

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



DETERMINACION DEL EFECTO DE *Lactobacillus acidophilus* CON POTENCIAL PROBIOTICO SOBRE LA BACTERIA PATOGENA: *Salmonella typhimurium* Y SU TIEMPO DE SOBREVIVENCIA A LOS ACIDOS BILIARES Y pH ACIDO DEL ESTOMAGO.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

ERIKA YESSENIA MALDONADO LOPEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE, 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ.

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORAS DE AREA DE ANALISIS MICROBIOLOGICO

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTE DIRECTORA

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por haber estado conmigo en todos los momentos más difíciles de este camino y por haberme ayudado a salir adelante en todo lo que me propuse.

A mi docente director MSc. María Evelin Sánchez de Ramos por su paciencia, dedicación y orientación para llevar a cabo la realización del trabajo de graduación.

A Licdo. Juan José Rivas por su colaboración en todo lo que necesite en la parte experimental de esta investigación y especialmente a MSc Amy Elieth Morán Rodríguez por su paciencia, comprensión y confianza durante todo el proceso y desarrollo de la parte experimental de este estudio.

A MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz por haber tenido mucha dedicación en corregir y orientar este trabajo de graduación y por la disponibilidad de esperar durante las jornadas largas de la parte práctica.

A Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo por su amabilidad y comprensión en la corrección y orientación de esta investigación.

Al Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por haberme facilitado sus instalaciones para hacer posible la parte práctica de esta investigación.

A Rosy Zuleta por todo su conocimiento compartido y por su ayuda incondicional y Elena Barahona por haber sido compañera y apoyo en este proyecto.

A Ademir Pérez por asesorarme en la parte estadística de este trabajo de graduación, y a Jeannethe Sagastizado, Cristina Sánchez y Lupita Vides por toda la colaboración que me brindaron para ser posible este trabajo de pregrado.

Erika Yessenia Maldonado López.

DEDICATORIA

Como fruto de mi esfuerzo, este trabajo es dedicado a ti mi Dios que siempre estuviste a mi lado y que siempre abriste puertas donde no las habían, por haber sido mi compañero de tesis y porque siempre me diste la fuerza de voluntad para seguir adelante aun cuando ya podía, una vez más esto es para ti mi Dios.

A mi madre Blanca Lidia López, por haber sido mi amiga, mi apoyo incondicional, por todos sus consejos, por todas sus oraciones que Dios siempre escucho, por haberme apoyado en todo lo que necesite y porque siempre creíste en que lo lograría, porque nunca me dejaste sola y porque fuiste un ejemplo de ser luchadora. Gracias mamá por ser lumbrera en mi camino.

A Eleazar León, por esos consejos y palabras de aliento que me ayudaron a llegar hasta el final, por su afecto y comprensión que ha hecho motivarme siempre a seguir adelante aun en los momentos de mayor dificultad y por enseñarme a tener paciencia, luchando siempre hasta alcanzar mis metas y nunca darme por vencida.

A mi abuelita Elena García, por ser como mi segunda madre y haberme apoyado para que pudiera lograr terminar mis estudios.

A Henry Aldana por haber sido una ayuda incondicional en mis estudios.

A mis hermanas Jennifer y Daniela, y especialmente a mi hermano José David Maldonado López, porque aunque estuviste lejos siempre fuiste mi ejemplo y porque logre alcanzar la meta que tú siempre quisiste conquistar.

Y a mi Madrina Laura de Portal, por todas sus oraciones y por haber confiado en que siempre lo lograría.

Erika Yessenia Maldonado López.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	xix
CAPITULO I.....	xxi
1.0 INTRODUCCION	xxii
CAPITULO II.....	xxiv
2.0 OBJETIVOS	xxv
2.1 OBJETIVO GENERAL	xxv
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	xxv
2.2.1 Elaborar un yogurt incorporado con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y un yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	xxv
2.2.2 Demostrar la sobrevivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> frente a la bacteria patógena <i>Salmonella typhimurium</i> a diferentes concentraciones, tiempos de incubación y temperatura.	xxv
2.2.3 Establecer el tiempo de sobrevivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> frente a las sales biliares y el pH ácido del estómago.	xxv
2.2.4 Comparar los efectos del yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> contra el yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre la reducción de la bacteria patógena <i>Salmonella typhimurium</i>	xxv
CAPITULO III.....	xxvi
3.0 MARCO TEORICO.....	27
3.1 Bacterias ácidolácticas ⁽³⁸⁾	27
3.2 Características de las bacterias ácidolácticas	28
3.2.1 La Familia <i>Lactobacillaceae</i> ⁽³⁸⁾	28
3.3 El género <i>Lactobacillus</i>	28
3.3.1 Caracteres morfológicos ⁽³⁸⁾	28

3.3.2 Pared celular y ultraestructura ⁽³⁸⁾	29
3.3.3 Caracteres culturales y de las colonias ⁽³⁸⁾	29
3.3.4 Nutrición y condiciones de crecimiento ⁽³⁸⁾	30
3.4 Condiciones ecológicas ⁽³⁸⁾	31
3.4.1 pH	31
3.4.2 Necesidades de Oxígeno	31
3.4.3 Temperatura de crecimiento	32
3.4.5 Sensibilidad a antibióticos y drogas ⁽³⁸⁾	33
3.4.6 Patogenicidad ⁽³⁸⁾	33
3.4.7 Hábitat ⁽³⁸⁾	33
3.5 Probióticos	34
3.5.1 Mecanismos de acción ⁽²⁸⁾	35
3.5.2 Las bacterias ácidolácticas un ejemplo de probióticos ⁽¹⁶⁾	35
3.6 Bacterias ácidolácticas aplicadas en productos comerciales ⁽¹⁶⁾	37
3.7 El yogurt, su valor nutrimental y su importancia en la salud ⁽¹⁶⁾	37
3.8 Efecto de los probióticos en el organismo humano ⁽¹⁶⁾	39
3.8.1 Trastornos relacionados con el aparato digestivo.....	42
3.8.2 Prevención de la diarrea causada por ciertas bacterias patógenas y virus	42
3.8.3 Diarrea. ⁽¹⁶⁾	43
3.8.4 Intolerancia y mala digestión de la lactosa. ⁽¹⁶⁾	43
3.8.5 Cáncer en colon. ⁽²⁸⁾	44
3.8.6 Estreñimiento ⁽²⁸⁾	44
3.9 Aparato digestivo humano y bacterias ácido lácticas probióticas .	45
3.9.1 Estómago humano e Intestino delgado ⁽¹⁶⁾	45

