquellos que resultan deseables por ser necesarios para la elaboración de productos de buena calidad, entre ellos se incluyen las bacterias ácido lácticas.

Los microorganismos patógenos son los perjudiciales e indeseables que como consecuencia de higiene deficiente, suciedad y prácticas erróneas, llegan a la leche o productos lácteos, donde se multiplican.

3.9.1 *Escherichia coli*₍₄₆₎

Es un microorganismo fecal que está presente en el intestino del hombre y de los animales y también en aguas contaminadas con heces fecales.

La presencia de esta bacteria denota que existen graves deficiencias higiénicas. Este microorganismo provoca diarrea con un cuadro específico, cuando está presente en gran cantidad.

3.9.2 *Staphylococcus*₍₄₆₎

Proceden de supuraciones o infecciones purulentas de heridas, pero también se encuentran en las mucosas del espacio nasofaríngeo, por lo que se debe evitar toser o estornudar cuando se está trabajando con alimentos, en este caso con la leche.

Una especie en particular *Staphylococcus aureus* microorganismo patógeno importante en nuestra investigación es responsable de enfermedades de la ubre (mastitis). Cuando se encuentra en un producto en grandes cantidades, provoca vómitos y diarrea.

3.9.3 *Salmonella spp.*₍₃₈₎

La *Salmonella* se encuentra normalmente en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente que son fuentes de contaminación de este microorganismo patógeno generalmente causan bacteriemia y producen, respectivamente, fiebre tifoidea y fiebre entérica en seres humanos. Los síntomas de la enfermedad pueden ser agudos, como náuseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza y pueden durar de uno a dos días o prolongarse, dependiendo de los factores inherentes al hospedante, de la dosis ingerida y de las características de la cepa. Los alimentos relacionados con las enfermedades son: carne cruda, pollo, huevos, leche y lácteos.

3.9.4 *Listeria monocytogenes* ⁽³⁸⁾

La contaminación ocurre en el ambiente (agua), plantas y tracto intestinal de hombres, animales y aves. Los síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos y diarrea, pueden preceder las formas más graves de Listeriosis, o ser los únicos síntomas presentados.

Se desconoce el comienzo de las formas graves de Listeriosis, pero puede variar de algunos días a tres semanas. No se sabe exactamente cuándo los síntomas gastrointestinales comienzan, pero se cree que sea probablemente 12 horas después de la infección.

Listeria monocytogenes fue asociada a alimentos como leche cruda, leche supuestamente pasteurizada, quesos (principalmente los tipos poco maduros)

Las medidas de control incluyen cocción adecuada, buenas prácticas de higiene durante el procesamiento de alimentos y prevención de contaminación cruzada.

3.10 Quesos

3.10.1 Clasificación

3.10.2 Los quesos frescos ⁽¹⁸⁾

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa, los quesos se obtienen por la coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lacto suero se separa de la cuajada. El lacto suero contiene la mayor parte del agua y de los componentes solubles de la leche, quedando una pequeña parte aprisionada en la cuajada.

Los quesos según la NOM-243-SSA1-2010 se definen como productos elaborados de la cuajada de la leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de 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: no madurado, madurado o procesado.

Existe una gran variedad de quesos, pero es difícil establecer una división rígida de ellos, por cuanto las características que se pueden usar para agruparlos son múltiples y no siempre son comunes a todas las variedades de algunos de estos para ser colocados racionalmente en los grupos de algunos sistemas de clasificación.

El proceso de elaboración del queso es bastante simple, no obstante involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido, comúnmente ácido láctico.

3.10.3 El queso como vehículo de probióticos ⁽¹⁸⁾

El queso es un producto lácteo fermentado que contiene alta concentración de proteínas y aminoácidos esenciales. Como consecuencia de sus propiedades, como pH casi neutro, elevado contenido de grasa, textura densa y compacta, el queso es uno de los alimentos adecuados para albergar a los probióticos, viables, y preservando su actividad biológica durante su paso a través del sistema digestivo en comparación con otros productos lácteos fermentados tales como leche fermentada y yogurt.

Los factores que influyen en la viabilidad de las bacterias probióticas en el queso hasta el momento del consumo se pueden dividir en factores intrínsecos y extrínsecos tales como el pH, los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno,

el oxígeno disuelto, la maduración y las temperaturas de almacenamiento así como los aditivos tales como el cloruro de sodio, el azúcar, los conservadores anti-microbianos y los compuestos volátiles.

Según la FAO, un producto probiótico por norma debe contener un mínimo de 1.0×10^6 ufc/g a 1.0×10^7 UFC/g y el probiótico debe estar activo en el momento del consumo.

Actualmente diversos alimentos, entre ellos el queso, se elaboran con cultivos iniciadores comerciales, los cuales han sido aislados y seleccionados con base a algunas propiedades deseadas tales como la producción de sabores y aromas, la modificación de textura y la protección contra el deterioro ocasionado por otros microorganismos.

3.11 Microorganismo patógeno

3.11.1 Genero *Staphylococcus*⁽⁴⁾

3.11.2 Características⁽⁴⁾

Los *Staphylococcus* son cocos gram positivos (de 0.5 a 1.5 μm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 ó 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego *staphyle*, racimo de uvas)

Como todos los cocos importantes desde el punto de vista médico, carecen de flagelos, no tienen motilidad y no forman esporas. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos.

En comparación con los *Streptococcus*, producen catalasa. En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies, solo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*.

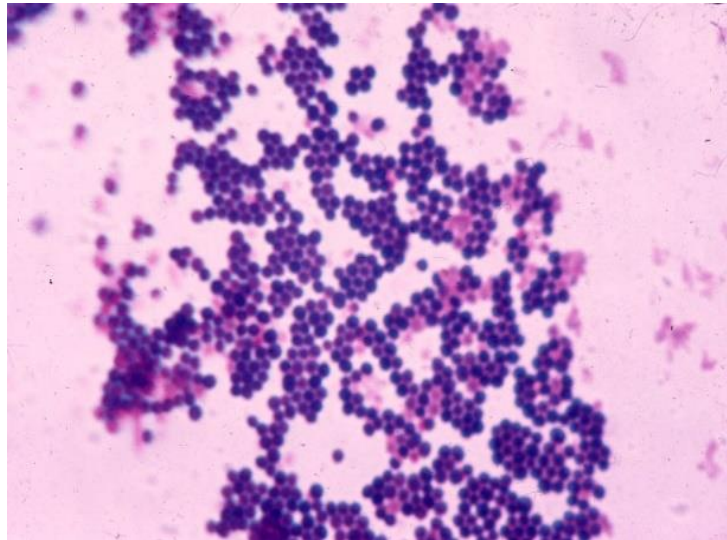


FIGURA N° 3. Morfología de *Staphylococcus aureus*.

3.11.3 Hábitat de *Staphylococcus* ⁽⁴⁾

Staphylococcus están ampliamente difundidos en la naturaleza. Su hábitat natural es la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y las aves. También pueden encontrarse de forma transitoria en el tracto intestinal.

3.11.4 División de *Staphylococcus* ⁽⁴⁾

Staphylococcus, según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos:

- *Staphylococcus* coagulasa positivos (ECP)
- *Staphylococcus* coagulasa negativo (ECN)

Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de *Staphylococcus*, de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son.

Staphylococcus patógenos casi siempre causan hemólisis y coagulación del plasma; producen varias enzimas y toxinas extracelulares.

El tipo más común de envenenamiento alimentario es causado por una enterotoxina termoestable de *Staphylococcus*. Estos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos.

3.11.5 Aislamiento ⁽⁴⁾

Existen varios medios selectivos para *Staphylococcus*, como el agar sal manitol y el medio de Baird-Parker, que se utiliza principalmente para análisis de alimentos. Las colonias aparecen normalmente a las 24 horas de incubación pueden alcanzar los 4 mm de diámetro. Estas colonias son redondas, lisas y brillantes y en agar sangre opacas, lo que las diferencia de las colonias de *Streptococcus* beta-hemolíticos, que son más pequeñas y translúcidas. *Staphylococcus aureus* forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso.

3.11.6 *Staphylococcus aureus* ⁽⁴⁾

Staphylococcus aureus tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases. Fermentan también el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis.

Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15%.

Poseen una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género; ésta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina.

Poseen igualmente una desoxirribonucleasa o DNasa, una nucleasa exocelular que despolimeriza el ADN.

A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termoresistente en las cepas de *Staphylococcus aureus*.

También presentan la proteína A, una proteína de unión inespecífica a anticuerpos que está relacionada con su virulencia.

3.11.7 *Staphylococcus aureus*, el patógeno de los manipuladores. ⁽⁴⁾

Pese a su amplia distribución y a la facilidad con la que llega a los alimentos y extiende una eventual contaminación, sus efectos son agudos y aparatosos.

Pero remiten rápidamente. Los manipuladores de alimentos pueden favorecer su rápida extensión.

Es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales y extremadamente difíciles de erradicar. El frío impide formar la toxina que desencadena la infección bacteriana en humanos. Una vez que el microorganismo llega al alimento, el control es relativamente sencillo, ya que si la temperatura de refrigeración es adecuada y no se rompe la cadena del frío, el microorganismo no será capaz de formar toxina.

3.11.8 Intoxicaciones alimentarias por *Staphylococcus aureus* ⁽⁴⁾

Los humanos son el depósito natural de *Staphylococcus aureus*, esta bacteria se encuentra en la mucosa nasal y oral, además del pelo, heridas y ampollas. La contaminación de alimentos se da por fallas en la higiene personal y manipulación inadecuada de los alimentos. El envenenamiento con alimentos por toxina estafilocócica ha sido una secuela del descuido de las personas al exponer los alimentos a temperaturas que permiten la multiplicación bacteriana.

El alimento resulta ser contaminado por la persona que lo preparó y que es portadora nasal o tiene una lesión estafilocócica. Si el platillo se ha refrigerado de manera inadecuada, *Staphylococcus* que contiene se multiplican y producen la enterotoxina. A causa de la resistencia de esta al calor, la toxicidad persiste incluso aunque el alimento se cueza antes de servirlo e ingerirlo.

Una causa importante de intoxicación estafilocócica es la producción de enterotoxinas cuando se desarrolla *Staphylococcus aureus* en alimentos que contienen carbohidratos y proteínas. La ingestión de 25 µg de enterotoxina B provoca vómito y diarrea.

El envenenamiento alimentario causado por enterotoxina estafilocócica se caracteriza por un breve período de incubación (1 a 8 horas); náuseas severas, vómito y diarrea; y convalecencia rápida. Esto causa postración pero no suele haber fiebre.

La recuperación es rápida, salvo en algunos casos de personas ancianas y en las que tienen otra enfermedad. En casos severos puede ocasionar dolores de cabeza, dolores musculares, alteraciones temporales de la presión sanguínea y arritmia cardíaca.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

4.2 Transversal:

Los parámetros de interés en la investigación se evaluaron en los meses de Septiembre a Noviembre del año 2017.

4.3 Investigación bibliográfica:

La recopilación de información bibliográfica se llevó a cabo en las bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (UES).
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (UES)
- Universidad Doctor José Matías Delgado
- Internet.

4.4 Investigación de campo.

Se adquirió la leche de las cabras que se encuentran en un área cercana al Mercado municipal de la colonia Zacamil del municipio de Mejicanos. Se completó una lista de chequeo luego de la visualización directa de las condiciones en las cuales se comercializa la leche de cabra.

4.5 Obtención de materias primas

La materia prima leche de cabra se identificó, se transportó en hielera a temperatura de refrigeración (4 a 8 °C) en galones plásticos previamente sanitizados para garantizar la calidad de la leche de cabra hasta el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Se utilizó la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* la cepa *Lactobacillus spp.* se aisló de un yogurt comercial que rotulaba *Lactobacillus acidophylus* (Ver anexo N°15, figura N° 23).

Se usó la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para comprobar el efecto probiótico de la mezcla de cepas probióticas.

El cuajo comercial que se utilizó para la elaboración del queso, se adquirió en una farmacia.

4.5.1 Universo.

Los quesos no madurados elaborados de leche de cabra.

4.5.2 Muestras.

El queso no madurado elaborado de leche de cabra.

Se elaboraron dos quesos con mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^5 UFC/g y otro a concentración 1.0×10^7 UFC/g y sus réplicas.

Cada queso se dividió en 8 porciones de 10.0 g cada una, de estas 8 porciones de queso se apartaron 4 porciones, del queso con mezcla de cepas probióticas 1.0×10^5 UFC/g, al que se inoculó el microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentración de 1.0×10^3 UFC/g, que se codificó (L1Q1 y su réplica L1Q2) se almacenaron a temperatura refrigeración (5°C) durante los días 0,5,8 y 15, para determinar la sobrevivencia de la cepa patógena contra la mezcla probiótica.

Las otras 4 porciones de queso restantes solo con mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^5 UFC/g, se codificaron y almacenaron durante los mismos días de análisis, para verificar la sobrevivencia de la mezcla probiótica sin la cepa patógena.

Para el queso con mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^7 UFC/g (que se codificó L2Q1), se tomó el mismo número de porciones y cantidad de gramos de muestra que en el queso con la primera concentración. A este queso con la segunda concentración se le inoculó la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentración de 1.0×10^5 UFC/g, también se obtuvo una réplica (que se codificó L2Q2).

4.6 Experimental.

Este estudio es de tipo experimental ya que se realizó la comprobación del efecto probiótico en el laboratorio de control de calidad microbiológica en CENSALUD.

Donde se llevó a cabo procesos en el laboratorio como la pasteurización de la leche de cabra, a la que se determinaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Para el 1.0 Grupo de Alimento: Leche y productos lácteos.

Se estandarizó la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp* y se estandarizó también la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se elaboraron con leche de cabra pasteurizada dos quesos con mezcla de probióticos a concentraciones distintas y en los que se inoculó el microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los quesos elaborados con mezcla de probióticos e inoculados con el patógeno se realizó recuentos en placa en agar Baird Parker durante los días 0, 5, 8 y 15 para comprobar el efecto probiótico de la mezcla de cepas *Lactobacillus*

rhamnosus y *Lactobacillus spp.* contra la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los quesos elaborados con mezcla de probióticos que no se inoculó con la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizó recuentos en placa en agar MRS durante los días 0, 5, 8 y 15 para verificar la viabilidad de la mezcla de probióticos.

4.7. Parte experimental

4.7.1 Pasteurización de leche de cabra⁽¹⁶⁾ (Ver anexo N°4)

Procedimiento

- Filtrar 4.2 L de leche de cabra a utilizar mediante un colador fino para eliminar cualquier impureza que pueda existir al momento del ordeño.
- Recibir la leche de cabra en una olla limpia y desinfectada de tamaño proporcional al volumen de leche a pasteurizar.
- Calentar la porción de leche de cabra controlando la temperatura hasta llegar a 65°C, mantener esta temperatura de manera constante por 30 minutos.
- Enfriar la leche mediante choque térmico a 4°C, colocando la olla en un baño de agua fría con hielo.
- Dejar reposar por 45 minutos

4.8 Análisis microbiológico a la leche pasteurizada establecido por el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.⁽⁷⁾

4.8.1 Determinación de *Escherichia coli* por método de tubos múltiples (NMP) en leche de cabra⁽²²⁾ (Ver anexo N°5,6 y 7)

- Medir con una pipeta Morh 25 mL de leche de cabra pasteurizada (muestra) a analizar y transferir a un frasco de dilución conteniendo 225 mL de agua peptonada estéril (AP). (Dilución 10^{-1}).
- Homogenizar.
- Pipetear 10 mL de la dilución anterior y añadirlos a un frasco de dilución que contiene 90 mL de agua peptonada estéril (AP); y homogenizar (Dilución 10^{-2}).
- Pipetear 10 mL de la dilución anterior y añadirlos a un frasco de dilución que contiene 90 mL de agua peptonada estéril (AP); y homogenizar (Dilución 10^{-3}).
- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-1} e inocular en una serie de 3 tubos de caldo LMX, previamente rotulados.
- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-2} e inocular en una serie de 3 tubos de caldo LMX, previamente rotulados.
- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-3} e inocular en una serie de 3 tubos de caldo LMX, previamente rotulados.
- Incubar los tubos por 24 a 48 horas a 45.5 °C en baño termostático.

Interpretación:

Observar los tubos con caldo LMX con una lámpara de luz UV los tubos que presentan fluorescencia indican prueba positiva, de estos tubos inocular en Agar EMB para identificar la presencia de *Escherichia coli*, a todos los tubos positivos con caldo LMX se les adicionó el reactivo de Kovac la formación de un color rojo en la superficie el resultado es positivo.

4.8.2 Determinación de *Salmonella spp.* en leche de cabra (Ver anexo N°8)⁽²¹⁾

- Medir con una pipeta Morh 25 mL de leche de cabra pasteurizada (muestra) a analizar y transferir a 225 mL de caldo lactosado.
- Homogenizar.

- Incubar 24 ± 2 horas a 35°C .
- Transferir 0.1 mL de la muestra preparada a 10 mL de medio Rappaport-vasiliadis y 1 mL de mezcla a 10 mL de caldo Tetrionato.
- Incubar en medio Rappaport-vasiliadis por 24 horas a 42°C (en baño de agua con controlador termostático).
- Incubar el caldo tetrionato por 24 horas a 42°C .
- Estriar con asa bacteriológica en Agar bismuto sulfito (BS), Agar *Salmonella Shigella* (SS) tomando de los tubos que contienen caldo Tetrionato y caldo Rappaport-vasiliadis.
- Incubar las placas por 24 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Sembrar en pruebas bioquímicas.

Identificación.

Examinar las placas buscando colonias sospechosas de *Salmonella* en los medios: Bismuto Sulfito: Colonias transparentes con halo gris con centro negro y brillo metálico y Agar *Salmonella Shigella* (SS): colonias incoloras, transparentes, con o sin centro negro debido a la producción de sulfuro de hidrógeno.

4.8.3 Pruebas Bioquímicas para *Salmonella spp* en leche de cabra₍₂₁₎ (Ver anexo N°9)

- Tomar con ayuda de un asa bacteriológica las colonias sospechosas características de *Salmonella spp*, a placas de Petri con agar Tripticasa Soya (TSA) e incubarlas por 24 ± 2 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

De las colonias de *Salmonella spp* que crezcan en placas con agar TSA realizar el siguiente procedimiento:

-Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) (Ver figura N°13)

- Inocular con un asa en punta por picadura el agar TSI hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Leer resultados.

-Agar Citrato (Ver figura N° 14)

- Inocular con un asa en punta por picadura el agar citrato hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Leer resultados.

Un cambio en la coloración del medio que va del verde a azul indica prueba positiva de presencia de *Salmonella spp.*

-Agar Movilidad (Ver figura N°15)

- Inocular con un asa en punta por picadura el agar Movilidad hasta el fondo del tubo.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Leer resultados.