3.9.2 Adhesión de los microorganismos probióticos a epitelios	
intestinales (16)	47
3.9.3 La microflora intestinal (16).....	48
3.9.4 Proliferación de las bacterias en el intestino (16)	50
3.9.5 La colonización de bacterias en el intestino (16)	50
3.9.6 Función de la microflora en los mecanismos de defensa del	
organismo humano (16).....	51
3.9.7 Importancia de la barrera mucosa en las defensas del cuerpo.	
(16)	51
3.10 Prevención de enfermedades intestinales (24)	52
3.11 Tolerancia a la acidez (24).....	54
3.12 Tolerancia a las sales biliares (24)	54
3.13 Efectos de los probióticos en diversas patologías (24)	56
3.13.1 Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales	
(24)	56
3.14 <i>Salmonella thypimurium</i> (32).....	57
3.14.1 Microbiología (32).....	59
3.14.2 Patogenia (32)	59
3.14.3 Virulencia (32)	59
3.14.4 Descripción y significado (32).....	60
3.14.5 Patología (32).....	60
CAPITULO IV	61
4.0. DISEÑO METODOLOGICO	62
4.1 Tipo de estudio	62
4.1.1 Prospectivo: Los datos obtenidos de esta investigación se podrán	
tomar como una referencia para otros trabajos de graduación	

sobre los efectos que los <i>Lactobacillus</i> ejercen sobre las bacterias patógenas.	62
4.1.2 Experimental: Las determinaciones de la parte práctica de esta investigación fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.	62
4.1.3 Investigación Bibliográfica:	62
4.2 Parte Experimental	62
4.2.1 Elaboración de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> . (Ver anexo N° 2 y N° 3). (23), (51), (52).62	
4.2.2 Conteo de las bacterias ácidolácticas en el yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante 0, 8, 15, 22, y 30 días. (Ver anexo N° 4). (5), (10), (49).	63
4.2.3 Medición del pH en el yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los días 0, 8, 15, 22 y 30 días.(39) (Ver Anexo N° 5).....	64
4.2.4 Identificación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. (5), (6), (49). (Ver Anexo N° 6, N° 7 y N° 8).	64
4.2.5 Estandarización de la bacteria patógena <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. (44) (Ver Anexo N° 9)	65
4.2.6 Estandarización de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356. (44), (49), (52). (Ver Anexo N° 10).	66
4.2.7 Determinación de la sobrevivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (6), (15), (37), (49). (Ver Anexo N° 11 y N° 12).	66

4.2.8 Evaluación de la tolerancia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. (Ver Anexo N° 13). (1), (15), (37) (47).....	67
4.2.9 Determinación del porcentaje de células viables. (15).....	68
CAPITULO V	69
5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	70
5.1 Elaboración de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> . (23), (51), (52).	70
5.2 Conteo de las bacterias ácidolácticas en el yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante 0, 8, 15, 22, y 30 días. (5), (10), (49).....	71
Figura N°3: Recuento de bacterias ácidolácticas en yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	73
5.3 Medición del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los días 0, 8, 15, 22 y 30. (39)....	73
5.4 Identificación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. (5), (6), (49).....	80
5.5 Estandarización de la bacteria patógena <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. (44).....	82
5.6 Estandarización del <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356. (44), (49), (52).	84
5.7 Determinación de la sobrevivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y del yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> . (6), (15), (37), (49).	84
5.8 Evaluación de la tolerancia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. (1), (15), (37) (47).	101
5.9 Determinación del porcentaje de células viables. (15)	101
CAPITULO VI	104

6.0 CONCLUSIONES	105
CAPITULO VII	107
7.0 RECOMENDACIONES	108
BIBLIOGRAFIA	110
GLOSARIO (14), (39), (46)	119
ANEXOS	121

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Datos Epidemiológicos del Ministerio de Salud.
2. Procedimiento para la elaboración de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***.
3. Cálculos para ***Lactobacillus acidophilus***, preparación del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***
4. Conteo de bacterias ácidolácticas en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y en el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***.
5. Medición del pH en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** durante los días 0, 8, 15, 22 y 30 días.
6. Tinción al gram de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028.
7. Pruebas Bioquímicas para ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028.
8. Resumen de Resultados de las pruebas bioquímicas para ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028.
9. Estandarización de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028.
10. Estandarización de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356.
11. Determinación de la sobrevivencia de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***
12. Cantidad de muestras a inocular.
13. Evaluación de la tolerancia de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.
14. Preparación de Medios de Cultivos.
15. Preparación de Sales Biliares de origen bovino al 0.3%.
16. Cuadros de recolección de resultados.
17. Ficha técnica de ***Streptococcus thermophilus*** y ***Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus***.
18. Ficha técnica de ***Lactobacillus acidophilus***.
19. Cálculos Estadísticos.
20. Valores críticos de la distribución *F*.

INDICE DE CUADRO

CUADRO N°	N° Pág
1. Bacterias ácidolácticas usadas como probióticos.	36
2. Cepas de <i>Lactobacillus</i> usadas en yogurt o alimentos tipo yogurt.	36
3. Efecto benéfico de bacterias y levaduras probióticas.	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Intestino delgado y grueso humano.	46
2. Procedimiento para la elaboración de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	69
3. Recuento de bacterias ácidolácticas en yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	72
4. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	74
5. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	76
6. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	77
7. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	79
8. Resultados de la identificación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	81
9. Curva patrón de la estandarización de <i>Salmonella typhimurium</i> .	82
10. Curva de Distribución <i>F</i> .	87
11. Curva de distribución <i>F</i> para la comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL.	88
12. Comparación de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentración de 10^6 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	90
13. Comparación de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentración de 10^5 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	91
14. Comparación de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentración de 10^4 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	93
15. Comparación de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a concentración de 10^3 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	94

16. Comparación de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** vs yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en las diferentes concentraciones de inóculo patógeno en los 5 días de monitoreo. 97
17. Comparación de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** vs yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en las concentraciones de 10^3 y 10^4 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium*** durante 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo. 98

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Conteos de las bacterias ácidolácticas durante los 30 días de monitoreo.	71
2. Resultados obtenidos del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a las 4 concentraciones de <i>Salmonella typhimurium</i> evaluadas.	73
3. Resultados obtenidos del pH de yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a las 4 concentraciones de <i>Salmonella typhimurium</i> evaluadas.	73
4. Resultados obtenidos del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^6 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	74
5. Resultados obtenidos del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^5 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	75
6. Resultados obtenidos del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^4 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	77
7. Resultados obtenidos del pH de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^3 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	78
8. Resultados de las pruebas bioquímicas para <i>Salmonella typhimurium</i> .	80
9. Resultados de la tinción al Gram.	80
10. Resultados de la estandarización de <i>Salmonella typhimurium</i> .	82
11. Resumen de los conteos de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC	

14028 durante los 5 tiempos de monitoreo, en el yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	84
12. Resumen de los conteos de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 durante los 5 tiempos de monitoreo, en el yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	85
13. Análisis de varianza para el recuento de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 a concentración de 10^6 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.	88
14. Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	89
15. Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	91
16. Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	92
17. Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	94
18. Comparación de yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> versus yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> en las diferentes concentraciones y días de monitoreo.	96

ABREVIATURAS

ANOVA = Análisis de varianza

ATP = Adenosina Trifosfato

BAL= Bacterias ácido lácticas

CODEX = Códice o código

CO₂ = Dióxido de Carbono

h = Horas

H_a = Hipótesis alternativa

H₀ = Hipótesis nula

Ig = Inmunoglobulinas

NADH₂ = Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina

mm = Milímetros

MRS = Medio de cultivo De Man Rogosa Sharpe

O₂ = Oxígeno

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

pH = Potencial de hidrógeno

sp = Especie

spp = Especies

Ufc = Unidades formadoras de colonias

Ufc/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro

Ufc/g = Unidades formadoras de colonias por gramo

RESUMEN

Los probióticos constituyen una fuente fundamental de nutrientes, los cuales no son más que microorganismos vivos que se añaden a alimentos o que se presentan por su modo de elaboración en algunos productos alimenticios, tales como el yogurt, al cual se le inoculan lactobacilos para lograr el producto final, que puede ayudar a mitigar problemas como diarreas infecciosas, diarreas asociadas al consumo de antibióticos e incluso diarreas causadas por bacterias patógenas, este tipo de enfermedades gastrointestinales genera para la sociedad una creciente problemática.

El objetivo de ésta investigación fue determinar el efecto que *Lactobacillus acidophilus* con potencial probiótico ejerce sobre la bacteria patógena *Salmonella typhimurium*.

Para ello se procedió a la elaboración de dos tipos de yogures a los que se denominaron como yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*. Éstos yogures se elaboraron para realizar determinaciones de conteo de bacterias ácidolácticas y de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus*, dicho ensayo se realizó a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*, efectuando un recuento en placa para comprobar la disminución del crecimiento de la misma y utilizando el análisis de varianza de un solo factor para establecer el tipo de yogurt que presentó mejor efectividad en reducir el crecimiento de *Salmonella typhimurium*.

Se realizó, además, la evaluación de la tolerancia de *Lactobacillus acidophilus* frente a las sales biliares y al pH ácido del estómago.

Los resultados obtenidos, permitieron establecer que los dos tipos de yogurt son tan efectivos en reducir el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y mediante la comparación de los recuentos obtenidos se concluye que la diferencia entre el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y el yogurt sin

Lactobacillus acidophilus, es que el primero de ellos, inhibe el crecimiento cuando la bacteria patógena se encuentra a una concentración de 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc/mL en el día ocho de monitoreo, y la disminución del crecimiento de ***Salmonella typhimurium*** lo hace con mayor rapidez que el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***

En cuanto al conteo de las bacterias ácidolácticas se determinó que se mantuvo constante en ambos tipos de yogurt, y que para la evaluación de la tolerancia de ***Lactobacillus acidophilus*** frente a las sales biliares y al pH ácido del estómago, se estableció, que éste presenta un porcentaje de sobrevivencia a pH de 2.0 y a las sales biliares de origen bovino al 0.3% por un periodo de 2 horas de 79.4% y 80.1% respectivamente, lo cual permitió concluir que ***Lactobacillus acidophilus*** presenta la capacidad de sobrevivir a las condiciones drásticas simuladas *in vitro* del estómago.

Por lo que se recomienda que el consumo de yogurt con bacterias probióticas pueda ser incluido en la dieta de los niños desde edades tempranas para fortalecer el sistema inmune y prevenirlos que padezcan de enfermedades especialmente intestinales. Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador durante el periodo comprendido de Marzo a Noviembre del año 2013.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Los cultivos probióticos poseen gran relevancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios, se ha logrado demostrar diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal, estimulación del sistema inmune, competencia contra patógenos, disminución de la incidencia y duración de la diarrea, entre otros.⁽¹⁰⁾

En la actualidad las patologías como la diarrea infecciosa, ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados por bacterias, aquejan cada año hasta el 30% de la población, incluso en los países desarrollados ^{(9), (39)}. En El Salvador, los problemas de desnutrición, enteritis y gastroenteritis afectan a la población sobre todo a niños, manifestándose por tener bajo peso y talla.

Como consecuencia de la creciente preocupación de la sociedad al problema de las enfermedades gastrointestinales relacionadas al consumo de alimentos tratados con malas prácticas higiénicas y debido a que la población Salvadoreña desconoce el efecto que ***Lactobacillus acidophilus*** es capaz de ejercer sobre las bacterias patógenas, es necesario dar a conocer a la población los beneficios que puede aportar el consumo de alimentos que contengan bacterias ácidolácticas con potencial probiótico como ***Lactobacillus acidophilus***, por lo que en este trabajo se determinó el efecto que ***Lactobacillus acidophilus*** ejerce sobre ***Salmonella typhimurium*** y su tiempo de sobrevivencia a los ácidos biliares y pH ácido del estómago, para ello se empleó un estudio experimental que permitió la elaboración de dos tipos de yogurt los cuales se denominaron como yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***. Los dos tipos de yogurt se inocularon a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium*** y se les realizó un monitoreo cada 0, 8, 15, 22 y 30 días, en donde se verificó cuál de los dos tipos de yogurt ejercía mayor reducción en cuanto a la multiplicación de ***Salmonella***

typhimurium, asimismo se realizó el conteo de las bacterias ácidolácticas para determinar si éstas se habían mantenido constantes, y se determinó mediante un experimento *in vitro*, la tolerancia de ***Lactobacillus acidophilus*** a las sales biliares y al pH ácido del estómago.

Mediante el análisis de varianza se estableció que ambos tipos de yogurt son efectivos en reducir a ***Salmonella typhimurium*** y en lo que respecta al conteo de las bacterias ácidolácticas, se comprobó que se mantuvieron constantes, así, los recuentos obtenidos de cada tipo de yogurt se contrastaron con los valores establecidos en la Organización Panamericana de la Salud en el Código Alimentario Argentino y la Norma del Codex para leches fermentadas Codex Stand 243-2003, por otra parte en lo que respecta a los resultados de la tolerancia de ***Lactobacillus acidophilus*** frente a las sales biliares y al pH ácido del estómago se determinó que ***Lactobacillus acidophilus*** presenta un porcentaje de sobrevivencia a pH de 2.0 durante el periodo de incubación de 2 horas de 79.4% y un 80.1% frente a las sales biliares de origen bovino al 0.3%, lo que permitió establecer que ***Lactobacillus acidophilus*** cumple con dos de los requisitos importantes según la FAO/OMS para ser considerada una bacteria probiótica.

Dicha investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, durante el periodo de Marzo a Noviembre del año 2013. Con este estudio se determinó que el consumo de yogurt que contiene ***Lactobacillus acidophilus*** puede ayudar a prevenir y contrarrestar los problemas de diarrea e infecciones gastrointestinales de tipo bacteriana

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de *Lactobacillus acidophilus* con potencial probiótico sobre la bacteria patógena: *Salmonella typhimurium* y su tiempo de sobrevivencia a los ácidos biliares y pH ácido del estómago.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Elaborar un yogurt incorporado con *Lactobacillus acidophilus* y un yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.
- 2.2.2 Demostrar la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* frente a la bacteria patógena *Salmonella typhimurium* a diferentes concentraciones, tiempos de incubación y temperatura.
- 2.2.3 Establecer el tiempo de sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* frente a las sales biliares y el pH ácido del estómago.
- 2.2.4 Comparar los efectos del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* contra el yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* sobre la reducción de la bacteria patógena *Salmonella typhimurium*.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO.

3.1 Bacterias ácidolácticas ⁽³⁸⁾

Las bacterias ácido lácticas presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico, dada su presencia en multitud de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). 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 (H₂O₂) 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 ácidolácticas

3.2.1 La Familia *Lactobacillaceae* ⁽³⁸⁾

Las bacterias ácidolácticas 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 mótils, aunque también pueden serlo. Las especies mótils 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 (CO₂) 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 y en el tracto intestinal del hombre y otros animales, en alimentos y productos lácteos y en jugos vegetales fermentados. Unas pocas especies son altamente patógenas.