Indica prueba positiva de presencia de *Salmonella spp.* la migración de los microorganismos en la línea de siembra del medio provocando turbidez y formación o no de H_2S .

-Caldo Indol (Ver figura N°16)

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene Caldo Indol y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.

Después de la incubación:

- Agregar a los tubos 5 gotas de éter etílico y 5 gotas de reactivo de Erlich

La formación de un anillo violeta en la superficie del medio indica prueba positiva de presencia de *Salmonella spp.*

-Caldo Rojo de Metilo (Ver figura N°17)

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene Caldo Rojo de Metilo y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.

Después de la incubación:

- Agregar a los tubos 5 gotas de reactivo Rojo de Metilo (0.1%).

La formación de una coloración roja difusa en el medio indica prueba positiva de presencia de *Salmonella spp.*

-Voges Proskauer (Ver figura N°18)

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contenga caldo Voges Proskauer y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Después de la incubación agregar a los tubos 1mL de KOH más 1mL de alfa-naftol (5%).

La formación de una coloración en el medio que va de rosado a rojo indica prueba positiva de presencia de *Salmonella spp.*

TABLA N° 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Salmonella spp* ⁽²¹⁾

Pruebas	Resultado para <i>Salmonella spp.</i>
TSI	Bisel de color rojo y fondo amarillo con H ₂ S
Citrato	Coloración verde o azul
Movilidad	Crecimiento en todo el medio coloración negra

Rojo de metilo	Coloración roja en el medio
Voges Proskauer	Coloración amarilla en el medio
Indol	Sin formación del anillo rosado en la interfase

4.8.4 Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra₍₂₄₎ (Ver anexo N° 10)

- Medir con una pipeta Morh 25.0mL de la leche de cabra pasteurizada a analizar en 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB.
- Homogenizar.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas.
Después de 24 horas de incubación, estriar del cultivo LEB en forma duplicada en placas de agar Oxford (OXA) y en agar Palcam.
- Incubar las placas Oxford y Palcam a temperatura de 37 °C durante 48 horas.
- Después del proceso de incubación anterior de las placas en agar Oxford y agar Palcam refrigerar las placas a 4 °C por otras 48 horas.
- En agar Palcam y Oxford las colonias son negras grisáceas.
- Transferir 5 o más colonias típicas del agar Palcam por duplicado en placas de TSA + EY (Agar Soya Trypticasa + Extracto de Levadura).
- Incubar las placas de TSA + EY a 35 °C por 24-48 horas.
- Las placas de TSA + EY que presenten colonias de color azul-gris son positivas.
- Realizar pruebas bioquímicas: TSI, Voges-Proskauer, Indol, Rojo de Metilo, Citrato, Movilidad.

4.8.5 Pruebas presuntivas:

Test de hemólisis₍₁₇₎ (agar sangre de oveja) (Ver anexo N°11)

Confirmación de *Listeria monocytogenes*

- Pinchar el agar sangre en 4 espacios diferentes
- Incubar a 35°C durante 24 h ± 2 h.
- Indica prueba positiva de *Listeria monocytogenes* la producción de una delgada y clara zona de β – hemólisis

4.8.6 Determinación de *Staphylococcus aureus* en leche de cabra⁽²²⁾⁽²³⁾(Ver anexo N°12)

- Medir con una pipeta Morh 25 mL leche de cabra pasteurizada a analizar e incorporar 225 mL de agua peptonada estéril, dilución 10⁻¹ y homogenizar.
- Inocular 1 mL de la dilución 10⁻¹ distribuido en tres placas conteniendo agar Baird Parker 0.3, 0.3 y 0.4 mL de la muestra. (esparcir con esparcidor de vidrio).
- Dejar reposar 10 minutos para que la muestra sea absorbida por el medio.
- Invertir las placas e incubar a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas.
- Observar el desarrollo de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus*, de aspecto negro, brillante o gris oscuro, con formación de halo alrededor de la colonia.
- Contar utilizando un contador de colonias.

4.8.7 Determinación de pH de leche de cabra pasteurizada⁽¹⁷⁾(Ver anexo N° 14)

- Calibrar el pHmetro, utilizando buffer pH 4 y buffer pH 7.
- Homogenizar la muestra con agitador de vidrio estéril
- Filtrar si hay presencia de partículas extrañas
- Introducir el electrodo en 10 mL de la muestra.
- Anotar la lectura de pH, cuando la temperatura se encuentre en un rango de temperatura de 25 ± 1°C.

4.9 Aislamiento de mezcla de *Lactobacillus spp.* de un yogurt comercial que rotula contener *Lactobacillus acidophylus*₍₁₎ (Ver anexo N° 15)

- Pesar en balanza semianalítica 25 gramos de yogurt natural comercial en una bolsa para Stomacher.
- Agregar 225 mL de agua peptonada estéril.
- Homogenizar en Stomacher por 2 minutos a 260 rpm. Esta es la dilución 10^{-1}
- Transferir 10 mL de la dilución 10^{-1} a un frasco de dilución conteniendo 90 mL de agua peptonada estéril y homogenizar esta es la dilución 10^{-2}
- Realizar diluciones sucesivas para obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}
- Tomar una alícuota de 0.10mL de cada dilución desde 10^{-4} a 10^{-7} y transferir a una placa conteniendo 20mL de agar MRS, esparcir con esparcidor de vidrio, esperar 10 minutos e invertir placa. (realizar por duplicado)
- Incubar las placas a 37°C por 48 horas en atmósfera anaerobia 5% CO₂.
- Tomar de las colonias aisladas y transferir a tubos con caldo MRS
- Incubar los tubos a 37°C por 72 horas en atmósfera anaerobia 5% CO₂.
- Sembrar en agar MRS a partir de cada tubo, e incubar nuevamente a 37°C por 48 horas en atmósfera anaerobia 5% CO₂.
- Realizar tinción Gram observar morfología microscópica y observar morfología macroscópica en agar MRS.

Lactobacillus acidophylus son: blancas, convexas, forma circular, puntiformes.

4.9.1 Identificación de mezcla de cepas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp*₍₂₁₎ (Ver anexo N°16)

Las cepas probióticas fueron reanimadas, caracterizadas y estandarizadas para inocularse en la leche de cabra.

- Iniciar el proceso de reanimación de la bacteria a partir del criovial.
- Sacar los crioviales de la refrigeradora y llevar a temperatura ambiente al menos media hora para ambientar
- Tomar unas asadas por microorganismo y sembrar en un tubo de ensayo que contenga 10mL de caldo MRS y tapar.
- Incubar a 37 °C por 48 horas.
- Estriar del cultivo incubado a agar MRS y agar TSA
- Incubar a 37 °C por 48 horas en atmosfera anaeróbica al 5% de CO₂.
- Realizar la suspensión madre a partir de las colonias que crezcan en agar TSA.
- Efectuar tinción Gram de las colonias en agar MRS
- Observar la morfología de las colonias en el microscopio con el objetivo de inmersión (100X), el género *Lactobacillus* puede observarse como bacilos cortos o coco-bacilos, se presentan formando cadenas, Son Gram positivos.

Lactobacillus rhamnosus, es un bacilo largo Gram (+) y *Lactobacillus spp.* es un bacilo corto Gram (+).

4.9.2 Tinción de Gram para identificación de bacterias *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* (Ver anexo N°17)₍₂₁₎

Realizar un frotis de la manera siguiente:

- Tomar una colonia aislada de la placa con agar MRS inoculada con *Lactobacillus rhamnosus*.
- Suspender la colonia de *Lactobacillus rhamnosus*, en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en mechero para fijar la bacteria probiotica(frotis)

- Agregar cristal violeta en el frotis, esperar 1 minuto y luego lavar con agua destilada.
- Adicionar lugol en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada
- Agregar alcohol - acetona en el frotis, esperar 10 segundos y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Adicionar safranina en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X). *Lactobacillus rhamnosus*, es un bacilo largo Gram (+)
- Realizar el mismo procedimiento para *Lactobacillus spp*, al observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X), *Lactobacillus spp*, es un bacilo corto Gram (+)

4.9.3 Identificación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(Ver anexo N° 19)₍₂₁₎

La cepa patógena fue reanimada, caracterizada y estandarizada para inocularse en el queso de leche de cabra.

- Iniciar el proceso de reanimación de *Staphylococcus aureus* a partir de un criovial.
- Sacar el criovial de la refrigeradora y llevar a temperatura ambiente por al menos media hora para ambientar.
- Tomar unas asadas y sembrar en un tubo de ensayo con que contenga 10 mL de caldo infusión cerebro-corazón BHI y tapar
- Incubar durante 24 horas a 37°C.
- Estriar del cultivo en BHI a dos placas con agar TSA
- Incubar durante 24 horas a 37°C.
- Tomar colonias aisladas de *Staphylococcus aureus* en agar TSA y en agar Baird Parker
- Incubar a 37 °C por 24 a 48 horas

- Realizar la suspensión madre a partir de las colonias que crezcan en agar TSA
- Observar la morfología de las colonias en agar Baird Parker
- Efectuar tinción Gram de las colonias en agar TSA

4.9.4 Tinción de Gram(Ver anexo N° 20)₍₂₁₎

Realizar un frotis de la manera siguiente:

- Tomar una colonia aislada de una placa con agar TSA inoculada con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Suspender la colonia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en un portaobjetos que contiene una gota de solución salina y flamear en mechero para fijar la bacteria.
- Agregar cristal violeta en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Adicionar lugol en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar alcohol – acetona, esperar 10 segundos y lavar con agua destilada inmediatamente.
- Agregar safranina en el frotis, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, es un coco Gram (+)

4.9.5 Prueba de la catalasa (Ver anexo N°21)₍₁₇₎

- Colocar una gota de solución de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjeto.
- Picar con un asa bacteriológica algunas de las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* de las placas que se utilizan para el recuento en placa.
- Colocar las colonias sospechosas sobre una gota de peróxido.

- La producción de burbujas de gas (oxígeno) indica un resultado positivo.

4.9.6 Prueba de la coagulasa para identificación de *Staphylococcus aureus*.

(Ver anexo N°21, Figura N° 31) ⁽¹⁷⁾

- Tomar 4 a 5 colonias sospechosas del recuento en placa en agar Baird Parker
- Transferir a un tubo que contenga 0.2-0.3 mL de caldo infusión cerebro-corazón BHI para la prueba de la coagulasa.
- Incubar el tubo a 35°C de 18-24 h.

Después del tiempo de incubación:

- Agregar al tubo 0.5 mL de plasma coagulasa reconstituida con EDTA y mezclar completamente.
- Incubar nuevamente a 35°C por 24 horas para verificar la formación de un coagulo que permanezca firme y completo cuando el tubo se invierta, lo que confirma la presencia de *Staphylococcus aureus*.

4.9.7 Estandarización de las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* (Ver anexo N°18) ⁽²⁸⁾

- Estandarizar las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp* por el método espectrofotométrico y medir la turbidez de la suspensión bacteriana por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm.
- Realizar diluciones con solución salina estéril y medir el porcentaje de tramitancia en el espectrofotómetro, llevar como blanco solución salina estéril.
- De las placas con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* tomar colonias aisladas.
- Transferir a 10 mL de caldo MRS

- Tomar con micropipeteador 1 mL de suspensión bacteriana
- Transferir a 10 mL de solución salina estéril (suspensión madre a concentración 1×10^{10} UFC/mL).
- Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.
- Agregar suspensión de *Lactobacillus* o solución salina según sea el caso hasta obtener transmitancias de entre $T\% 25 \pm 2$
- Hacer diluciones con solución salina estéril.
- Tomar 1 mL del tubo con probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y de *Lactobacillus spp.* y transferir a un tubo con 9 mL de solución salina estéril (10^{-1}).
- Tomar 0.1 mL del tubo con probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y de *Lactobacillus spp.* y transferir a un tubo con 9.9 mL de solución salina estéril (10^{-2}).
- Realizar diluciones para obtener dilución (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
- Tomar de las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} a utilizar y sembrar por esparcido en dos placas conteniendo agar MRS por cada concentración.
- Incubar a 37 °C por 48 horas en atmosfera anaeróbica al 5% de CO₂.
- Realizar recuento en placa de cada dilución.

4.9.8 Estandarización de la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Ver anexo N° 22)₍₂₈₎

- Estandarizar a la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* por el método espectrofotométrico y medir la turbidez de la suspensión bacteriana por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm.
- Realizar diluciones con solución salina estéril y medir el porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro, llevar como blanco solución salina estéril.
- De la placa con *Staphylococcus aureus* tomar colonias aisladas.
- Transferir a 10 mL de caldo BHI

- Tomar con micropipeteador 1 mL de suspensión bacteriana
- Transferir a 10 mL de solución salina estéril (suspensión madre a concentración 1×10^{10} UFC/mL).
- Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.
- Agregar suspensión de *Staphylococcus aureus* o solución salina según sea el caso hasta obtener transmitancias de entre T% 7 - 8
- Hacer diluciones con solución salina estéril.
- Tomar 1 mL del tubo con *Staphylococcus aureus* y transferir a un tubo con 9 mL de solución salina estéril (10^{-1}).
- Realizar diluciones sucesivas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).
- Tomar de los tubos con cada dilución 10^{-3} y 10^{-5} a utilizar y sembrar en placas con agar Baird Parker por esparcimiento en placa e incubar a 38°C por 24 horas.
- Realizar recuento en placa.

4.10 Inoculación de la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.*

Se inoculó directamente en la leche de cabra pasteurizada la mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* estandarizada a las concentraciones 1×10^5 UFC/g y 1×10^7 UFC/g.

4.10.1 Proceso de elaboración de queso no madurado a partir de leche de cabra pasteurizada (Ver anexo N°23) ^{(16) (46)}

- Utilizar un volumen de leche de cabra pasteurizada de 3.7 L para dos quesos.
- Agregar a la leche 25.2 gramos de cloruro de calcio.
- Disolver $\frac{1}{4}$ de pastilla de cuajo en $\frac{1}{2}$ taza con agua destilada, a una temperatura de 36°C . La leche se cortará en aproximadamente 15 minutos.
- Dejar que la leche repose por 45 minutos. No mover el recipiente en el que se está produciendo la coagulación ni mezclar.

- Cortar la cuajada con un cuchillo o paleta limpia en fragmentos iguales.
- Mover suavemente la cuajada con una paleta durante cinco minutos.
- Calentar la cuajada a 40°C por cinco minutos.
- Dejar en reposo la cuajada durante cinco minutos.
- Separar la cuajada del suero con ayuda de una manta y colocar la cuajada en bandeja.
- Agregar 3 cucharadas de sal común.
- Amasar la cuajada y colocarla en un molde.

4.10.2 Inoculación de *Staphylococcus aureus* 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^5 UFC/g y su respectiva réplica₍₂₈₎(Ver anexo N°24)

- Pesar 8 porciones de 10.0g de queso no madurado cada una con la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^5 UFC/g en una bolsa con cierre fácil.
- Tomar 4 porciones sin inocular rotular y almacenar para cada día de análisis.
- Tomar las otras 4 porciones y realizar el siguiente proceso:
- Inocular 1.0 mL de suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* a concentración 1×10^3 UFC/g en cada bolsa con la porción de 10g de queso no madurado.
- Rotular cada bolsa con la porción de queso pesada con los siguientes datos: concentración de probióticos, concentración de *Staphylococcus aureus*, código de muestra, el tiempo correspondiente de análisis a los días 0, 5, 8 y 15.

Almacenar las porciones a temperatura de refrigeración (5°C)

4.10.3 Inoculación de *Staphylococcus aureus* 1×10^5 UFC/g en queso no madurado con la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^7 UFC/g y su respectiva réplica (Ver anexo N°24)⁽²⁸⁾

- Pesar 8 porciones de 10.0g de queso no madurado cada una con la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^7 UFC/g en una bolsa con cierre fácil.
- Tomar 4 porciones sin inocular rotular y almacenar para cada día de análisis.
- Tomar las otras 4 porciones y realizar el siguiente proceso:
- Inocular 1.0 mL de suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* a concentración 1×10^5 UFC/g en cada bolsa con la porción de 10g de queso no madurado.
- Rotular cada bolsa con la porción de queso pesada con los siguientes datos: concentración de probióticos, concentración de *Staphylococcus aureus*, código de muestra, el tiempo correspondiente de análisis a los días 0, 5, 8 y 15.

Almacenar las porciones a temperatura de refrigeración (5°C)

4.10.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* en queso no madurado. (Ver anexo N° 25)⁽²⁸⁾

- Tomar una porción 10.0 g de queso no madurado previamente pesada e inoculada con la cepa patógena de acuerdo al día de análisis.
- Colocar en una bolsa para Stomacher.
- Agregar 90 mL de agua peptonada estéril (previamente inoculada con la concentración del microorganismo patógeno)
- Homogeneizar en Stomacher a 260 rpm por 2 minutos
- Transferir la muestra homogenizada a un erlenmeyer.

- Inocular 1 mL distribuido en tres placas conteniendo agar Baird Parker 0.3, 0.3 y 0.4 mL de la muestra. (esparciendo con esparcidor de vidrio)
- Dejar reposar 10 minutos para que la muestra sea absorbida por el medio.
- Invertir las placas e incubar a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas.
- Observar el desarrollo de colonias características de *Staphylococcus aureus*, de aspecto negro, brillante o gris oscuro, con formación de halo alrededor de la colonia.
- Realizar recuento los días 0, 5, 8 y 15.

4.10.5 Recuento de mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y mezcla de *Lactobacillus spp.* en queso no madurado(Ver anexo N° 26)⁽²¹⁾

- Tomar una porción 10.0 g de queso no madurado solo con mezcla de probióticos previamente pesado y rotulada de acuerdo al día de análisis.
 - Colocar en una bolsa para Stomacher.
 - Agregar 90 mL de caldo MRS en la bolsa para Stomacher
 - Homogenizar en Stomacher a 260 rpm por 2 minutos.
 - Transferir la muestra homogenizada a un Erlenmeyer. (10^{-1} UFC/g)
 - Tomar 10 mL de la dilución anterior y transferir a un Erlenmeyer que contenga 90 mL de caldo MRS. (10^{-2} UFC/g) y homogenizar.
 - Realizar diluciones sucesivas con caldo MRS (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
 - Tomar de las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} a utilizar
 - Sembrar por esparcimiento en placas con agar MRS
 - Incubar por 48 - 72 horas a 38 °C en jarra de anaerobiosis CO₂ al 5%
- Examinar las placas e investigar la presencia de colonias típicas de *Lactobacillus rhamnosus*: Colonias circulares, convexas color blanco y mezcla de *Lactobacillus spp.* Colonias irregulares aplanadas color blanco. Realizar el recuento los días 0, 5, 8 y 15.

4.10.6 Determinación del porcentaje de sobrevivencia de bacterias en estudio⁽²⁰⁾

Se determinó el porcentaje de sobrevivencia utilizando la siguiente formula:

$$\% = \frac{\text{Ln } N_f \text{ (UFC/g)}}{\text{Ln } N_i \text{ (UFC/g)}} \times 100$$

Dónde:

Ln= Logaritmo natural

N_i = Recuento inicial de colonias

N_f = Recuento final de colonias

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Comprobación de la calidad microbiológica de la leche de cabra pasteurizada según lo establecido en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.⁽⁶⁾

TABLA N° 5. RESULTADO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE PASTEURIZADA. (Ver anexo N°13)

Parámetro	Resultado obtenido	Límite	
		*m	**M
<i>Escherichia coli</i>	<3 NMP/mL	<3 NMP/mL	---
<i>Salmonella ssp/25g</i>	Ausencia	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>	Ausencia	Ausencia	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10 UFC/mL	10 UFC/mL	10 ² UFC/mL

*m= valor mínimo, **M= valor máximo.

En la tabla N°5 se muestran los resultados obtenidos del análisis microbiológico realizado a la leche de cabra luego del proceso de pasteurización, observándose el cumplimiento de cada uno de los parámetros establecidos en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos cumpliendo para cada microorganismo patógeno, indicando que el proceso de pasteurización se realizó de manera adecuada. Por lo que la leche de cabra no representa un riesgo a la salud humana, lo cual garantizó que no hubo interferencias por parte de otras bacterias en este estudio.

Además se determinó el pH de la leche de cabra pasteurizada, obteniéndose el valor de 6.2 a una temperatura de 26.3° C, que se encuentra dentro del rango óptimo de pH 6.5 y 4.5 de desarrollo de las bacterias del género *Lactobacillus*⁽⁴⁾⁽²⁰⁾

5.2. Resultados de la estandarización de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a

concentraciones 1.0×10^5 UFC/g y 1.0×10^7 UFC/g y la cepa patógena *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 1.0×10^3 UFC/g y 1.0×10^5 UFC/g incorporados en el proceso de elaboración del queso.

La mezcla de *Lactobacillus spp.* se aisló previamente de un yogurt que rotulaba *Lactobacillus acidophylus*, y se utilizó agar MRS y caldo MRS. Se llevó a cabo un proceso en el cual la concentración de estas bacterias ácido lácticas aumentó hasta la concentración necesaria.

Luego se estandariza, *Lactobacillus acidophylus* que podría formar parte de la mezcla de *Lactobacillus spp.*

En conjunto con otras bacterias ácido lácticas utilizadas como iniciadoras en la elaboración del yogurt, de esta mezcla a partir de las colonias obtenidas se realizó tinción Gram observándose bacilos largos Gram positivos, para *Lactobacillus rhamnosus*, se observaron bacilos cortos Gram positivos, morfología característica del genero *Lactobacillus* al sembrar en agar MRS, se obtuvieron colonias circulares, convexas color blanco para *Lactobacillus rhamnosus* y para mezcla de *Lactobacillus spp.* se obtuvo colonias pequeñas, convexas, opacas, sin pigmentos y puntiformes.

Posteriormente se tomaron colonias de la placa de mezcla de *Lactobacillus spp.* y de la placa con *Lactobacillus rhamnosus* previamente caracterizada, para formar una suspensión madre, de estas dos cepas a concentración 1.0×10^{10} UFC/g y se estandarizó una solución bacteriana a concentración 1.0×10^8 UFC/g a una longitud de onda de 580 nm en un Espectrofotómetro Ultravioleta visible y se realizaron posteriores diluciones para obtener las concentraciones 1.0×10^5 UFC/mL y 1.0×10^7 UFC/mL, cada una de estas se inoculó por esparcimiento en placas en agar MRS.

Estas placas se incubaron a la temperatura 38°C por 48 - 72 horas en condiciones de anaerobiosis, para realizar los recuentos en placa verificando las concentraciones ver tabla N°6.

TABLA N°6. RECUENTO EN PLACA DE MEZCLA DE CEPAS PROBIÓTICAS
Lactobacillus rhamnosus Y *Lactobacillus spp.*

Bacteria	Recuentos en placa (UFC/mL)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus spp.</i>	2.9 x10 ⁸
	7.4 x10 ⁷
	6.3 x10 ⁵

5.2.1 Estandarización de la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Ver anexo N°22 Figura N° 32 y 33)

Se realizó previamente la reanimación de la bacteria a partir de criovial, después se procedió a la identificación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tinción Gram se observó bacterias Gram (+) cocos en racimos y se sembró en agar Baird Parker se incubó por 24 horas, crecieron colonias negras con halo claro características de esta bacteria

Luego se hicieron las pruebas de identificación, prueba de coagulasa donde se obtuvo un coágulo firme al invertir el tubo lo que es prueba positiva y se obtuvo

la prueba de la catalasa obteniéndose el burbujeo que es prueba positiva para esta bacteria. Ver tabla N°7.

TABLA N° 7. RESULTADO DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Prueba de identificación	Resultado positivo	Resultado obtenido
Prueba de coagulasa	Coagulo firme que persiste al invertir el tubo.	Positivo (+)
Prueba de catalasa	Descomposición de H ₂ O ₂ peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua.	Positivo (+)

El valor de tramitancia del que se tomó fue de 7.3% para la concentración 1×10^8 UFC/mL, luego se realizó diluciones y se tomó el porcentaje de tramitancia, T% 94.7 para la concentración de 1.0×10^3 UFC/g y T% 96.2 para la concentración 4.30×10^5 UFC/g valores obtenidos en los recuentos, estas dos concentraciones se utilizaron para inocular el queso que se elaboró previamente a diferente concentración de probióticos.

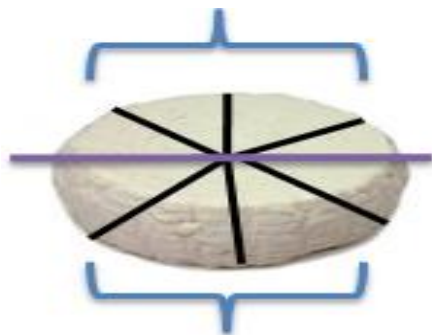
TABLA N°8. RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resultados de la estandarización de <i>Staphylococcus aureus</i> .	
%T (Tramitancia)	Recuentos en placa (UFC/mL)
7.3%	1.40×10^8
96.2%	4.30×10^5
94.7%	1.70×10^3

5.3. Elaboración de queso no madurado a partir de leche de cabra pasteurizada con inóculo de una mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp* y de la cepa patógena *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones (Ver anexo N°23, Figura 34 y 35)

Se elaboró un queso de manera artesanal a partir leche de cabra pasteurizada con una mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp*. a concentración 1.0×10^5 UFC/g y se realizó su réplica, se dividió en 8 porciones de 10 g, a 4 de estas porciones se inoculó la cepa patógena *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, se seleccionaron las otras 4 porciones de 10 g solo con la mezcla de probióticos.

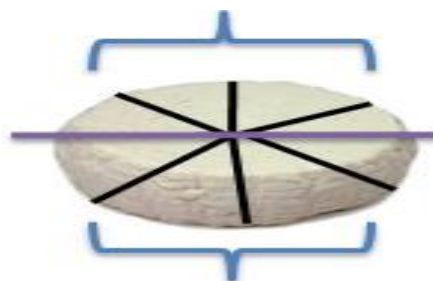
4 porciones para conteo sin bacteria patógena.



(a)

4 porciones con inóculo de *Staphylococcus aureus* 1.0×10^3 UFC/g.

4 porciones para conteo sin bacteria patógena.



(b)

4 porciones con inóculo de *Staphylococcus aureus* 1.0×10^5 UFC/g.

FIGURA N° 4. Quesos no madurados con mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp*. (a) concentración 1.0×10^5 UFC/g y (b) concentración 1.0×10^7 UFC/g.

Se elaboró otro queso de manera artesanal de leche de cabra pasteurizada con mezcla de cepas probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^7 UFC/g y se realizó su réplica. Este se inoculó con el microorganismo patógeno *Staphylococcus aureus* a concentración de 1.0×10^5 UFC/g. Los quesos elaborados a diferentes concentraciones compartieron las características como color blanco, textura y aroma característico. Características organolépticas que se mantuvieron durante el tiempo de estudio.

5.4 Determinación de la sobrevivencia de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* en queso no madurado elaborado de leche de cabra y del patógeno *Staphylococcus aureus* a temperatura de refrigeración a través de recuentos en placa a los 0, 5, 8 y 15 días.(Ver anexo N° 25 y 26)

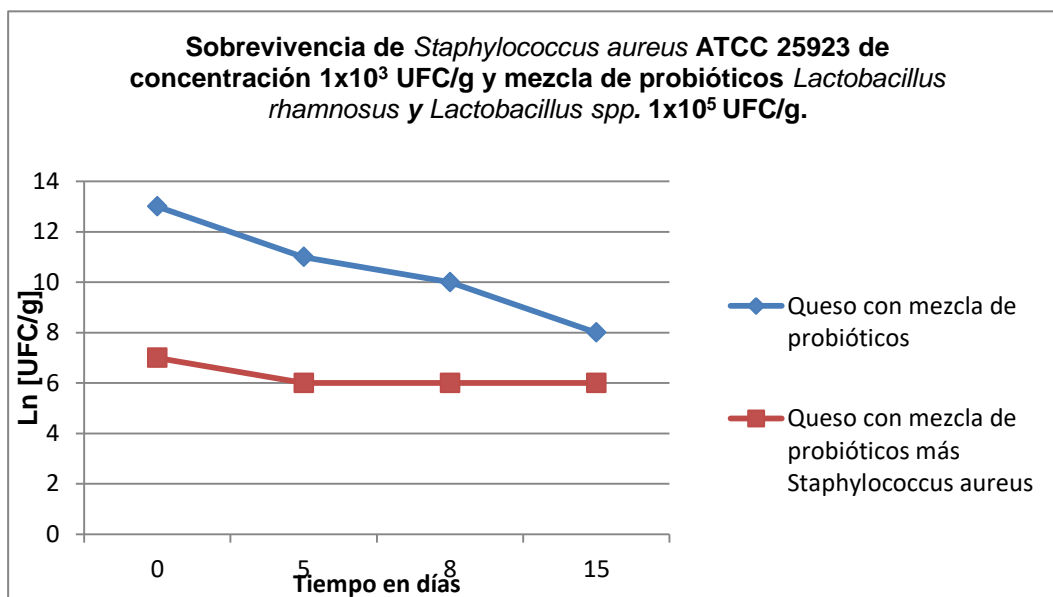


FIGURA N°5. Sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de concentración 1.0×10^3 UFC/g y mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1.0×10^5 UFC/g.

En la figura N°5 se representa de color rojo la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* de concentración 1.0×10^3 UFC/g y mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^5 UFC/g, estos son los resultados de los recuentos en placa del patógeno y de la mezcla de probióticos a los cuales se determinó el promedio de la concentración de microorganismo presente en cada muestra de queso en los días 0,5,8 y 15. (Ver anexos N° 27 y 28), al promedio obtenido de cada concentración, se calculó el logaritmo natural, el resultado se observa en la tabla N° 9.

TABLA N°9. SOBREVIVENCIA DE LA CEPA PATÓGENA Y MEZCLA DE CEPAS PROBIÓTICAS PROMEDIO DE LOGARITMO NATURAL DE LA CONCENTRACIÓN DE RECuentOS EN PLACA EN QUESO NO MADURADO.

Día / Ln [UFC/g]	0	5	8	15
Queso con mezcla de probióticos	13	11	10	8
Queso con mezcla de probióticos más <i>Staphylococcus aureus</i>	7	6	6	6

Para comprobar el efecto de la mezcla de cepas probióticas 1.0×10^5 UFC/g contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de concentración 1.0×10^3 UFC/g, se observó el comportamiento de la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* desde el día cero al día 5 redujo su concentración en un logaritmo, del día 5 a los días 8 y 15 esta concentración se mantuvo constante obteniéndose al día 15 el porcentaje de sobrevivencia de 86%.

La mezcla de probióticos a concentración 1.0×10^5 UFC/g, logró disminuir la concentración 1.0×10^3 UFC/g de la cepa patógena en un logaritmo hasta el día 5 y mantuvo constante esta concentración hasta el día 15. Esto podría deberse a que las bacterias del género *Lactobacillus* producen sustancias llamadas bacteriocinas que tienen la capacidad de inhibir algunas bacterias patógenas además producen sustancias como, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, péptidos antifúngicos entre otros, que realizan la misma función, tanto *Staphylococcus aureus* como las cepas probióticas crecen en queso y lo utilizan como sustrato y debido a que existe una competencia entre ambos por la obtención de nutrientes la mezcla de probióticos solo disminuyó en 1 logaritmo la concentración de *Staphylococcus aureus* y mantuvo constante esta concentración hasta el día 15. La concentración ensayada es la concentración mínima permitida de *Staphylococcus aureus* 1.0×10^3 UFC/g en quesos según lo establecido en el RTCA 67.04.50:08. Reglamento Técnico Centroamericano alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos, la concentración de la mezcla de probióticos logra mantenerla hasta el día 15.

La sobrevivencia de la mezcla de las cepas de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1.0×10^5 UFC/g en queso sin presencia de patógeno se representa en la figura N° 5 de color azul, el comportamiento de la mezcla a partir del día cero a los días 5, 8 y 15, redujo su concentración en 5 logaritmos y el porcentaje de sobrevivencia fue de 62%, determinado a través de los recuentos en placa hasta el día 15, la mezcla de próbioticos logró mantenerse viable en el sustrato permitiendo que las bacterias ácido lácticas se desarrollaran durante el tiempo de análisis.

Otros estudios donde se desarrollaron productos a base de leche fermentada y que utilizan probióticos obtenidos del yogurt, quesos y otros tipos de *Lactobacillus* entre estos *Lactobacillus acidophylus*, además de los cultivos iniciadores lograron la sobrevivencia hasta el día 21, manteniendo

características organolépticas aceptables de los quesos, con buena vida de anaquel pero más allá del día 21 estos productos bajan la calidad. ⁽¹⁴⁾

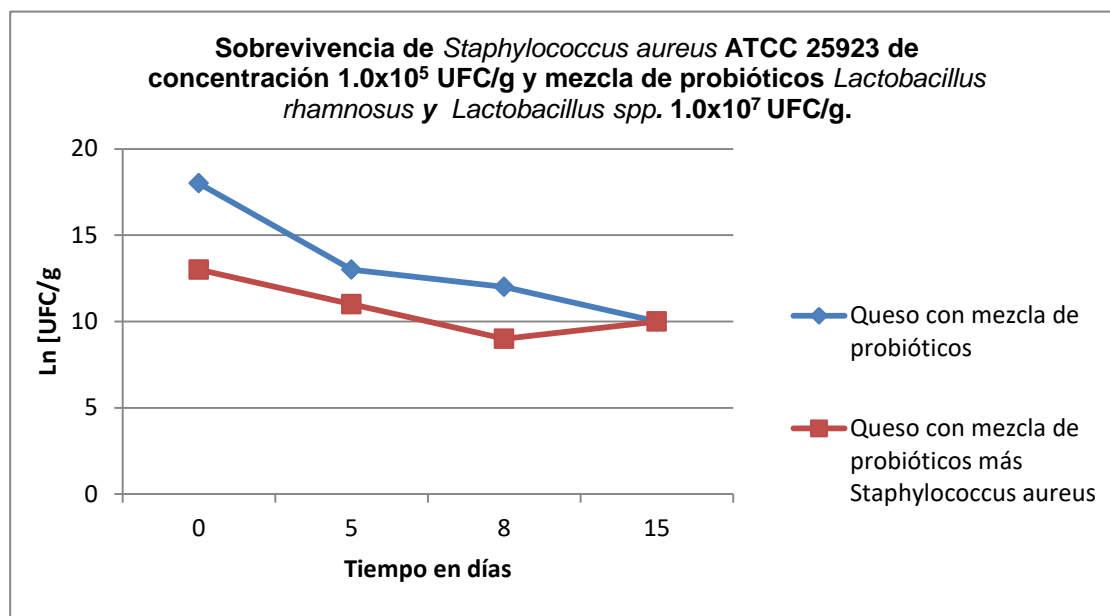


FIGURA N°6. Sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de concentración 1.0×10^5 UFC/g y mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1.0×10^7 UFC/g

En la figura N°6 de color rojo se representa la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de concentración 1.0×10^5 UFC/g contra la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* de concentración 1.0×10^7 UFC/g, del queso inoculado con patógeno se obtuvo los resultados de los recuentos en placa, a estos recuentos se determinó el promedio de la concentración de microorganismo presente en cada muestra según día de análisis (Ver anexos N° 29 y 30), al promedio obtenido de cada concentración se calculó el logaritmo natural, el cual se expresa en la tabla N°10.

TABLA N°10. SOBREVIVENCIA DE LA CEPA PATÓGENA Y MEZCLA DE CEPAS PROBIÓTICAS PROMEDIO DE LOGARITMO NATURAL DE LA CONCENTRACIÓN DE RECuentOS EN PLACA EN QUESO NO MADURADO.

Día / Ln [UFC/g]	0	5	8	15
Queso con mezcla de probióticos	18	13	12	10
Queso con mezcla de probióticos más <i>Staphylococcus aureus</i>	13	11	9	10

Para comprobar el efecto de la mezcla de cepas probióticas 1.0×10^7 UFC/g contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de concentración 1.0×10^5 UFC/g se estudió el comportamiento de la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* a partir del día cero a los días 5 y 8 su concentración se redujo en 4 logaritmos y para el día 15 aumentó su concentración en un logaritmo, en el día 15 el porcentaje de sobrevivencia fue de 77%.

Debido a la producción de bacteriocinas y de otras sustancias inhibitorias por parte de la mezcla de probióticos a concentración 1.0×10^7 UFC/g, logró disminuir la concentración 1.0×10^5 UFC/g de la cepa patógena en 4 logaritmos hasta el día 8 y para el día 15 la mezcla de probiótico ya no logro el efecto inhibitorio de la cepa patógena que aumento un logaritmo, mientras que la mezcla de probióticos para el día 15 continuó reduciendo su concentración.

En la figura N°6 se representa la sobrevivencia de la mezcla de las cepas de probióticos de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* de concentración 1.0×10^7 UFC/g sin presencia de patógeno, a partir del día cero a los días 5, 8 y 15 la concentración inicial se redujo en 8 logaritmos y para el día 15 el porcentaje de sobrevivencia fue de 56%, con lo que se demostró que la mezcla de probióticos es viable durante los días de análisis.