3.3 El género *Lactobacillus*

3.3.1 Caracteres morfológicos ⁽³⁸⁾

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 móviles, 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 homofermentativo presentan gránulos internos revelados por tinción de gram o por tinción con azul de metileno.

3.3.2 Pared celular y ultraestructura ⁽³⁸⁾

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) 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 teicoicos 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 ⁽³⁸⁾

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. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni ácido sulfídrico (H_2S). 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. La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. Los lactobacilos 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 y hasta sulfuro de hidrógeno (H_2S) y aminas en el queso.

3.3.4 Nutrición y condiciones de crecimiento ⁽³⁸⁾

Los lactobacilos 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 los lactobacilos 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 ácidolácticas (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, fue informado por Tannock ⁽⁴³⁾. 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 ácidolácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR.

3.4 Condiciones ecológicas ⁽³⁸⁾

3.4.1 pH

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4-4.5 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 y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos 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. ^{(38), (5)}

3.4.2 Necesidades de Oxígeno

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. ^{(38), (5)}

3.4.3 Temperatura de crecimiento

La mayor parte de los lactobacilos 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 lactobacilos “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 lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55°C. ^{(38), (5)}

3.4.4 Metabolismo ⁽³⁸⁾

En su metabolismo, los lactobacilos 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. ⁽⁵⁾

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, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfoacetolasas, pero no FDP aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfoacetolasas.

3.4.5 Sensibilidad a antibióticos y drogas ⁽³⁸⁾

Los lactobacilos son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de los lactobacilos intestinales ante antibióticos empleados como aditivos alimenticios. ⁽⁵⁾

La resistencia a la bilis es también una propiedad importante a tener en cuenta para la colonización del intestino por los lactobacilos y se ha estudiado principalmente en el caso de ***Lactobacillus acidophilus***. ⁽³⁸⁾

3.4.6 Patogenicidad ⁽³⁸⁾

Aparte de las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos 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 ***L. casei subsp. rhamnosus***, ***L. acidophilus***, ***L. plantarum*** y ocasionalmente ***Lactobacillus salivarius***.⁽⁵⁾ Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen.

3.4.7 Hábitat ⁽³⁸⁾

Los lactobacilos 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 flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en habitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus habitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos.⁽⁵⁾

3.5 Probióticos

El intestino grueso de las personas y animales contiene una microbiota compleja y equilibrada. Estos microorganismos previenen normalmente el desarrollo de infecciones y poseen un efecto positivo sobre la nutrición. Cualquier modificación brusca en la dieta, el estrés o la administración de antibióticos altera este equilibrio microbiano, dejando al huésped susceptible de padecer enfermedades y disminuyendo la eficiencia de la nutrición. ⁽³³⁾

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) definen la palabra probiótico como: “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”.⁽²⁸⁾ Para ello, se han establecido ciertas características que deben reunir estos microorganismos las cuales aseguran su eficiencia, eficacia y beneficio para el hospedero. Entre estas características se encuentran: No ser patógeno, ni tóxico; estabilidad al contacto con la bilis y ácido; adhesión a la mucosa intestinal. ⁽⁴⁰⁾

Según la FAO/OMS ⁽²⁸⁾ los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis. ⁽²⁸⁾ Entre los principales géneros

utilizados en la industria de alimentos como probióticos se encuentran especies de ***Lactobacillus*** y ***Bifidobacterium*** ⁽¹⁵⁾. Para proporcionar beneficios para la salud, la concentración sugerida para las bacterias probióticas es de 10^6 ufc/g de un producto. ⁽⁴⁰⁾

3.5.1 Mecanismos de acción ⁽²⁸⁾

Los mecanismos de acción de las bacterias ácidolácticas según la FAO/OMS están en discusión, pero, resumidamente se podría decir que podrían seguir una o más de las siguientes acciones:

- Actuar en función del principio de exclusión competitiva, en que una bacteria a un grupo de ellas coloniza el intestino de un paciente, con lo que evita que un patógeno pueda ocupar lo que ya está ocupado.
- Actuar estimulando el sistema inmune del paciente.
- Actuar influenciando el metabolismo intestinal, haciéndolo más eficiente.

3.5.2 Las bacterias ácidolácticas un ejemplo de probióticos ⁽¹⁶⁾

Los efectos potenciales de las bacterias probióticas son resumidos por Bengmark ⁽⁴⁾ como sigue:

- Producción de nutrientes de especial importancia para la mucosa intestinal, tales como ácidos grasos, particularmente los de cadena corta y aminoácidos como: arginina, glutamina y cisteína.
- Producción de micronutrientes, especialmente vitaminas (algunas vitaminas del complejo B), antioxidantes y aminos (histamina, 5-HT, piperidina, tiramina, cadaverina, pirrolidina, agmatina, espermidina y putrescina), muchos de los cuales son utilizadas por todo el organismo.
- Prevención del sobre crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos. Algunas de estas bacterias protectoras producen sustancias específicas con efecto antibiótico.
- Estimulación del sistema de defensa inmunointestinal, referido como sistema de tejido linfoide asociado al tracto.

- Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen. Por ejemplo, los lactobacilos producen esteroides a partir del colesterol en el colon y esto ayuda a reducir los niveles circulantes de colesterol.
- Participación en la regulación de funciones intestinales, tales como: utilización de mucus, absorción de nutrientes, motilidad gastrointestinal y flujo de sangre, lo cual ocurre a través de la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, hormonas, enzimas, poliaminas y citoquinas y óxido nitroso. Se plantea la importancia del mecanismo de exclusión competitiva, donde el previo establecimiento de los organismos beneficiosos (***Lactobacillus*** entre otros), previene la adhesión de los organismos patógenos a la superficie del tracto digestivo.

Las cepas de microorganismos probióticos que se utilizan actualmente son de una amplia variedad de especies, entre las cuales cabe señalar: ***Lactobacillus***, ***Streptococcus***, ***Bifidobacterium*** y levaduras. Estas cepas pueden ser utilizadas como mezclas o independientemente.

Cuadro N° 1. Bacterias ácidolácticas usadas como probióticos ⁽¹⁶⁾

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>S. faecium</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>S. diacetylactis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. curvatus</i>		<i>B. thermophilum</i>
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. lactis</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

3.6 Bacterias ácidolácticas aplicadas en productos comerciales ⁽¹⁶⁾

En la elaboración de productos lácteos fermentados se utilizan bacterias como lactobacilos principalmente. Este tipo de bacterias requieren de aminoácidos para su crecimiento, por lo cual para poder crecer en leche es indispensable que puedan hidrolizar la caseína. La importancia de estos microorganismos radica en que contribuyen en una gran variedad de reacciones bioquímicas que proporcionan las características organolépticas de los productos lácteos como quesos, leches ácidas y yogures.