El comportamiento de la mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1.0×10^5 UFC/g a partir del día cero a los días 5, 8 y 15, en queso sin presencia de patógeno, redujo su concentración en 5 logaritmos y la mezcla de concentración 1.0×10^7 UFC/g se redujo en 8 logaritmos para el día 15, esto debido a que si la concentración de bacteria inoculada es menor en el sustrato hay mayor cantidad de nutrientes y si la concentración inoculada es mucho mayor para la misma cantidad de sustrato, hay menor cantidad de nutrientes para estas bacterias. También teniendo en cuenta que el sustrato contiene proteínas que sufren proteólisis, grasas que sufren lipólisis y otras sustancias que se van degradando en el periodo de vida de anaquel del sustrato. ⁽¹⁴⁾

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El método de pasteurización empleado en el desarrollo de esta investigación, contribuyó a asegurar la calidad de la leche de cabra para el cumplimiento de los parámetros establecidos por el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Evitando así interferencias de microorganismos patógenos para el análisis de la misma.
2. Las características organolépticas como color, olor y textura, se mantuvieron hasta el día 15 en el queso con mezcla de probióticos más patógeno y también en el queso con mezcla de probióticos sin presencia de patógeno.
3. El porcentaje de sobrevivencia de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1.0×10^5 UFC/g para el día 15 fue del 62% y para la concentración 1.0×10^7 UFC/g para el día 15 fue del 56%, la sobrevivencia fue mayor a menor concentración de bacterias probióticas en el sustrato, la sobrevivencia es menor a una concentración mayor de bacterias probióticas en la misma cantidad de sustrato.
4. El efecto de la mezcla de cepas probióticas de las concentraciones estudiadas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1.0×10^5 UFC/g fue efectiva contra *Staphylococcus aureus* 1.0×10^3 UFC/g ya que redujo su efecto en un logaritmo y mantuvo el efecto inhibitorio hasta el día 15 debido a la presencia de bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno entre otras sustancias.

5. Las cepas probióticas a concentración 1.0×10^7 UFC/g contra *Staphylococcus aureus* 1.0×10^5 UFC/g logró reducir al patógeno en 4 logaritmos hasta el día 8, al día 15 el efecto inhibitorio disminuyó pues la cepa patógena aumentó un logaritmo.
6. El efecto inhibitorio de la mezcla de probióticos 1.0×10^5 UFC/g se mantiene siempre y cuando la concentración de patógeno presente en el queso no madurado sea igual o menor a 1.0×10^3 UFC/g en condiciones de refrigeración y que permite cumplir con los parámetros establecidos en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Manteniendo las características organolépticas del alimento hasta el día 15.
7. Los quesos no madurados elaborados en esta investigación se pueden clasificar como alimentos funcionales debido a que las mezclas probióticas, se adicionaron a la leche después del proceso de pasteurización y luego se siguió el proceso artesanal de elaboración, verificando que estos se mantuvieron viables durante el tiempo de estudio y que produjeron bacteriocinas ejerciendo en diferente medida el efecto inhibitorio contra el patógeno.

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Mantener buenas prácticas de higiene al momento de elaborar un queso no madurado contribuyendo así a la vida de anaquel y a la seguridad alimentaria de los consumidores.
2. Consumir quesos no madurados de preferencia pasteurizados y que cumplan con la cadena de frío manteniéndose en refrigeración (5°C) desde su elaboración, comercialización y consumo.
3. Al elaborar quesos que se clasifiquen como alimentos funcionales se debe garantizar el uso de cepas aprobadas por las entidades regulatorias vigentes y también la viabilidad en el producto final para que al ser consumido se produzcan bacteriocinas en el intestino humano y estas ayuden a la prevención de diarreas.
4. Al realizar inclusión de mezcla de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* en alimentos lácteos debe asegurarse de mantener la viabilidad de los mismos durante el tiempo de estudio y si son consumidos estos deben mantenerse vivos al llegar al intestino para producir el efecto inhibitorio contra microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*.
5. La mezcla de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* se debe agregar en alimentos lácteos fermentados como queso luego de pasteurizar el producto, pues si lo hacemos antes el proceso que implica calor no permitirá la sobrevivencia de estos y no se obtendrá el efecto deseado.

BIBLIOGRAFIA

1. Arriola, M; Magaña, J. (2014). Análisis microbiológico y recuento de bacterias ácido lácticas en yogures comercializados en supermercados del distrito dos del área metropolitana de San Salvador. El Salvador.
2. Barahona, E. Zuleta, R. (2014) Efecto antagonico de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* sobre microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio colerae*. El Salvador.
3. Benítez, E. Centi, K (2012) Determinación de la Resistencia del *Staphylococcus aureus* Aislado de Quesos no Madurados Comercializados en el Mercado Central de San Salvador, a los Antibióticos de Prueba Seleccionados. El Salvador.
4. Bermúdez, L; Pineda, B. (2015). Obtención de un yogurt natural utilizando una mezcla de probióticos ABY-3, leche de cabra como sustrato y control de la sobrevivencia de la cepa *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. El Salvador.
5. Cáceres, P. Gotteland, M. (2010) alimentos probióticos en Chile. Disponible: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182010000100010
6. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06 [Online]. Disponible en <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/LACTEOS/SO67.01.04.06%20QUESOS%20NO%20MADUROS.pdf>.

7. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT. RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. [Online]. Disponible en: <http://www.osartec.gob.sv/index.php/servicios/centro-de-informacion/inventario-rtca>
8. Delgado, R. (2016) Probióticos y respuesta inmune, Cuba. Disponible: <http://www.revactamedicacentro.sld.cu/index.php/amc/issue/view/38>.
9. Escobar, A. Suárez, J. (2016). Evaluación de la viabilidad del queso fresco obtenido a partir de leche entera de cabra empleando un microorganismo probiótico como el *Lactobacillus acidophylus*. Tesis de Ingeniería Química. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
10. Esteban Boza M., Ileana Morales H., Marjorie Henderson G. (2010). Desarrollo de un Queso Maduro con Adición del Cultivo Probiótico *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* LC-01, 215-221. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v37n2/art11.pdf>.
11. Fernández, A. (2017) Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202017000200005
12. García, J. Hernández, R. (2015) Fermentación de Leche Descremada UHT a partir de Gránulos de Kéfir. El salvador.
13. García, M. Sandoval, R. (2015) Determinación de la Bioconservación del *Lactobacillus acidophylus* sobre *Salmonella spp.* Utilizando sustrato de carne de res. El salvador.

14. Hernández, A. Torres, A. Duarte, C. Rodríguez, D. (2016, Septiembre). Desarrollo de una leche fermentada de cabra con cultivos probióticos. [Online]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222461852016000300002
15. Hernández, S. Bautista, J. , H. (2017) Probióticos y Conservadores Naturales en alimentos.
16. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA. Fichas Técnicas Procesados Lácteos. [Online] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-au170s.pdf>.
17. Jawetz, M, A. (2015). Medical Microbiology. Baltimore MD: McGraw Hill Professional.
18. Jawetz, M, A. (2012). Medical Microbiology. Baltimore MD: McGraw Hill Professional.
19. Jiménez, L. (2015). Estudio de las modificaciones producidas por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 en la viabilidad y las características sensoriales de un queso funcional tipo panela adicionado con *Lactobacillus rhamnosus* GG. Tesis de Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
20. M. Rusczyński, A. Radzikowski, H. Szajewska. (2008) Ensayo clínico: eficacia de *Lactobacillus rhamnosus* en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos en niños Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410562>
21. Maldonado, E. (2013). Determinación del Efecto de *Lactobacillus acidophylus* con Potencial Probiótico sobre la Bacteria Patógena:

Salmonella typhimurium y su Tiempo de Sobrevivencia a los Ácidos Biliares y pH Acido del Estómago.

22. Manual Analítico Microbiológico [base de datos]: Estados Unidos: Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> [2017, 28 de Septiembre].
23. Manual Analítico Microbiológico (2017, Julio) [base de datos]: Estados Unidos: Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm> [2017, 28 de Septiembre].
24. Manual Analítico Microbiológico (2016, Agosto) [base de datos]: Estados Unidos: Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> [2017, 28 de Septiembre].
25. Manual Analítico Microbiológico (2017, Marzo) [base de datos]: Estados Unidos: Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm> [2017, 28 de Septiembre].
26. Manual Analítico Microbiológico (2016, Marzo) [base de datos]: Estados Unidos: Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm> [2017, 28 de Septiembre].

27. Maria, R (2009) "Aislamiento y selección de cepas del genero *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunuladora" [Online]. Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf>
28. Ministerio de Salud (MINSAL). (2017). Boletín Epidemiológico semana 01 [Online] Disponible en <http://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos-2017/> [Consultada el 02.02.2017].
29. Martinez, J. Trujillo, F. (2017). Determinación de la bioconservación de quesos frescos de Metapán, utilizando una cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* Howarutm frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. El Salvador.
30. Navarrete, C. (2007). Efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* sobre la maduración de Gauda reducido en grasa. Tesis de Ingeniería y Alimentos. Universidad Austral de Chile. Chile.
31. Norma general del codex para el uso de términos lecheros codexstan206-19991 Pag. 187 Leche y Productos Lácteos Segunda edición Organización Mundial de la Salud Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Roma, 2011
32. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2009). Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria (2009): Enfermedades Transmitidas por Alimentos y su Impacto Socioeconómico Estudios de Caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma, Italia.: Disponible. <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
33. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2018). Composición de la leche. Disponible: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>

34. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2018). Tema de debate: el papel de la leche y los productos lácteos en la nutrición humana. Disponible: <http://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/288538/>
35. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2018). CRÍA DE OVINOS Y CABRAS LECHERAS. Disponible en : <http://www.fao.org/docrep/V5290S/v5290s24.htm>
36. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio de caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en El Salvador. Disponible en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03.pdf>
37. Organización Panamericana para la Salud. Peligros biológicos. Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario – HACCP. Disponible en http://www.Paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838%3A2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaccp&Itemid=41432&lang=fr
38. Palomino, M. (2011). Modificaciones en la envoltura de *Lactobacillus casei* durante el crecimiento bajo estrés osmótico. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
39. Panamerican Health Organization (2016). Peligros biológicos. Inocuidad de Alimentos Control Sanitario, HACCP. Disponible: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838%3A2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaccp&Itemid=41432&lang=en
40. Parra, R. (2012) Yogurt en la salud humana. Colombia. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v9n2/v9n2a17.pdf>.

41. R. Eryck, Hernández, S. Herrera, R. D, Esther. Hernández, O. Cruz Elvia, Frixia Galán, Aquino, E. Guzmán, I. (2010) Productos no Tradicionales de la Leche de Cabra: Helados y Yogurt [Online]. Recuperado de http://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/PRODUCTOSNOTRADICIONALESDELECHECABRA.pdf
42. Ramírez, J. Rosas, P. Velázquez, M. Ulloa, J. Arce, F. (2011) Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Disponible en: fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf
43. Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (2011) Análisis microbiológico de los alimentos metodología analítica oficial microorganismos patógenos, volumen 1 AMNAT, Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf
44. Salcedo Hernández, R. Bautista Justo, MayelaVázquez Acosta, H.Barboza Corona, José Eleazar. (2007) Probióticos y Conservadores Naturales en alimentos. DIALNET OAI Articles.Recuperado de: http://biblioteca.Universia.net/html_bura/ficha/params/title/probioticos-conservadores-naturales-alimentos/id/44756650.html
45. Santos, A. Vega, D. (2012) Estandarización del proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir. El Salvador http://ri.ues.edu.sv/2349/1/Estandarizaci%C3%B3n_del_proces_de_fermentaci%C3%B3n_de_leche_entera_ultrapasteurizada_con_gr%C3%A1nulos_de_kefir.pdf

46. Santos, A. Vega, D. (2012) Estandarización del proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir. El Salvador.

47. Sepúlveda, J. Dri, P. Elaboración de Queso de Leche de Cabra [Online]. Recuperado de <http://www.ganaderia.mendoza.gov.ar/index.php/prensa/148elaboracion-de-queso-de-leche-de-cabra>

48. Tecnología y Alimentos (2008, 5 Junio). [Base de datos]: Algunas cosas sobre tecnología de los alimentos. Bacteriocinas. Disponible en:<https://tecnoyalimentos.wordpress.com/2008/06/05/bacteriocinas/>

GLOSARIO

- 1. Bacterias ácido lácticas (BAL):** Pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, son Gram positivas, se caracterizan porque sus miembros pueden ser bacilos largos o cortos. Estas bacterias son normalmente no móviles, aunque también pueden serlo. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar a ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como subproductos.⁽¹³⁾⁽⁴¹⁾
- 2. Bacteriocinas:** Son componentes proteínicos antibacterianos que son producidos por BAL comúnmente presentes en alimentos. Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático, aunque las bacteriocinas se pueden sintetizar por levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, las bacterias ácidos lácticas, además de conservar a los alimentos, provienen de un grupo bacteriano, por excelencia, saludable.⁽¹³⁾
- 3. Probióticos:** Son definidos por la FAO como “microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped”.⁽³¹⁾⁽⁴⁾
- 4. Leche:** Leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenidos mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinados al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior.⁽³⁰⁾
- 5. Microorganismos beneficiosos:** Son aquellos que resultan deseables por ser necesarios para la elaboración de productos de buena calidad,

entre ellos se incluyen las bacterias ácido lácticas.⁽⁴⁶⁾

- 6. Microorganismos patógenos:** son los perjudiciales e indeseables que como consecuencia de higiene deficiente, suciedad y prácticas erróneas, llegan a la leche o productos lácteos, donde se multiplican.⁽⁴⁶⁾
- 7. Pasteurización:** Consiste en calentar la leche a una temperatura de 65°C por 30 minutos, para eliminar los microorganismos patógenos y mantener las propiedades nutricionales de la leche.⁽¹⁶⁾
- 8. Pruebas bioquímicas:** Permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación.⁽²¹⁾
- 9. Quesos:** son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa, Los quesos se obtienen por la coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lacto suero se separa de la cuajada.⁽¹⁸⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1

LISTA DE CHEQUEO

Lista de chequeo



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



OBJETIVO: Identificar las condiciones higiénicas en las que se realiza el ordeño de las cabras de la zona del Mercado Municipal de la colonia Zacamil.

LISTA DE CHEQUEO

Hoja de Observaciones de campo				
N°	Preguntas	Cumple	No Cumple	Observaciones
1	¿Cuáles son las condiciones higiénicas del lugar en donde mantienen a las cabras?	✓		Cuando defecan las cabras, barren el excremento y lo arrojan a un tragante cercano.
2	¿Existe algún foco de contaminación cerca de donde están?	✓		-----
3	¿Las personas que realizan el ordeño tienen ropa adecuada?		✓	Ropa de uso diario.
4	¿Se lavan las manos antes de realizar el ordeño?		✓	Se limpian las manos con una franela.
5	¿Los animales se ven saludables?	✓		-----
6	¿Cómo observa la condición de las ubres de las cabras?	✓		-----
7	¿Se observa si limpia la ubre de los animales antes del ordeño?		✓	-----
8	¿Los animales no reposan en el suelo?	✓		-----

Condiciones higiénicas del lugar: Se observó que limpian las heces de las cabras y no se observa basura cerca.

ANEXO N°2



	ETIQUETA DEL ALIMENTO	
FECHA Y HORA DE RECOLECCIÓN:		
TIPO DE MUESTRA:		
TEMPERATURA DE PROCEDENCIA:		
ANÁLISIS:		

Figura N° 7. Formato etiqueta de recolección.

ANEXO N°3

OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA

ANEXO N°4
PASTEURIZACIÓN DE LECHE DE CABRA

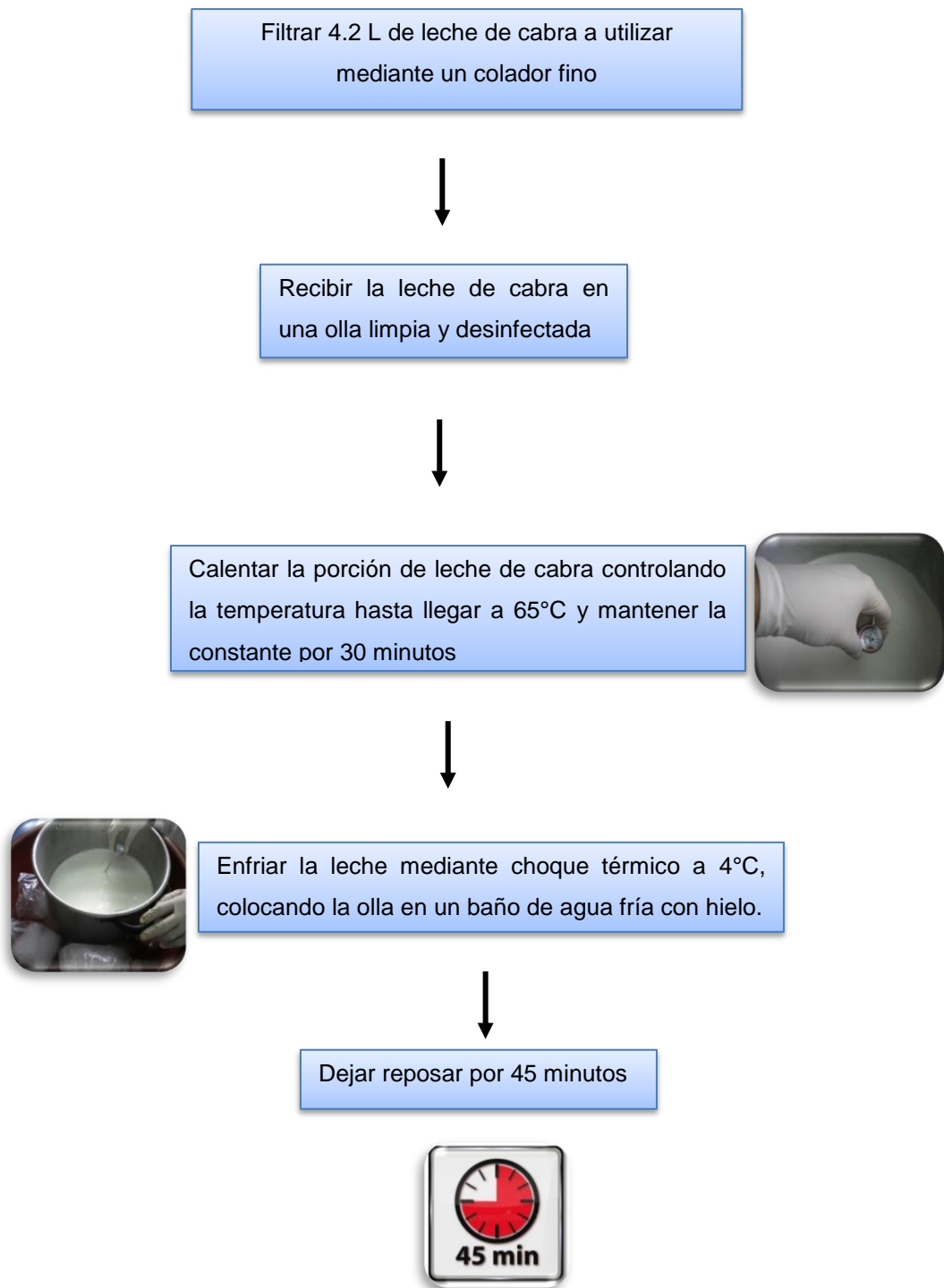


Figura N° 9. Pasteurización de leche de cabra

Anexo N°5

DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* POR MÉTODO DE TUBOS
MÚLTIPLES (NMP).

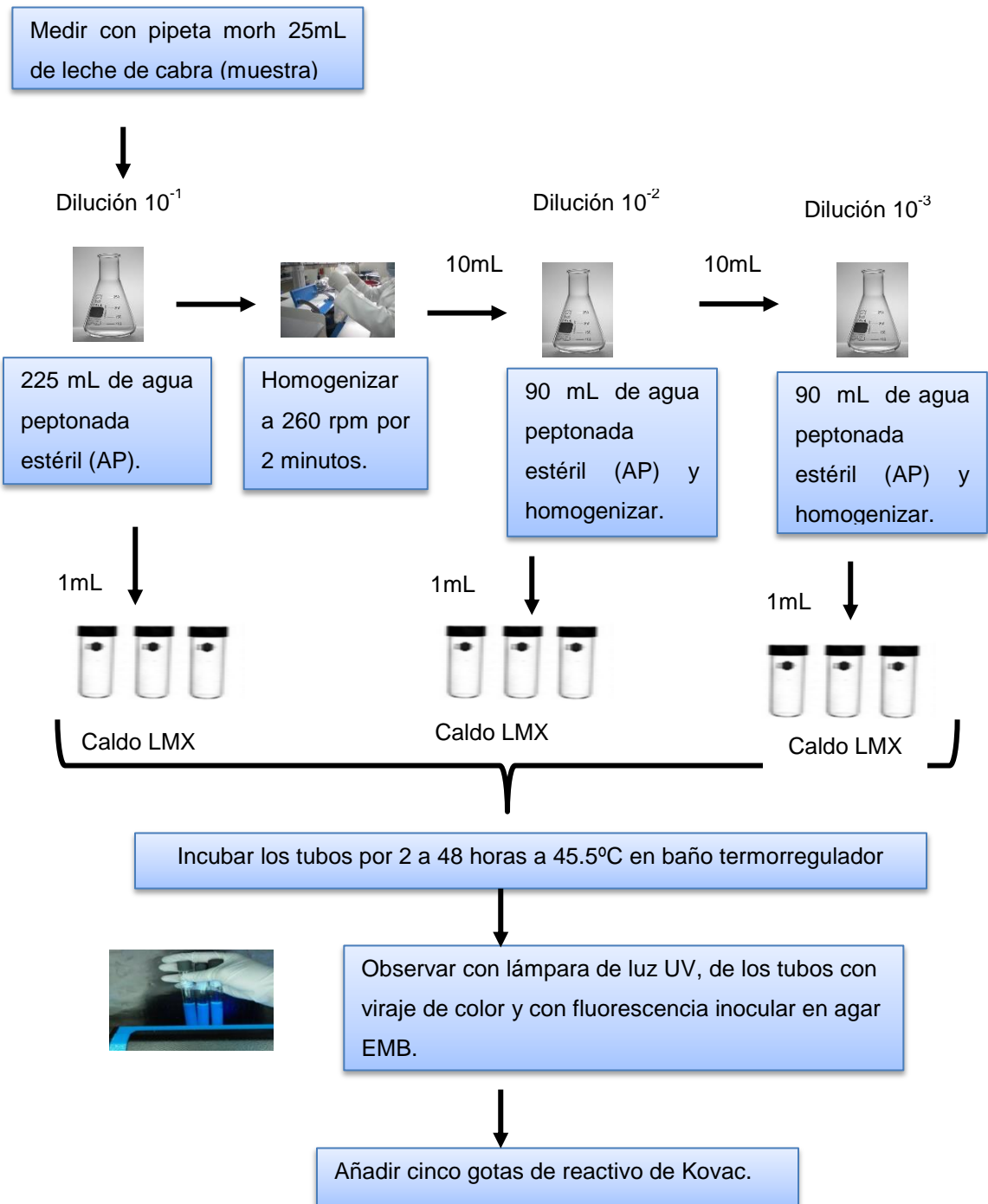


Figura N° 10. Determinación de *Escherichia coli* por método de tubos múltiples (NMP).

ANEXO N°6

Tabla N°11.Tabla para 3 tubos cada uno a 0.1, 0.01 y 0.001g de inóculo, el número mas probable por gramo e intervalos de confianza de 95%.

Pos. Tubos			MPN / g	Conf. lim.		Pos. tubos			MPN / g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	dieciséis	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	-

Fuente: Manual de Análisis Bacteriológico (BAM), siglas en inglés. (20)

ANEXO N°7

DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli*.

De los tubos con caldo LMX



Tomar una asada y estriar sobre dos placas con agar EMB



Incubar a 37 °C por 24 horas



Observar la placa Las colonias color verde metálico son características de *Escherichia coli*.

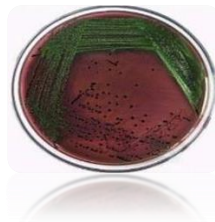


Figura N° 11. Determinación de *Escherichia coli*.

ANEXO N° 8.

DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp.

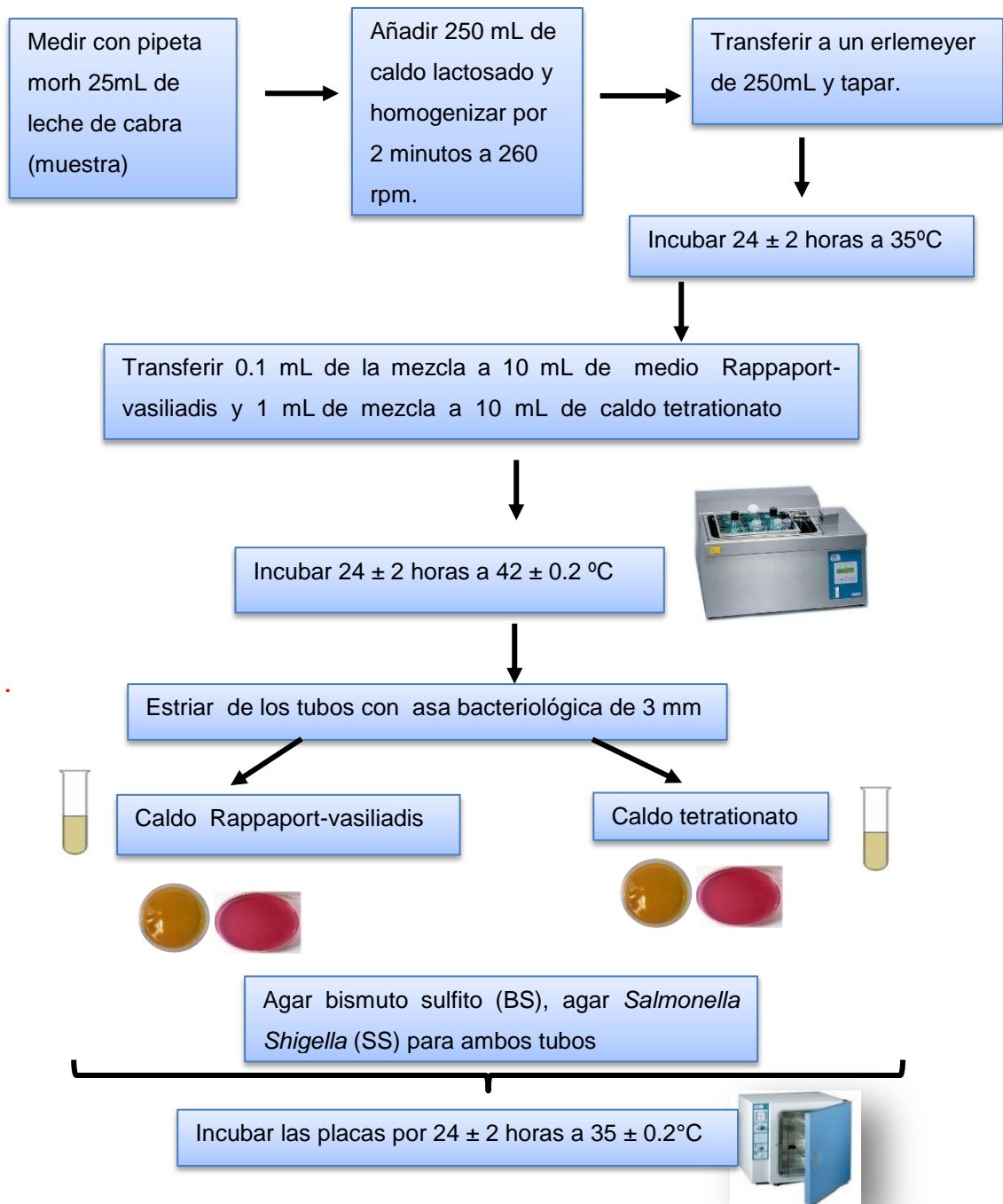
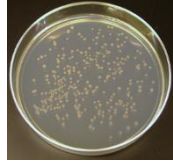


Figura N°12 Determinación de *Salmonella* spp.

ANEXO N°9
PRUEBAS BIOQUIMICAS



Sembrar en agar TSA a partir de las colonias sospechosas en los medios selectivos



Inocular con un asa en punta por picadura el agar TSI hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.

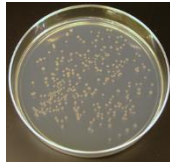


Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.



Leer los resultados.

Figura N° 13. Pruebas bioquímicas: TSI.



Sembrar en agar TSA a partir de las colonias sospechosas en los medios selectivos.



Inocular con un asa en punta por picadura el agar citrato hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.



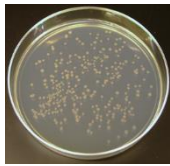
Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas



Leer los resultados

Un cambio en la coloración del medio que va del verde a azul indica prueba positiva.

Figura N°14. Pruebas bioquímicas: Agar Citrato. (Continuación)



Sembrar en agar TSA a partir de las colonias sospechosas en los medios selectivos.



Inocular con un asa en punta por picadura el agar Movilidad hasta el fondo del tubo.

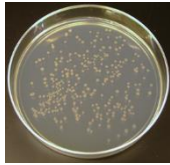


Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.



Leer los resultados

Figura N° 15. Pruebas bioquímicas: Agar Movilidad. (Continuación)



Sembrar en agar TSA a partir de las colonias sospechosas en los medios selectivos.



Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene Caldo Indol y tapar.



Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 - 48 horas.



Agregar a los tubos 5 gotas de éter etílico y 5 gotas de reactivo de Erlich.



Leer los resultados.

La formación de un anillo violeta en la superficie del medio indica prueba positiva.

Figura N° 16. Pruebas bioquímicas: Caldo Indol. (Continuación)

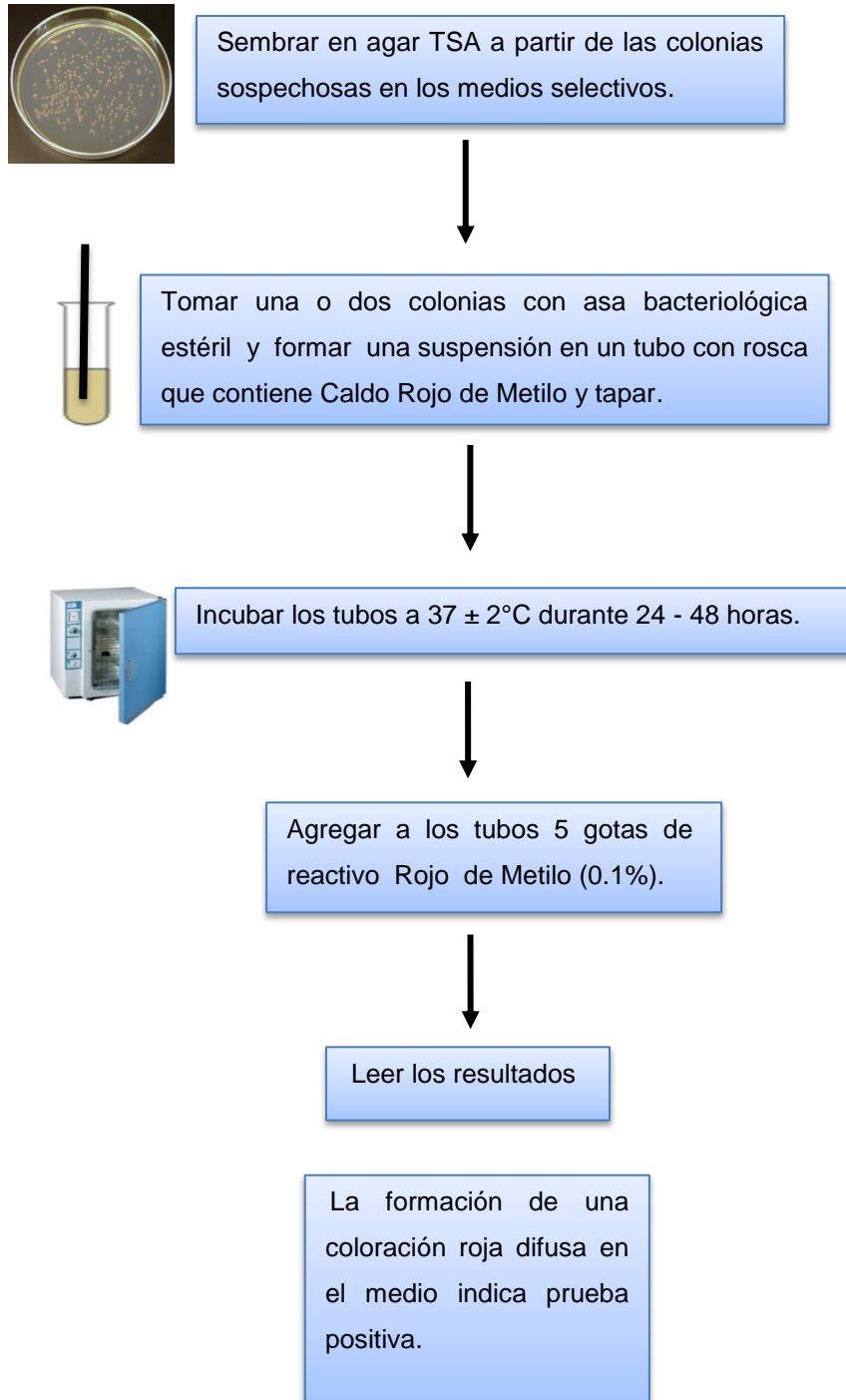


Figura N°17. Pruebas bioquímicas: Rojo de Metilo. (Continuación)

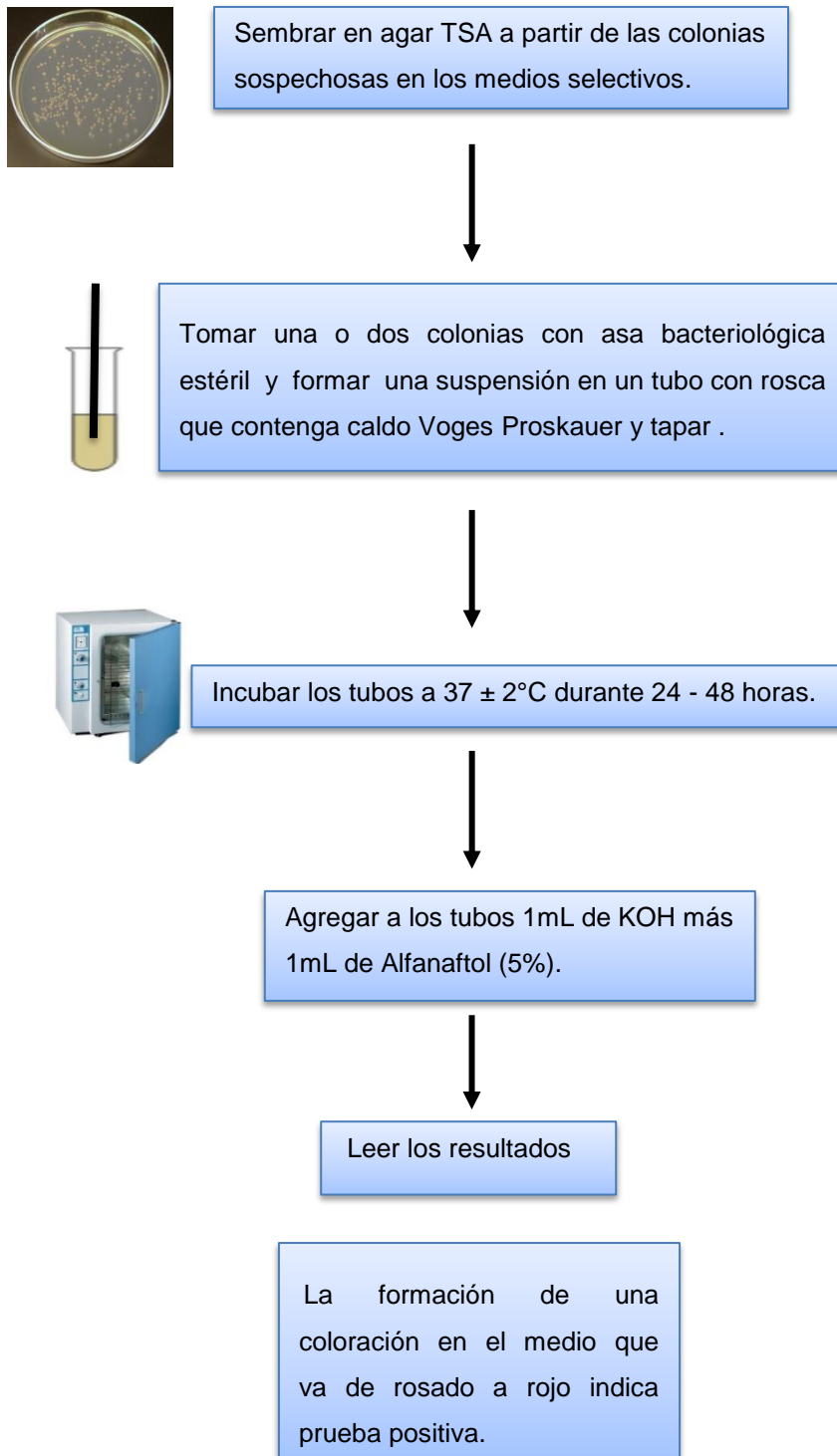


Figura N° 18. Pruebas bioquímicas: Voges Proskauer (Continuación)