Cuadro N° 2. Cepas de ***Lactobacillus*** usadas en yogurt o alimentos tipo yogurt ⁽¹⁶⁾

Cepa probiótica	Tipo de producto	Identificación de especie (análisis de DNA)
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Yogurt Liquido	<i>L. johnsonii</i>
<i>L. acidophilus</i> LA-7	Yogurt	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. acidophilus</i> L1	Yogurt para beber	<i>L. crispatus</i>
<i>L. acidophilus</i> LA-H3	Yogurt dietético	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. acidophilus</i>	Yogurt	<i>L. crispatus</i>
<i>L. acidophilus</i>	Yogurt	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. casei</i> Actimel	Yogurt para beber	<i>L. paracasei</i>
<i>L. casei</i> Shirota	Bebida probiótica	<i>L. paracasei</i>
<i>L. casei</i> GG	Yogurt para beber	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei</i> LC-H2	Yogurt dietético	<i>L. casei</i>
<i>L. casei</i>	Yogurt	<i>L. paracasei</i>
<i>L. casei</i>	Yogurt	<i>L. paracasei</i>

3.7 El yogurt, su valor nutricional y su importancia en la salud ⁽¹⁶⁾

El yogurt es uno de los alimentos más conocidos que contienen probióticos, de acuerdo con el Codex Alimentario el yogur es un producto lácteo coagulado resultante de la fermentación de la leche, llevada a cabo por las bacterias ***Streptococcus thermophilus*** y ***Lactobacillus delbrueckii*** subsp. ***bulgaricus***. Recientemente, ***L. acidophilus***, ***L. casei***, ***L. crispatus***,

L. rhamnosus, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *Bifidobacterium spp.*, *B. bifidum*, *B. longum* y *B. infantis* han sido adicionadas al yogurt. Con la finalidad de incrementar el número de BAL que sobreviven el bajo pH del estómago humano, han sido aisladas algunas BAL de la flora intestinal para utilizarlas en la producción de yogurt. Es requisito indispensable que al término de su elaboración el producto tenga una concentración de BAL $>10^6$ ufc/g y deben permanecer viables al término de la fecha de caducidad. La composición nutrimental del yogurt esta basada en la leche a partir de la cual se elaboró y ésta a su vez depende de varios factores: genética de los mamíferos, alimentación, etapa de lactancia, edad y factores ambientales como las estaciones del año. Posteriormente, las condiciones de tratamiento de la leche: temperatura, presión, y condiciones de almacenamiento, por mencionar algunas también afectan el valor nutricional del producto final. Una característica distintiva y final de las propiedades organolépticas del yogurt es debida a los cambios que ocurren durante la fermentación realizada por las bacterias lácticas utilizadas.

En general los productos lácteos han sido considerados una excelente fuente de proteínas de alta calidad, calcio, potasio, fósforo, magnesio, zinc y vitaminas como riboflavina, niacina, vit B₆ y B₁₂.

Durante el proceso del yogurt, ocurre una gran pérdida de vitaminas más que de minerales, esto se debe principalmente a que las vitaminas son sensibles a factores como la pasteurización, la ultrafiltración, agitación y las condiciones de oxidación. Las BAL pueden influir en el contenido de vitaminas del yogurt, ya que requieren vitaminas del grupo B como la B₁₂ para su crecimiento, pero algunas cepas son capaces de sintetizar esta vitamina.

La lactosa es el disacárido más importante que se encuentra en los productos lácteos. Antes de la absorción, la lactosa es hidrolizada por la enzima β -galactosidasa (lactasa) en glucosa y galactosa, estos monosacáridos son absorbidos y utilizados como fuente de energía. El contenido de lactosa en el yogurt antes de la fermentación es aproximadamente 6%, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus*

thermophilus son capaces de hidrolizar del 20 al 30% del contenido de lactosa posteriormente, una parte es absorbida en forma de glucosa y galactosa y el resto de la glucosa se convierte en ácido láctico. Al final el producto tiene un bajo contenido de lactosa, lo cual explica porque este tipo de alimento es tolerado por personas que padecen intolerancia a la lactosa.

El yogurt tiene un contenido de proteína alto comparado con la leche, debido a la adición de leche descremada y la concentración del producto al final del proceso.⁽¹⁶⁾ Algunos autores Shahani y Chandan ⁽¹²⁾ mencionan que la proteína del yogurt es digerida más fácilmente respecto a la de la leche porque esta predigerida por las bacterias. Esto puede ser soportado por la evidencia de un alto contenido de aminoácidos libres, principalmente prolina y glicina en el yogurt. Por otra parte, la actividad de enzimas proteasas y peptidasas es preservada durante el tiempo de vida del producto, lo que implica que durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración continúan incrementando la concentración de aminoácidos en el producto.

El yogurt tiene una alta concentración de ácido linoleico conjugado, Whigham *et al.* ⁽⁵⁰⁾ reportaron que este ácido tiene propiedades inmunoestimuladoras y anticarcinogénicas. El yogurt es una fuente de calcio y fósforo, como el pH del yogurt es más bajo que el de la leche, los minerales calcio y magnesio están disponibles en sus formas iónicas y por lo tanto se facilita la absorción del ión en el intestino.

3.8 Efecto de los probióticos en el organismo humano ⁽¹⁶⁾

Debido al ritmo de vida acelerado en la población principalmente en las grandes ciudades, factores como el estrés, una dieta desequilibrada, la administración frecuente de antibióticos o la presencia de agentes infecciosos tales como ***E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*** y virus⁽⁴¹⁾, la incidencia de enfermedades ha ido en aumento; entre las más comunes están las infecciones del tracto gastrointestinal, estreñimiento, síndrome de colon irritable, colitis, alergias causadas por

alimentos, diarrea ocasionada por ciertos antibióticos, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (cáncer en colon).

Estos desordenes se han tratado de remediar suministrando antibióticos, incluso se han empleado agentes vivos denominados bioterapéuticos como la levadura ***Saccharomyces sp.***, y bacterias probióticas como ***Lactobacillus sp.*** ⁽³⁰⁾.

Actualmente, se sabe que los principales microorganismos que tienen efecto probiótico son los lactobacilos y las bifidobacterias, además, se han incluido especies que pertenecen a los géneros ***Lactococcus***, ***Enterococcus***, ***Saccharomyces***, ***Propionibacterium*** y ***Streptococcus thermophilus***. ⁽¹⁶⁾

La viabilidad de los probióticos puede ser considerada como una medida de su actividad probiótica, sin embargo, hay eventos en los cuales la viabilidad celular no se requiere para llevar a cabo algunas funciones de actividad probiótica, tales como mejorar la digestión de la lactosa, modular el sistema inmune y cierto efecto contra hipertensión. En este sentido, los efectos positivos de las BAL probióticas en la salud humana han sido ligados a células no viables o componentes celulares, productos de actividad enzimática o fermentación

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir ciertas características como las siguientes: ⁽¹⁶⁾

- Ser de origen humano.
- Ejercer su efecto benéfico en el huésped.
- No ser patógeno.
- No ser tóxico.
- Sobrevivir y metabolizar en el intestino humano.
- Permanecer viable durante el almacenamiento en refrigeración.
- Proporcionar propiedades sensoriales a los productos fermentados.
- Tener capacidad de adhesión en el epitelio intestinal y
- Producir sustancias antimicrobianas.

Algunos de los efectos benéficos de los probióticos son: ⁽¹⁶⁾

- Reducción de la severidad y duración de diarrea
- Reducción de la intolerancia a la lactosa
- Disminución de la concentración de colesterol en sangre
- Protección contra microorganismos patógenos
- Remediación del estreñimiento
- Estimulación del sistema inmune

En el Cuadro N°3, se presentan algunos microorganismos probióticos y levaduras con efectos probados clínicamente.