ANEXO N° 10

DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN LECHE DE CABRA

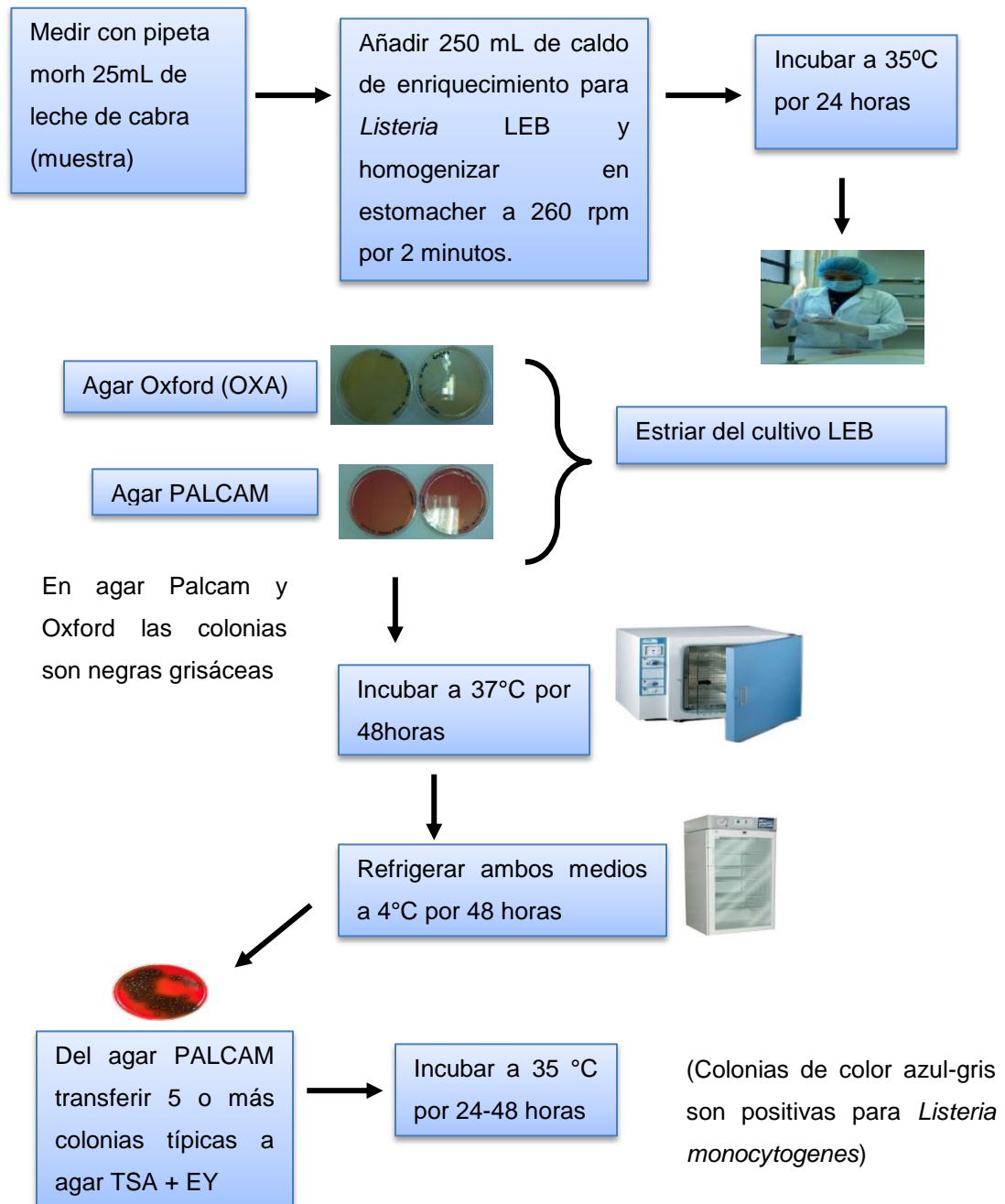


Figura N° 19. Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra.

ANEXO N°11

TEST DE HEMOLISIS (AGAR SANGRE DE OVEJA)



Tomar una colonia aislada con asa en punta



Pinchar el agar sangre en 4 espacios diferentes



Incubar a 35°C durante 24 horas



Listeria monocytogenes, produce una delgada y clara zona de β - hemólisis

Figura N° 20. Test de hemolisis (agar sangre de oveja)

ANEXO N° 12

DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN LECHE DE CABRA

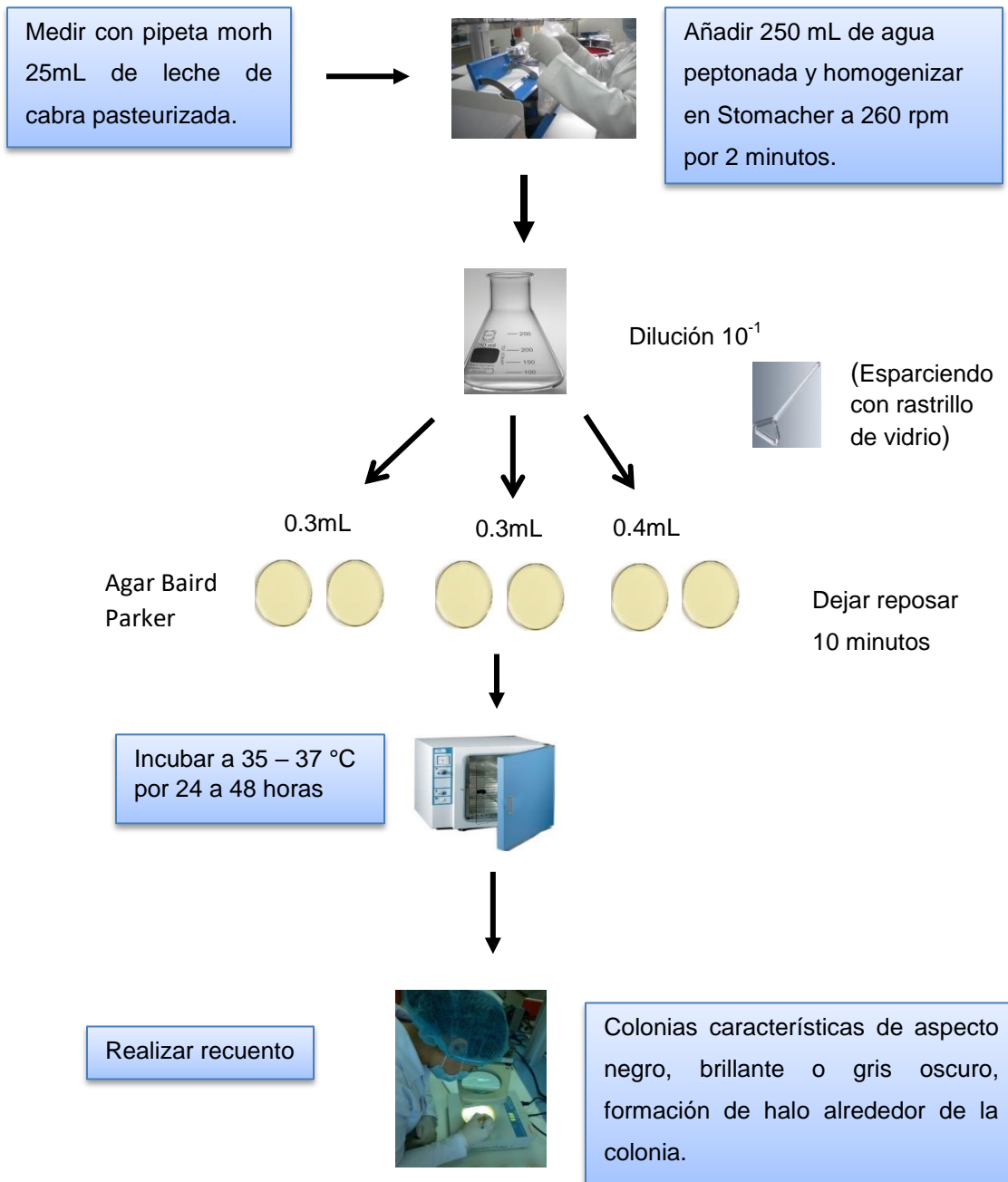


Figura N°21. Determinación de *Staphylococcus aureus* en leche de cabra.

ANEXO N°13

Tabla N° 12. Especificaciones microbiológicas para leche establecidos por el REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS RTCA 67.04.50:08. ⁽²⁾

1.0 Grupo de Alimento: Leche y productos lácteos. Incluye todo tipo de productos lácteos derivados de la leche de cualquier animal que suele ser ordeñado (vaca, oveja, cabra, búfala). En esta categoría, un producto simple es uno que no contiene ningún saborizante, ni contiene frutas, verduras u otros ingredientes no lácteos; tampoco se ha mezclado con otros ingredientes no lácteos, salvo lo permitido por las normas correspondientes. Similares son productos en los cuales la grasa láctea ha sido reemplazada parcial o totalmente por grasas o aceites vegetales.						
1.1 Subgrupo del alimento: Leche fluida pasteurizada con o sin saborizantes, con o sin aromatizantes.						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	N	C	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	<3 NMP/mL	---
<i>Salmonella ssp/25g</i>		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>		2		0	Ausencia	---
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		2	10 UFC/mL	10 ² UFC/mL

ANEXO N° 14

DETERMINACIÓN DE pH LECHE DE CABRA PASTEURIZADA



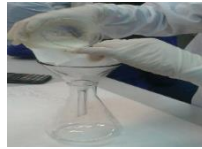
Calibrar el pHmetro, utilizando buffer pH 4 y buffer pH 7



Homogenizar la leche de cabra



Filtrar si hay presencia de partículas extrañas



Tomar el pH a 10mL de muestra sumergiendo directamente la muestra en el electrodo a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Figura N° 22. Determinación de pH leche de cabra pasteurizada.

ANEXO N°15

AISLAMIENTO DE *Lactobacillus spp.*

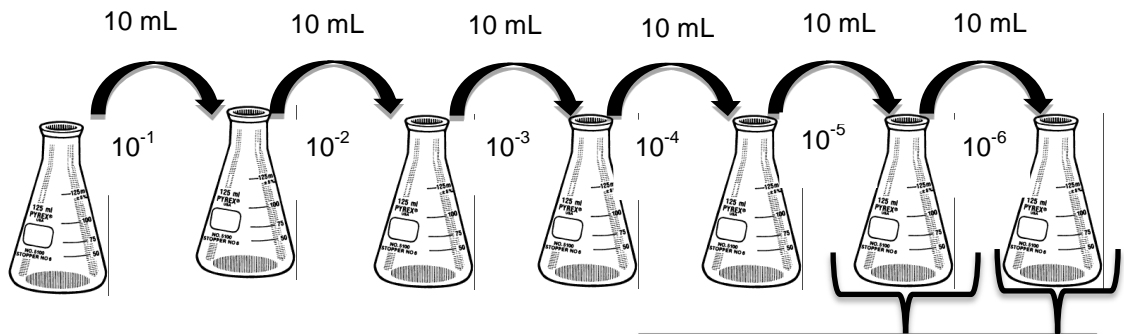


Pesar 25 g de Yogurt natural.

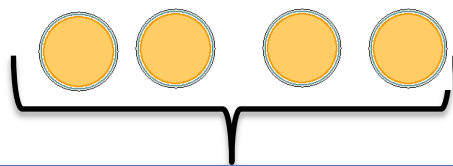
Agregar 225 mL de agua peptonada

Agitar en Stomacher a 260 rpm por 2 min.

Transferir 10 mL de muestra a un Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada, realizar diluciones tomando 10 mL y transferir a los Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada.



Colocar 1 mL en cada placa conteniendo 20 mL de agar MRS



Tomar colonias aisladas del microorganismo identificarlas y colocarlas en caldo MRS

Incubar a 37°C por 48h en atmosfera anaerobia al 5% CO₂

Figura N°23. Aislamiento de *Lactobacillus* spp.

ANEXO N°16

IDENTIFICACIÓN DE LA MEZCLA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

Lactobacillus rhamnosus Y *Lactobacillus spp.*

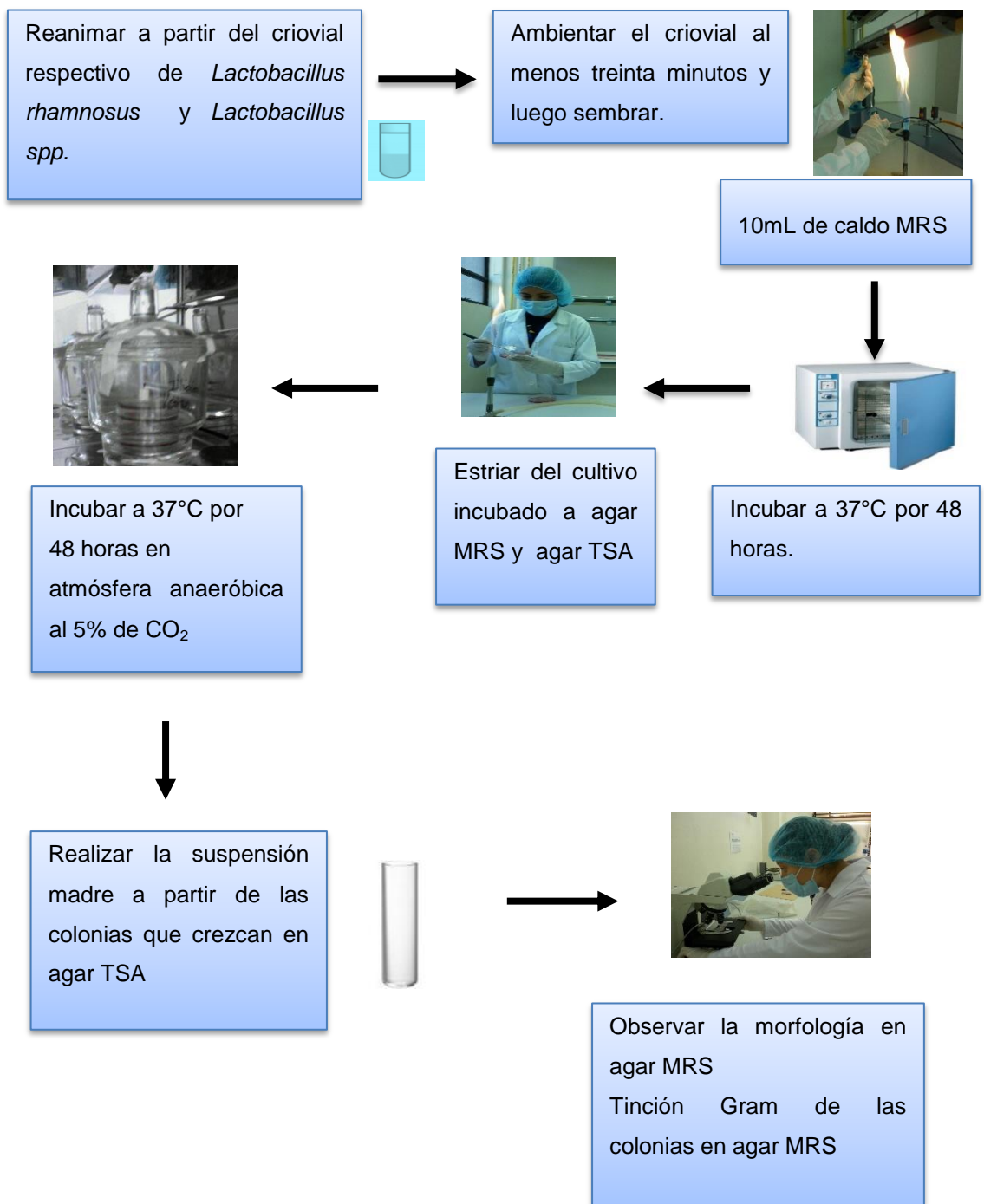


Figura N° 24. Identificación de la mezcla de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.*

ANEXO N° 17

TINCIÓN GRAM PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS *Lactobacillus*
rhamnosus Y *Lactobacillus* spp.

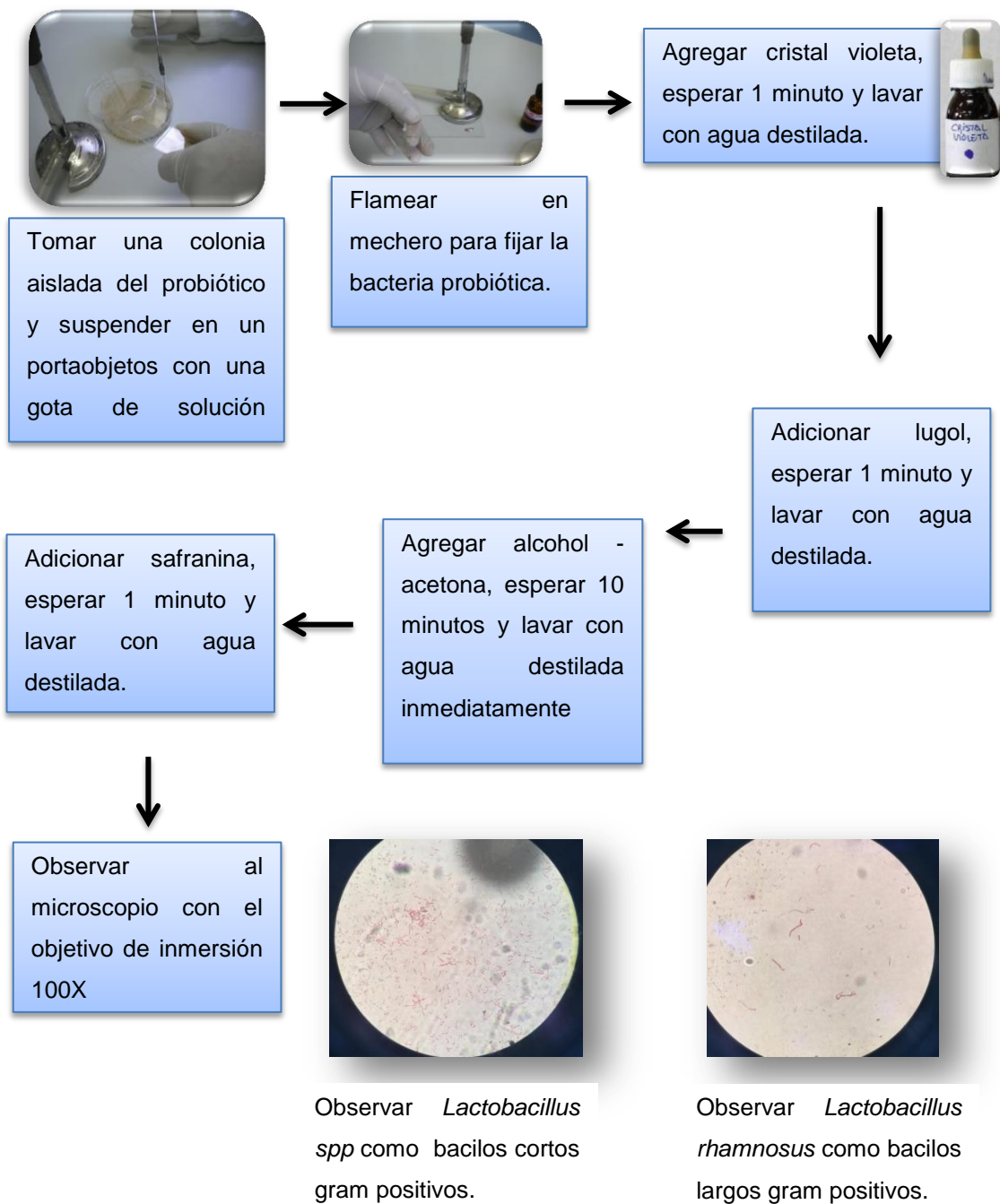


Figura N° 25. Tinción Gram para identificación de bacterias *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp*.