Cuadro N° 3. Efecto benéfico de bacterias y levaduras probióticas. ⁽¹⁶⁾

Cepa	Efecto reportado en estudios clínicos
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LC1	Mejora el sistema inmune, se adhiere a células intestinales humanas y ayuda en el equilibrio de la microflora intestinal.
<i>L. acidophilus</i> NCF01748	Disminuye la presencia de enzimas fecales, previene la diarrea causada por radioterapia, usado en tratamiento de estreñimiento.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Trata y previene el rotavirus de diarrea, previene la diarrea aguda, efecto antagónico contra bacterias cancerígenas.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Previene problemas intestinales, reduce enzimas fecales, inhibe el cáncer de vejiga, contribuye en el balance de la microflora intestinal.
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Reduce enzimas fecales, sobrevive en el tracto digestivos,
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Tratamiento del rotavirus de diarrea, contribuye en el balance de la microflora intestinal, auxiliar en el tratamiento de diarrea viral.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Previene diarrea ocasionada por <i>C. difficile</i> .

3.8.1 Trastornos relacionados con el aparato digestivo

3.8.2 Prevención de la diarrea causada por ciertas bacterias patógenas y virus

La diarrea infecciosa es un importante problema mundial de salud, que causa varios millones de muertes cada año. Aunque la mayoría de las muertes se producen entre niños de países en desarrollo, se estima que la diarrea transmitida por los alimentos afecta cada año hasta el 30 por ciento de la población, incluso en los países desarrollados (Ver Anexo N° 1). Los probióticos pueden constituir un medio importante para reducir estos problemas. ^{(26), (28)}

Muchas especies de bacterias son causa de muerte y enfermedad en seres humanos. Hay pruebas sólidas *in vitro* de que ciertas cepas probióticas pueden inhibir el crecimiento y adhesión de una serie de enteropatógenos y estudios en animales han indicado efectos beneficiosos contra patógenos como **Salmonella**. Hay datos tomados de estudios sobre la diarrea de los viajeros, en los que se ha supuesto que algunos de los patógenos causantes son de naturaleza bacteriana, que indican que la administración de probióticos puede ser beneficiosa. ⁽²⁸⁾

Es importante señalar que la terapia probiótica de la diarrea aguda debe combinarse con la rehidratación, siempre que esté disponible. La OMS recomienda que el tratamiento clínico de la diarrea aguda incluya la reposición de los líquidos y electrolitos perdidos junto con un apoyo nutricional. Las sales de rehidratación oral (SRO) se han utilizado ampliamente en ese tratamiento de la enfermedad, y es en ese contexto en el que se propugna la terapia combinada con probióticos. Efectos tales como el restablecimiento probiótico de la microflora intestinal dominada por no patógenos que es un efecto secundario de la infección, el mantenimiento de la integridad de la mucosa y la mejora del equilibrio de electrolitos podrían tener consecuencias significativas en los programas de tratamiento y prevención de la diarrea aguda en los países en desarrollo. ⁽²⁸⁾

Por lo que respecta a la diarrea relacionada con antibióticos, los probióticos han resultado útiles como régimen profiláctico, y podrían utilizarse también para aliviar los signos y síntomas una vez que se ha producido una diarrea inducida por antibióticos. Los antibióticos son agentes antimicrobianos altamente eficaces en el tratamiento y erradicación de las infecciones bacterianas, sin embargo su efectividad se ha visto reducida debido a que las bacterias son microorganismos adaptables y capaces de desarrollar mecanismos de resistencia. ⁽¹⁵⁾

3.8.3 Diarrea. ⁽¹⁶⁾

A principios del siglo XX, se pensaba que las bacterias utilizadas para hacer yogurt tenían beneficios en la prevención y tratamiento de la diarrea. Se ha utilizado una combinación de lactobacilos y bifidobacterias como bacterioterapia para contrarrestar diarrea infantil causada por ***E. coli***, ***Salmonella*** y ***Shigella***. Bifidobacterias y lactobacilos solos y en combinación han sido adicionados en alimentos para infantes y se han tenido buenos resultados. Estudios realizados ⁽⁴⁸⁾, demostraron que el uso de cepas de ***Lactobacillus*** es una alternativa efectiva y segura en el tratamiento de infecciones agudas y diarrea en niños, ya que pueden reducir la frecuencia y la duración de la diarrea. El mecanismo por el cual las BAL pueden contribuir en el tratamiento contra diarrea es desconocido, sin embargo, se sugiere que las BAL tienen la capacidad de reestablecer la microflora intestinal y así incrementar la barrera intestinal y competir contra los microorganismos patógenos por los sitios de adhesión en la mucosa intestinal humana.

3.8.4 Intolerancia y mala digestión de la lactosa. ⁽¹⁶⁾

En el borde en cepillo en el intestino hay 2 enzimas disacaridasas: la lactasa, que hidroliza a la lactosa y la trehalasa que hidroliza la trehalosa en 2 moléculas de glucosa. La insuficiencia de una o más de las oligosacaridasas en el borde en cepillo (en el intestino) puede producir diarrea, distensión y

flatulencia después de la ingestión de azúcar. La diarrea es ocasionada por el incremento en la cantidad de moléculas oligosacáridas osmóticamente activas, que permanecen en el lumen intestinal y generan incremento del volumen del contenido intestinal. Cuando hay bajas concentraciones de lactasa se origina intolerancia a la leche, conocida como intolerancia a la lactosa. Más de la mitad de los adultos en el mundo sufren de este padecimiento. La mala digestión de la lactosa es otro padecimiento, en el cual la lactosa permanece en el lumen intestinal y llega al colon en donde es fermentada por la flora colonica. Los bioproductos de esta fermentación son ácidos de cadena corta (lactato, butirato, acetato y propionato), además metano, hidrogeno y dióxido de carbono. Estos ácidos se asocian con los electrolitos y conducen a una carga osmótica que puede ocasionar diarrea. La mala digestión de la lactosa ocasiona inflamación, dolor abdominal, diarrea y flatulencia después de la ingesta de leche. Sin embargo, muchas personas pueden ser intolerantes a la lactosa pero soportan pequeñas cantidades de lactosa en el alimento.

3.8.5 Cáncer en colon. ⁽²⁸⁾

Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. Esto se desprende del conocimiento de que los elementos que constituyen la microflora intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas. Por consiguiente, la administración de lactobacilos y bífidobacterias podría teóricamente modificar la flora, dando lugar a una reducción de los niveles de β -glucuronidasa y sustancias carcinógenas.

3.8.6 Estreñimiento ⁽²⁸⁾

La capacidad de la terapia probiótica para aliviar el estreñimiento (dificultad para expulsar las heces, dureza excesiva de las heces, tránsito lento por el intestino) es discutible, pero puede que sea una característica de algunas

cepas seleccionadas. Se recomiendan firmemente estudios aleatorios de la eficacia controlados con placebo para estudiar esos efectos.