ANEXO N° 18

ESTANDARIZACIÓN DE LA MEZCLA DE CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus rhamnosus* Y *Lactobacillus spp.*

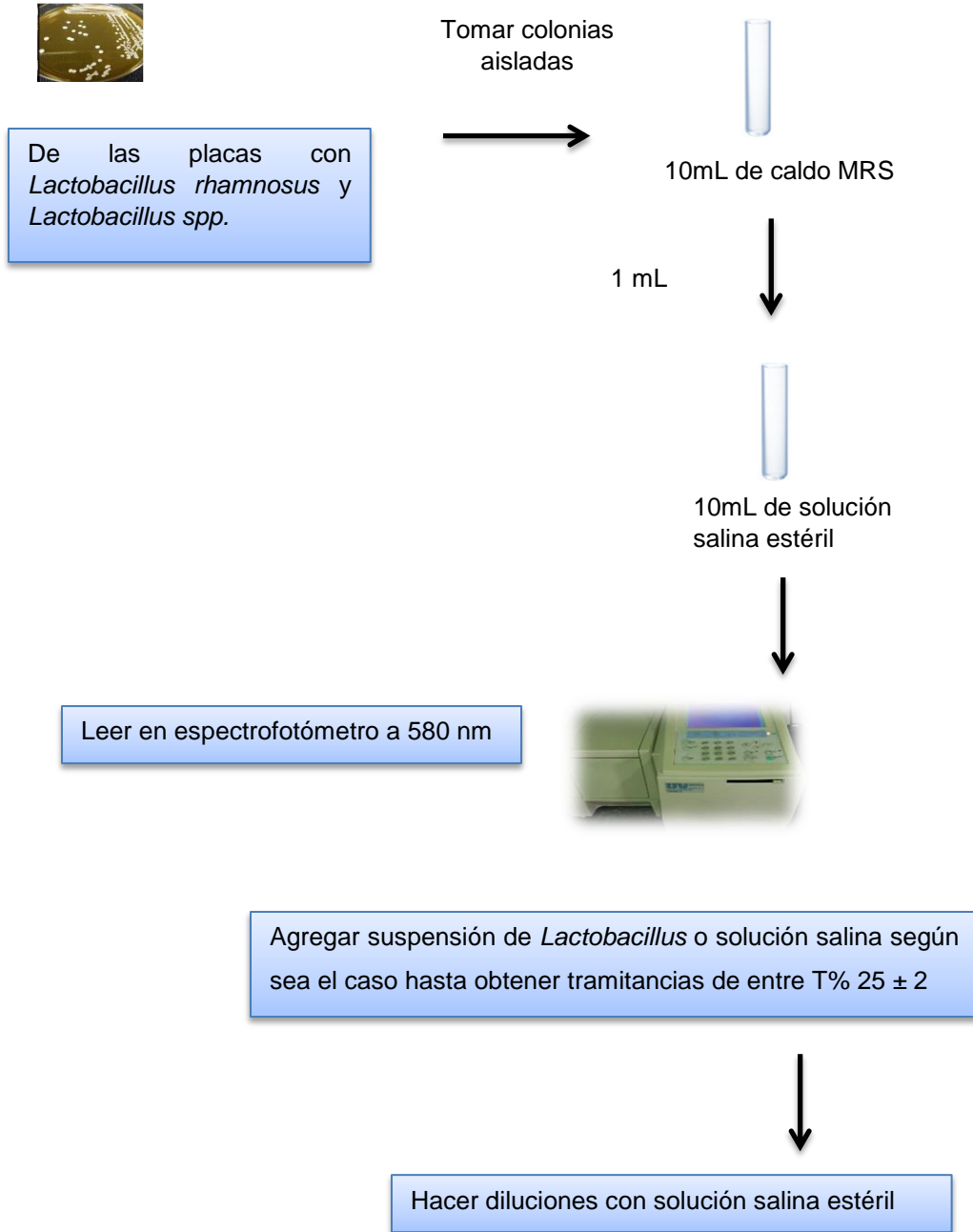
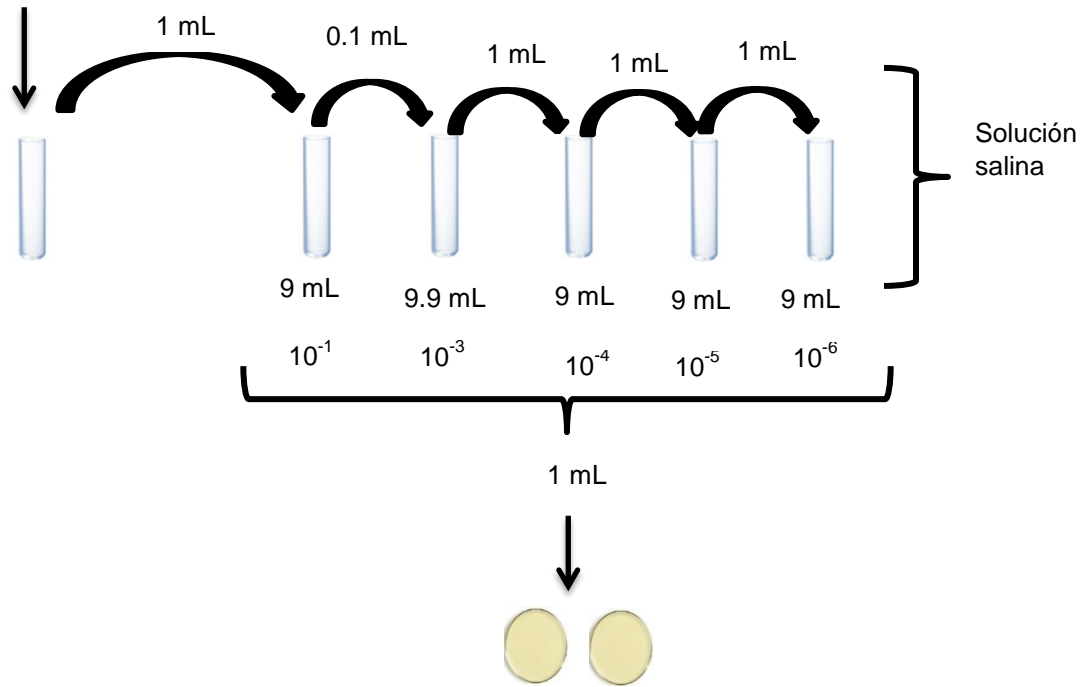


Figura N° 26. Estandarización de la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.*



Verter 20mL de agar MRS y mezclar en forma de ocho, dejar solidificar. Incubar en atmosfera de anaerobiosis CO₂ al 5% a 38°C por 48 – 72 horas.

Realizar recuento en placa de cada dilución

Figura N° 27. Continuación. Estandarización de la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.*

ANEXO N°19

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

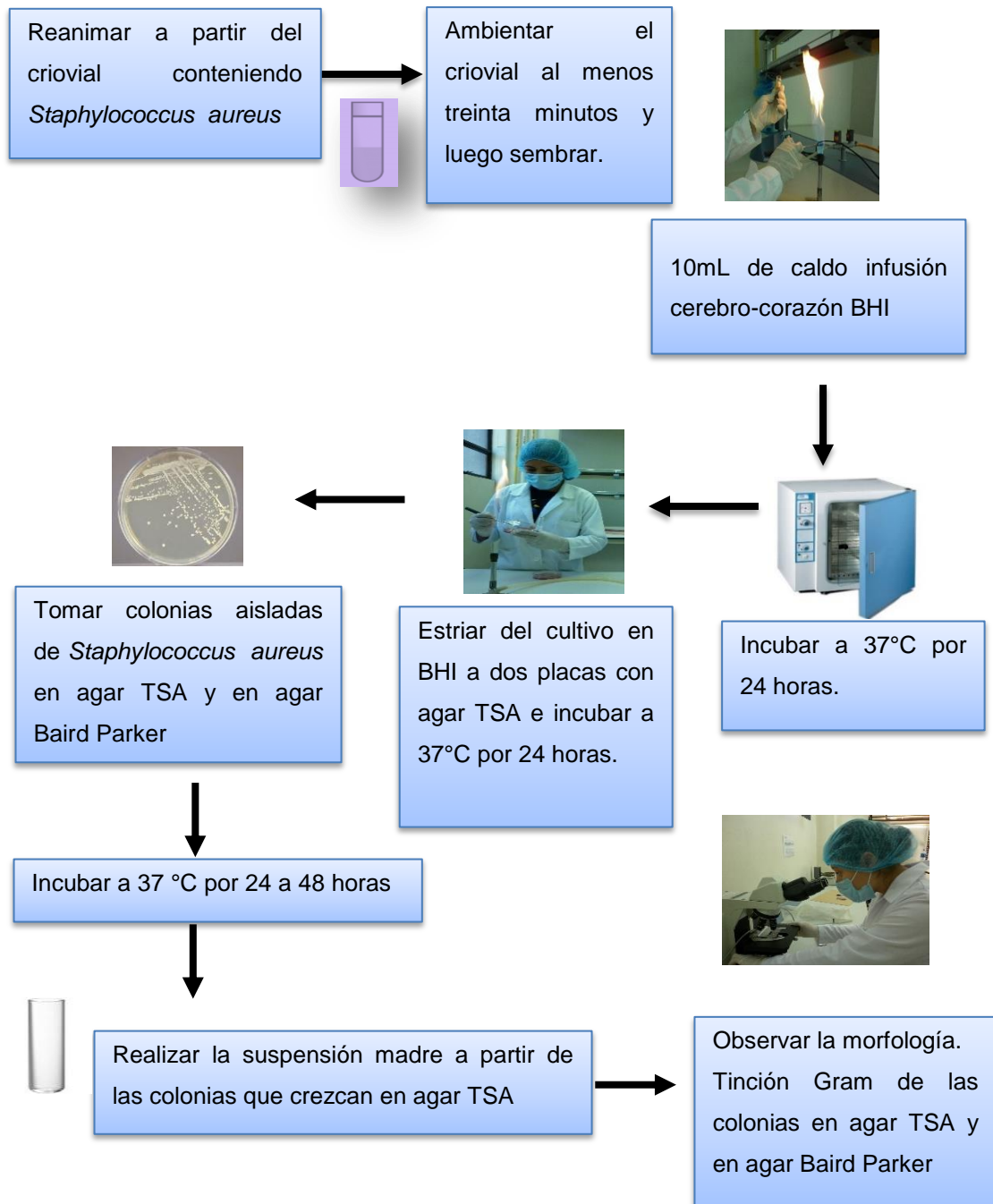


Figura N° 28. Identificación de *Staphylococcus aureus*

ANEXO N°20

TINCIÓN GRAM

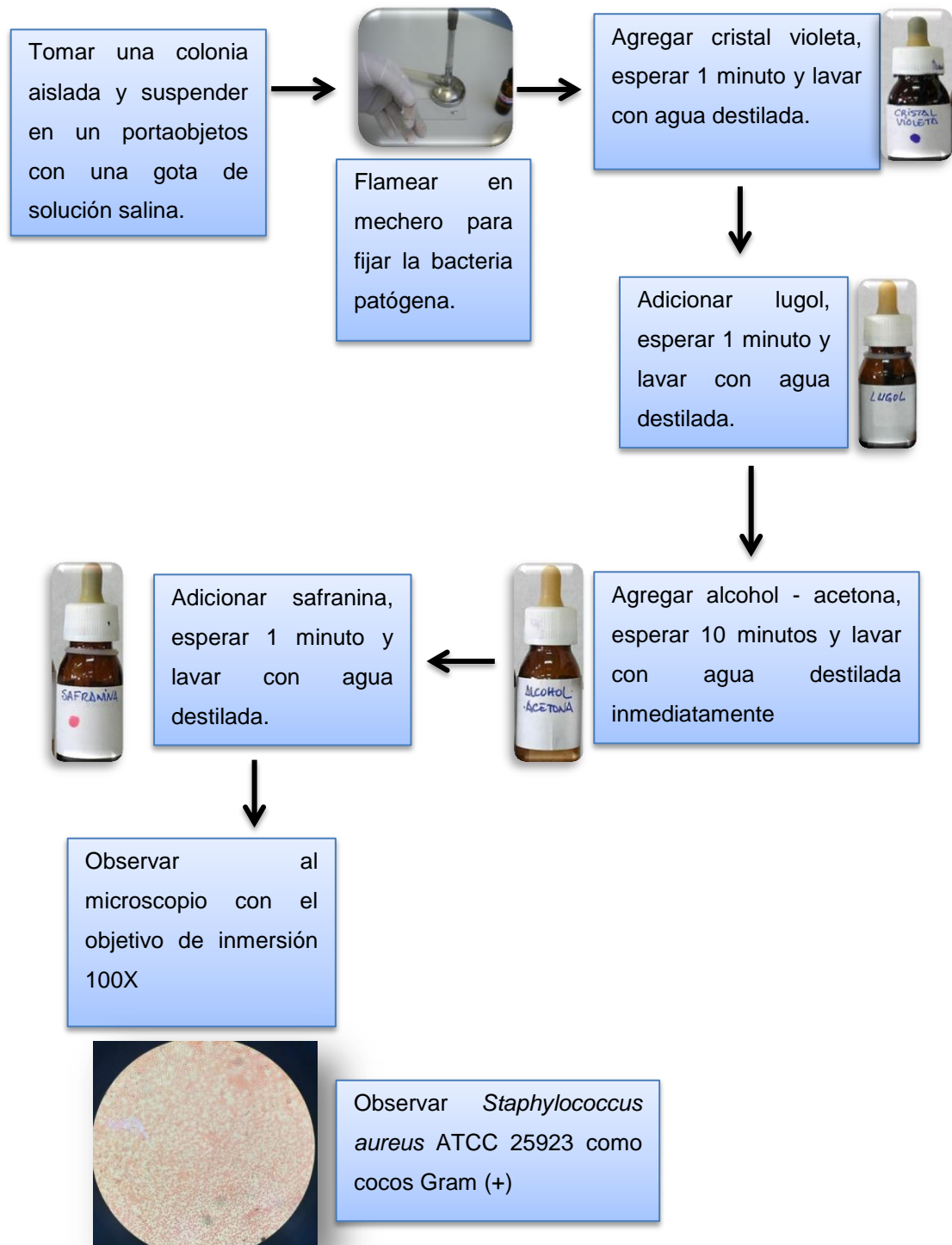
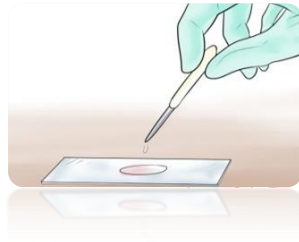


Figura N° 29 Tinción Gram

ANEXO N°21
PRUEBA DE LA CATALASA



Agregar una gota de Peróxido de Hidrógeno.



Con el asa picar una de las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus*



Colocar la colonia sospechosa sobre la gota de peróxido. La producción de burbujas de gas (oxígeno) indica un resultado (+).

Figura N°30. Prueba de la catalasa

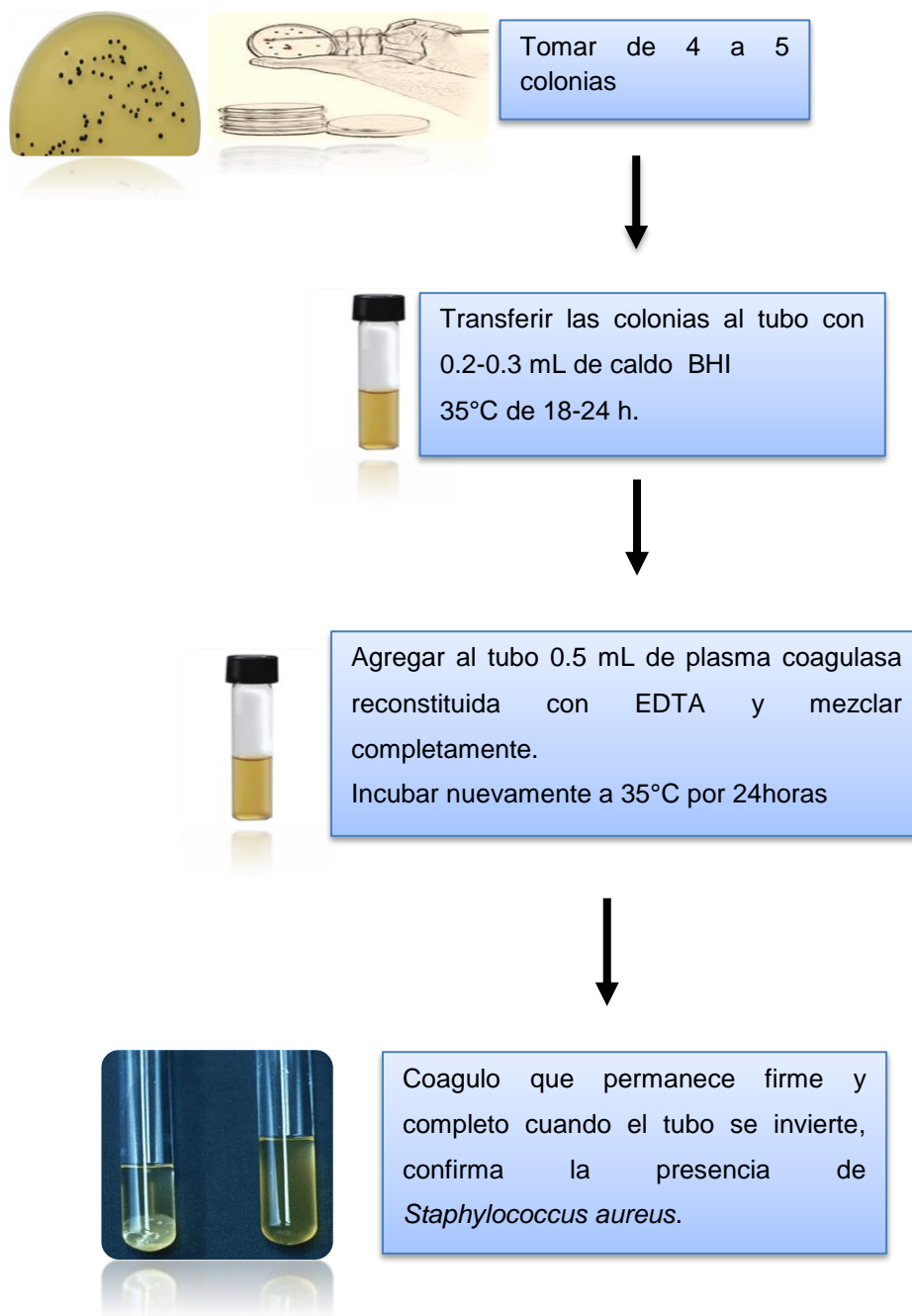


Figura N° 31. Prueba de la coagulasa para identificación de *Staphylococcus aureus*.

ANEXO N° 22

ESTANDARIZACIÓN DE LA BACTERIA PATÓGENA *Staphylococcus aureus*
ATCC 25923

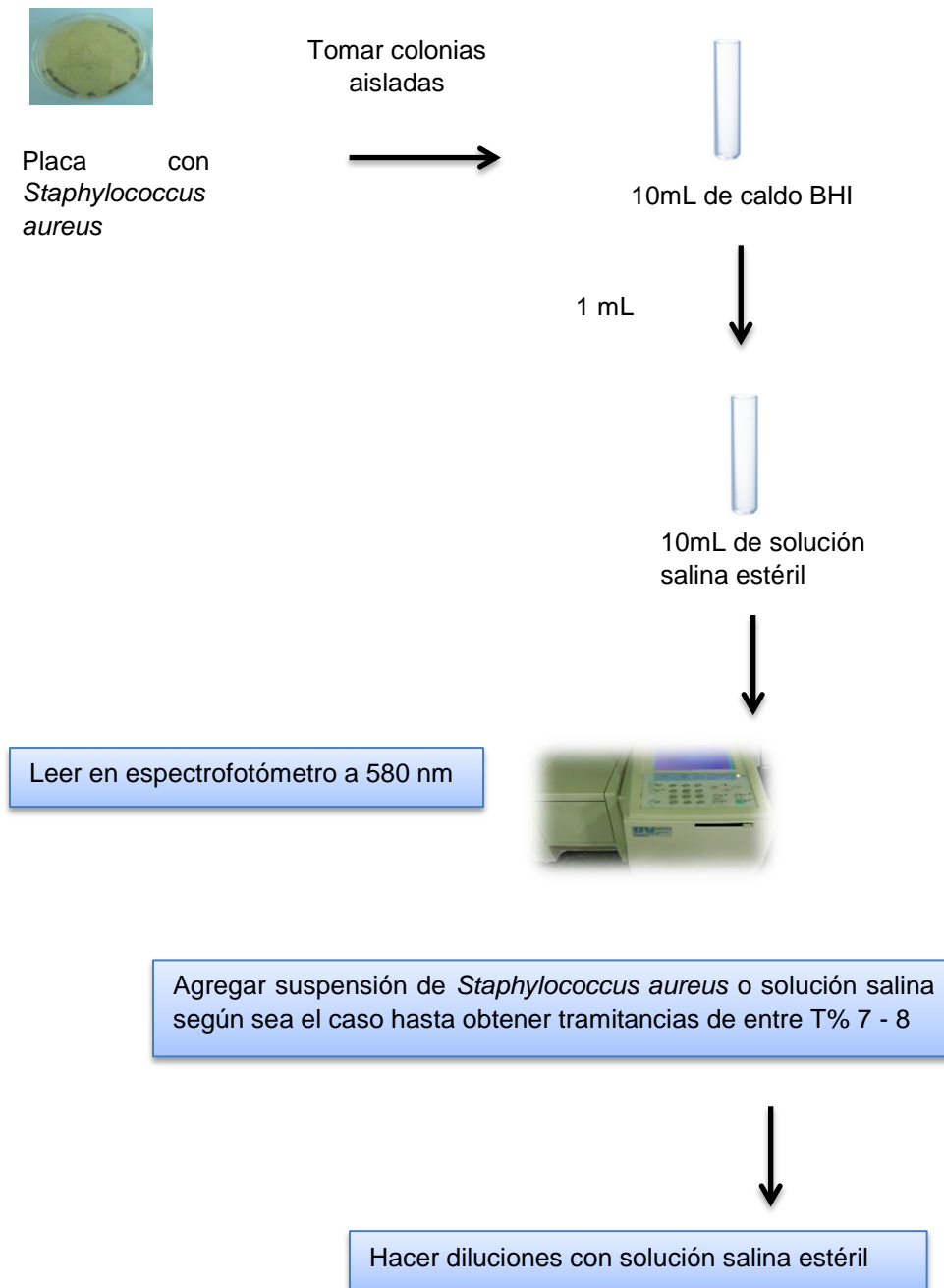
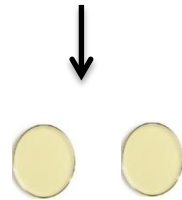
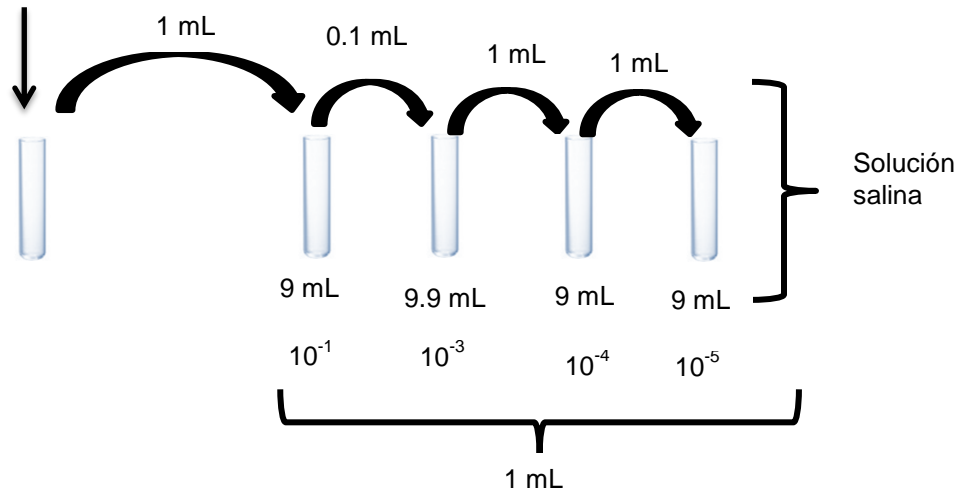


Figura N° 32. Estandarización de la Bacteria Patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Sembrar en placas con agar Baird Parker por
vaciado en placa e incubar a 38°C por 24 horas



Realizar recuento en placa de cada dilución

Figura N° 33. Continuación. Estandarización de la Bacteria Patógena
Staphylococcus aureus ATCC 25923

ANEXO N°23

ELABORACIÓN DE QUESO NO MADURADO A BASE DE LECHE DE CABRA



Agregar a la leche cloruro de calcio en proporción 0.02-0.03%



Disolver $\frac{1}{4}$ de pastilla de cuajo en $\frac{1}{2}$ taza con agua, agregando un poco de sal a una temperatura de 36°C. La leche se cortará en aproximadamente 15 minutos.



Dejar reposar la leche por 45 minutos. No mover el recipiente en el que se está produciendo la coagulación ni mezclar.



Cortar la cuajada con un cuchillo o paleta limpia en fragmentos iguales.



Mover suavemente la cuajada durante cinco minutos. Calentar la cuajada a 40 grados centígrados por cinco minutos.



Figura N° 34. Elaboración de queso no madurado a base de leche de cabra



Dejar en reposo la cuajada durante cinco minutos.



Separar la cuajada del suero con ayuda de una manta y colocar la cuajada en bandeja.



Agregar 3 cucharadas de sal común.



Amasar la cuajada y colocarla en un molde.



Figura N° 35. Continuación

ANEXO N° 24

INOCULACIÓN DE *Staphylococcus aureus* 1×10^3 UFC/g EN QUESO NO MADURADO CON MEZCLA DE PROBIÓTICOS *Lactobacillus rhamnosus* Y *Lactobacillus spp.* A CONCENTRACIÓN 1×10^5 UFC/g Y SU RESPECTIVO DUPLICADO.

Pesar 4 porciones de 10.0g de queso no madurado cada una con los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp* a concentración 1×10^5 UFC/g en una bolsa con cierre fácil, además pesar otras 4 porciones rotular y almacenar.



Inocular 1.0 mL de suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* a concentración 1×10^3 UFC/g en cada bolsa con la porción de 10g de queso



Rotular cada bolsa con la porción de queso pesada con código de muestra, concentración de probióticos y patógeno, los días 0, 5, 8 y 15 de análisis.



Almacenar las porciones a T° de refrigeración (5°C)

Nota: Para el queso con mezcla de probióticos de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* 1×10^7 UFC/g y con inóculo de *Staphylococcus aureus* 1×10^5 UFC/g se realizó del mismo modo.

Figura N° 36 Inoculación de *Staphylococcus aureus* 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^5 UFC/g y su respectivo duplicado.

ANEXO N° 25

RECuento DE *Staphylococcus aureus* QUESO NO MADURADO.

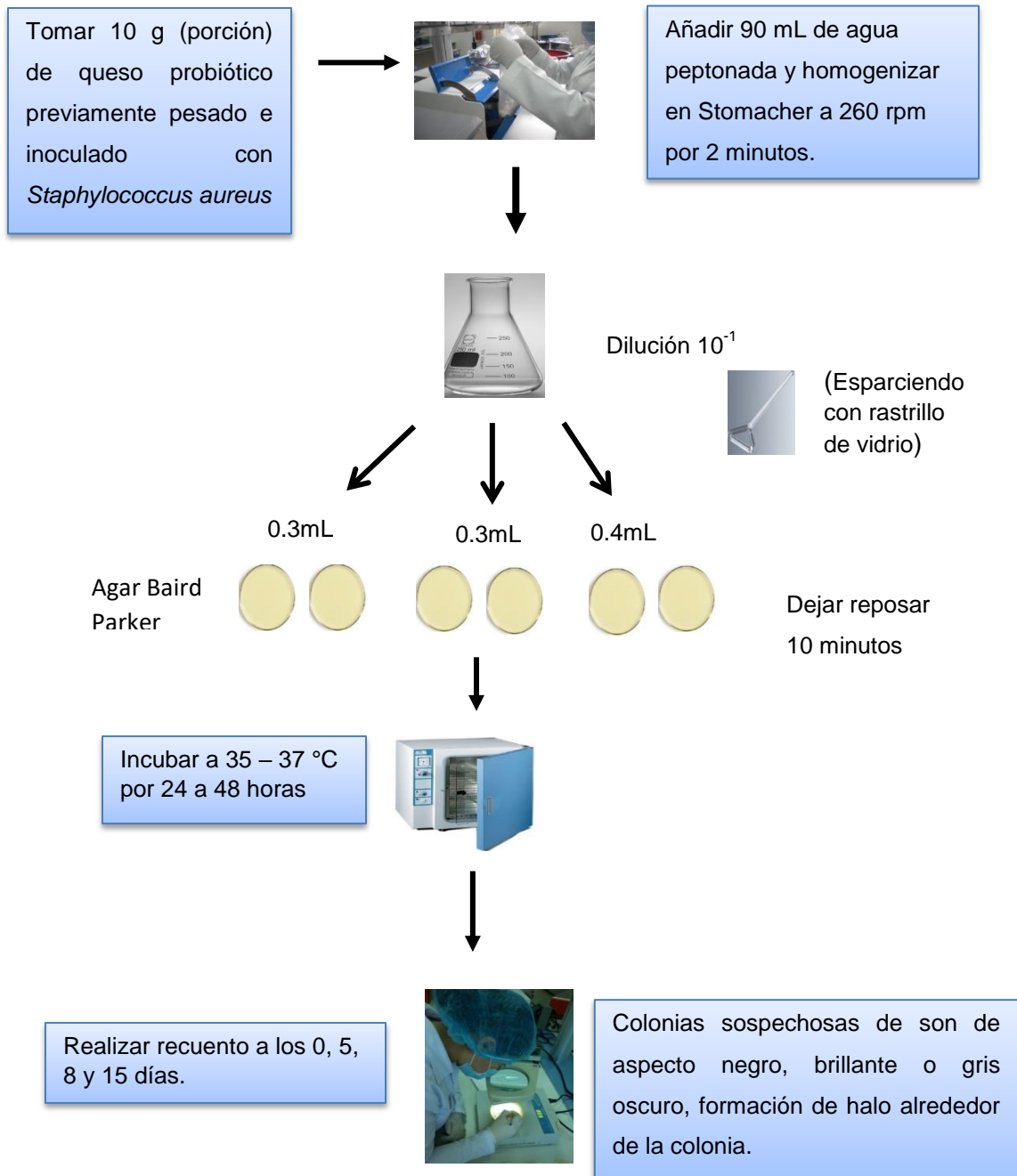


Figura N° 37. Recuento de *Staphylococcus aureus* queso no madurado.

ANEXO N°26

RECuento DE *Lactobacillus rhamnosus* Y *Lactobacillus spp.* EN QUESO NO
MADURADO DE LECHE PASTEURIZADA DE CABRA.

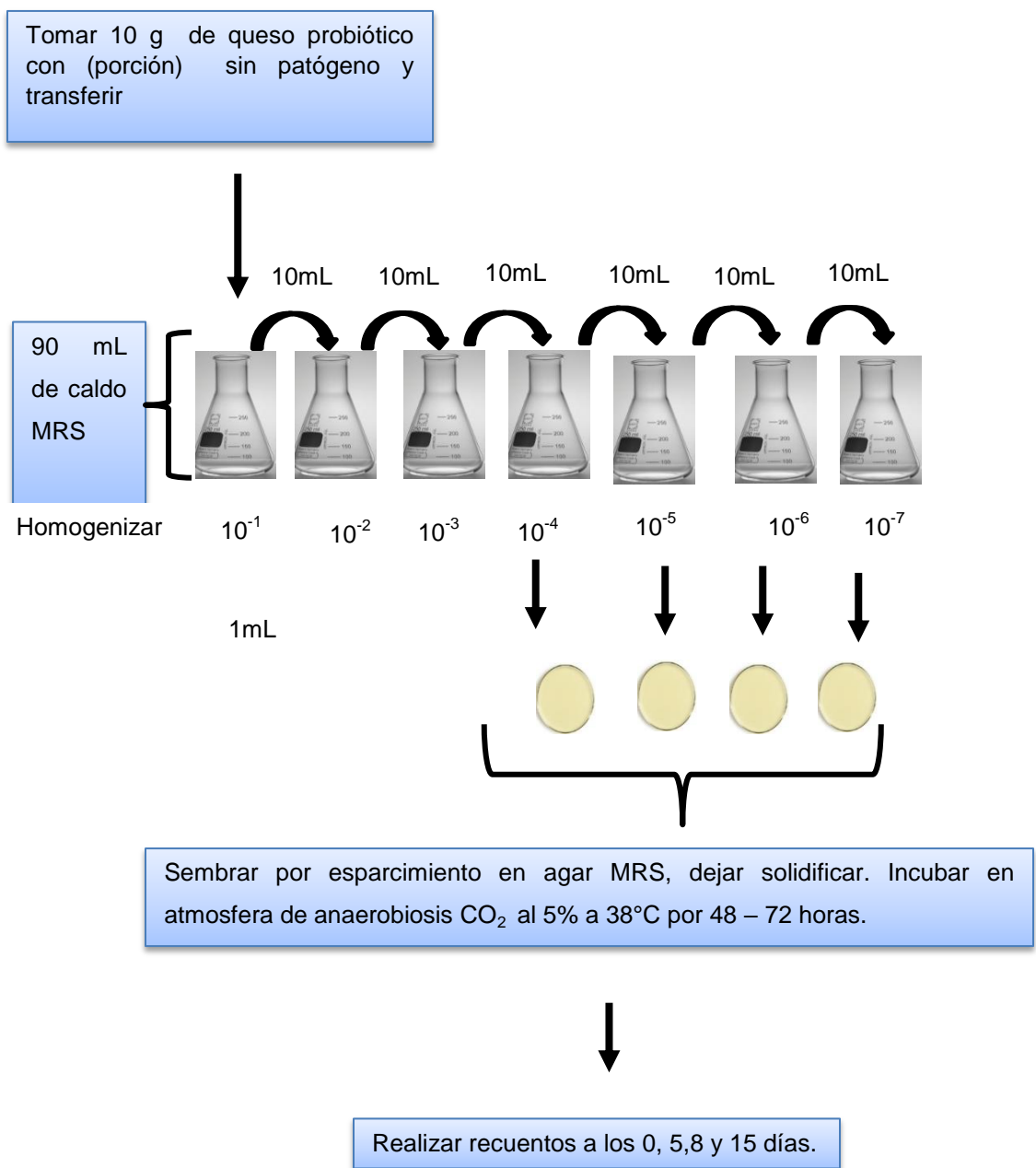


Figura N°38. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* en queso no madurado de leche pasteurizada de cabra.

ANEXO N° 27

Tabla N° 13. Supervivencia de mezcla de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^5 UFC/g.

Código de muestra	Día - UFC/g				Día - Ln [UFC/g]			
	0	5	8	15	0	5	8	15
L1Q1	240,000	75,000	1,900	5,800	12	11	7	8
L1Q2	700,000	78,000	56,000	1,900	13	11	10	7
Promedio	470000	76,000	29,000	3,800	13	11	10	8

ANEXO N° 28

Tabla N° 14. Supervivencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentración 1×10^3 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^5 UFC/g.

Código de muestra	Día - UFC/g				Día - Ln [UFC/g]			
	0	5	8	15	0	5	8	15
L1Q1	1,600	740	360	870	7	6	6	7
L1Q2	1400	710	630	260	7	6	6	5
Promedio	1500	720	490	560	7	6	6	6

ANEXO N° 29

Tabla N° 15. Supervivencia de mezcla cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^7 UFC/g.

Código de muestra	Día - UFC/g				Día - Ln [UFC/g]			
	0	5	8	15	0	5	8	15
L2Q1	67,000,000	390,000	140,000	57,000	18	13	12	12
L2Q2	29,000,000	130,000	100,000	1,300	17	12	11	7
Promedio	480000000	260,000	120,000	29000	18	13	12	10

ANEXO N° 30

Tabla N° 16. Supervivencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentración 1×10^5 UFC/g en queso no madurado con mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus spp.* a concentración 1×10^7 UFC/g. (L2Q1 y L2Q2)

Código de muestra	Día - UFC/g				Día - Ln [UFC/g]			
	0	5	8	15	0	5	8	15
L2Q1	240,000	43,000	14,000	33,000	12	11	9	10
L2Q2	420,000	50,000	12,000	35,000	13	11	9	10
Promedio	330000	46000	26000	34000	13	11	9	10