3.9 Aparato digestivo humano y bacterias ácido lácticas probióticas

3.9.1 Estómago humano e Intestino delgado ⁽¹⁶⁾

El alimento en el estómago se mezcla con ácido clorhídrico, moco y pepsina, después es liberado a una velocidad controlada hacia el duodeno. La mucosa gástrica contiene muchas glándulas profundas, que secretan moco. Las células de las glándulas gástricas secretan jugo gástrico, el cual contiene diversas sustancias como enzimas (pepsina y lipasa), iones (sodio, cloro, magnesio, hidronio, potasio) y moco. La función del ácido clorhídrico es eliminar muchas de las bacterias ingeridas, ayudar en la digestión proteínica, proporcionar el pH necesario para activar la pepsina (principal enzima del jugo gástrico), además de estimular la salida de la bilis y del jugo pancreático. En personas normales la mucosa gástrica no se irrita o digiere, debido a la presencia del moco contenido en el jugo gástrico. El moco esta constituido por glucoproteínas denominadas mucinas, cada mucina tiene cuatro subunidades unidas por puentes disulfuro; el moco forma un gel filante que cubre la mucosa. El estómago presenta valores de pH de 1 a 2, que favorecen el inicio de la digestión de los alimentos en el estómago, además en este intervalo de pH se estimula la secreción de bilis hepática al duodeno, en esta región el pH es >6.5 . El alimento en el estómago es mezclado y molido gracias al movimiento peristáltico el cual puede durar hasta 10 segundos y presentarse de 3 a 4 veces por minuto. La secreción de la pepsina y del ácido clorhídrico, se atribuye a la influencia cefálica (respuestas mediadas por el vago e inducidas por la actividad en el sistema nervioso central), gástrica (respuestas reflejas locales y la gastrina) e intestinal (reflejos y efectos de la retroalimentación hormonal sobre la secreción gástrica iniciados a partir de la mucosa del intestino delgado). Sin embargo, también existen factores externos como la ingesta de alcohol y cafeína, que actúan directamente sobre la mucosa estimulando la secreción

gástrica. Antes de llegar al intestino las bacterias probióticas deben sobrevivir el paso por el estómago, en este sitio la presencia del ácido gástrico representa un primer mecanismo de defensa contra muchos microorganismos ingeridos. Las bacterias probióticas que habitan en el estómago se encuentran en concentración reducida, debido al ambiente ácido, situación que puede afectar la viabilidad de las bacterias probióticas y por ende su efecto benéfico en el colon humano. En el estómago principalmente se encuentran microorganismos anaerobios facultativos como lactobacilos y estreptococos, también existen levaduras en una concentración de 100 ufc/mL aproximadamente.

El proceso digestivo inicia en la boca y en el estómago, se completa en el lumen y en las células de la mucosa del intestino delgado. En el intestino delgado los contenidos procedentes del estómago se mezclan con las secreciones de las células de la mucosa, con el jugo pancreático y la bilis hepática. De tal manera que en el intestino delgado se lleva a cabo la absorción de los productos de la digestión y de las vitaminas y los líquidos.

La primera sección del intestino delgado se denomina duodeno, en la primera porción del duodeno hay un ambiente agresivo, debido a que los contenidos del estómago son vaciados en este sitio a través del píloro. La segunda sección del intestino delgado se conoce como yeyuno y comprende aproximadamente el 40% del total de este órgano, finalmente, la tercera sección es el íleon y comprende el 60% del intestino delgado. (Ver Figura N°1).

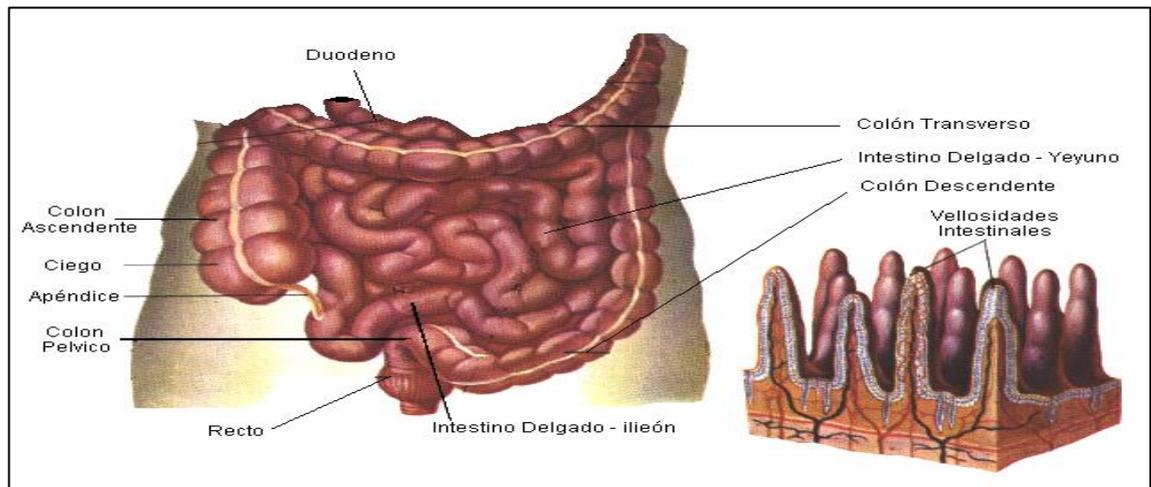


Figura N° 1. Intestino delgado y grueso humano. ⁽¹⁶⁾

El jugo pancreático tiene como componentes los iones sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, sulfato; enzimas como tripsina y enteropeptidasa y proteínas en un 95%, tiene un pH aproximado de 8.0. En conjunto la bilis, el jugo pancreático y los jugos intestinales neutralizan el ácido gástrico, el pH del contenido duodenal es de 6.0 a 7.0, siendo neutro cuando el quimo llega al yeyuno.

En el intestino delgado se encuentra un gran número de bacterias, formado por anaerobios facultativos como lactobacilos, estreptococos y enterobacterias; anaerobios como *Bifidobacterium sp.*, *Bacteroides sp.* y clostridios en una concentración de 10^4 a 10^8 ufc/mL. ⁽¹⁶⁾

Los ácidos biliares procedentes de la bilis tienen efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, y *Enterococcus sp.* Cuando se encuentran estos ácidos en forma desconjugada, el efecto es más inhibitorio para bacterias gram positivas.

3.9.2 Adhesión de los microorganismos probióticos a epitelios intestinales ⁽¹⁶⁾

La habilidad de adherirse a la mucosa intestinal es uno de los criterios de selección más importantes para la determinación de microorganismos

utilizados como potenciales probióticos debido a que es un pre requisito para poder colonizar el intestino. Esto previene la inmediata eliminación por los movimientos peristálticos y también provee una ventaja competitiva en este ecosistema intestinal. Sin la adhesión a la mucosa intestinal, la concentración de probióticos sería muy baja, por tanto el efecto benéfico de los probióticos sería insignificante. La adhesión bacteriana es inicialmente basada en interacciones físicas no específicas entre dos superficies, lo cual permite luego interacciones específicas entre las adhesinas (usualmente proteínas) y receptores complementarios. La auto-agregación de las cepas probióticas parece ser necesaria para que se dé la adhesión a células epiteliales del intestino. La adhesión de los probióticos a células intestinales es también considerada muy importante en la estimulación del sistema inmune. La adhesión a las células M o a las Placas de Peyer pueden, así, ser un importante determinante de la estimulación del sistema inmune por parte de los microorganismos probióticos.

3.9.3 La microflora intestinal ⁽¹⁶⁾

La microflora en el cuerpo humano adulto esta formada por una enorme biomasa de más de 100 000 billones de bacterias que incluyen más de 400 especies diferentes con gran actividad metabólica en el colon y que juegan un importante rol fisiológico en el huésped.

La población bacteriana en el estómago es baja debido al pH ácido en este sitio, ya que los ácidos destruyen casi todas las bacterias que pasan por este lugar. Como consecuencia solo un número limitado de bacterias vivas llegan al duodeno, en donde el pH del ambiente es casi neutro y en este sitio las bacterias son atacadas por las sales biliares y las secreciones pancreáticas, factores que reducen aún más el número de bacterias vivas que llegan al colon.

Difícilmente las bacterias pueden incrementarse en número en el intestino delgado, ya que el tiempo de tránsito es reducido. En general en las personas sanas el tiempo de tránsito de la boca al intestino grueso va de 4 a

6 h. En cambio en el intestino grueso las bacterias si pueden incrementarse en número, puesto que el tiempo de tránsito de este sitio hasta llegar al recto son de 54 a 56 h, de tal manera que las bacterias pueden llegar a niveles de 10^{11} a 10^{12} ufc/g. La población esta formada principalmente de bacterias residentes ($>10^9$ ufc/g) que forman parte de la flora y bacterias transitanes ($<10^6$ ufc/g) las cuales pueden variar dependiendo del número de bacterias ingeridas en los alimentos.

Algunos autores ⁽¹⁶⁾ han estudiado la asociación de los lactobacilos con el tracto gastrointestinal humano y encontraron que los lactobacilos homofermentativos (producen ácido láctico a partir de glucosa) son típicos del organismo humano, entre ellos se encuentran ***L. acidophilus***, ***L. gassieri***, ***L. crispatus***, ***L. Johnsonii***, ***L. paracasei*** y ***L. rhamnosus***. También, encontraron algunos lactobacilos heterofermentativos (producen ácido láctico, CO₂ y algunos ácidos orgánicos como fórmico y acético) como ***L. reuteri*** y en menor grado ***L. fermentum***, ***L. oris*** y ***L. vaginalis***.

Los lactobacilos son componentes de la flora microbiana no patógena de los intestinos delgado y grueso (colon), su capacidad para asociarse al tejido del epitelio intestinal es una importante característica que previene del daño causado por patógenos en la mucosa gastrointestinal.

Algunos autores ⁽¹⁶⁾ mencionan que las BAL probióticas deben de adaptarse al ambiente intestinal del huésped y ser capaces de prolongar su sobrevivencia en el tracto gastrointestinal. Otro factor importante que limita la sobrevivencia de las BAL en el tracto gastrointestinal es la habilidad de los microorganismos para adherirse a las células epiteliales del intestino ⁽¹⁶⁾. Lu y Walter ⁽¹⁶⁾, establecen que ***Salmonella enterica typhimurium*** es una bacteria que puede adherirse a las microvellosidades; ***Escherichia coli*** tiene la capacidad de secretar un receptor dentro de la superficie microvellosa y ***Shigella flexneri*** puede utilizar células epiteliales foliculares que son conductos fisiológicos de los antígenos para llegar al tejido linfoide, estos son los 3 patógenos más representativos que pueden afectar la mucosa.

3.9.4 Proliferación de las bacterias en el intestino ⁽¹⁶⁾

En el colon, las bacterias tienen acceso a los nutrientes que requieren para proliferar. Los cuales incluyen a todos aquellos alimentos que no fueron absorbidos en el intestino como las fibras y los azúcares no digeribles (prebióticos), materia del intestino como mucosa y células muertas, así como metabolitos producidos a partir de la actividad enzimática sobre carbohidratos entre los que están los ácidos grasos de cadena corta como ácido acético, propiónico y butírico. Estos ácidos ejercen un efecto en el metabolismo colónico, en la regulación hepática de azúcares y lípidos y proveen de energía a las células. Otros efectos benéficos son la hidrólisis de proteínas y la producción de vitaminas, sin embargo, la proliferación de bacterias patógenas puede conducir a la producción de sustancias carcinogénicas y metabolitos tóxicos, así como la inactivación de ciertos medicamentos.

3.9.5 La colonización de bacterias en el intestino ⁽¹⁶⁾

El intestino del infante es prácticamente estéril al nacer, sin embargo, se coloniza muy rápido siendo la primera fuente de colonización la leche materna, después la flora del medio ambiente. Durante el primer día del nacido el intestino se coloniza con *E. coli* y *Enterococcus sp.*, esto sucede si la alimentación esta basada en la leche materna, aparecen primero anaerobios como *Bifidobacterium sp.* junto con algunos *Bacteroides sp.* Cuando la alimentación es a base de fórmula láctea, el intestino primero se coloniza con *Bacteroides sp.* y después con algunas *Bifidobacterium sp.* Para llevar a cabo la colonización en el intestino las bacterias deben entrar en contacto con el tejido del huésped. Existe una capa de mucosa producida por células que cubre la superficie de todas las membranas mucosas del cuerpo humano, la cual es secretada por las células superficiales del epitelio en la totalidad de la vía gastrointestinal; por las glándulas de Brunner en el duodeno y por las células caliciformes en los intestinos delgado y grueso. La mucosa intestinal actúa como un medio de protección, lubricación y

transporte entre los contenidos lumbinales y la barrera epitelial, además de proteger el tracto gastrointestinal de daños mecánicos, invasión por patógenos, digestión enzimática y agentes carcinógenos.

3.9.6 Función de la microflora en los mecanismos de defensa del organismo humano ⁽¹⁶⁾

Una de las características importantes de la microflora intestinal es que debe ser resistente a la colonización por bacterias patógenas y no patógenas que llegan del exterior. Para llevar a cabo esta función existen diferentes mecanismos:

- Competir por el mismo sustrato.
- Competir por sitios receptores de adhesión de mucinas.
- Producir un medio ambiente fisiológicamente restrictivo (ej. producción de metabolitos como las bacteriocinas que actúan contra bacterias gram negativas).
- Producir moléculas que codifiquen para genes de sobrevivencia.

3.9.7 Importancia de la barrera mucosa en las defensas del cuerpo. ⁽¹⁶⁾

La mucosa intestinal es el mayor sitio de interacción con sustancias extrañas y microorganismos del ambiente externo. Una gran variedad de poblaciones bacterianas, incluyendo microorganismos potencialmente patógenos y sus productos y una marcada concentración de toxinas endógenas y exógenas constantemente modifican la estructura y función de la superficie de la mucosa, particularmente en el colon. La barrera mucosa es una compleja estructura fisicoquímica que separa el tejido del ambiente luminal. La barrera consiste de componentes celulares del endotelio vascular a las células epiteliales y la capa de la mucosa, un gel formado por la interacción de varias secreciones mucosas, incluyendo glicoproteínas de mucinas, péptidos y fosfolípidos tensoactivos.

Otro importante mecanismos de defensa de la barrera mucosa son las defensinas que son péptidos microbianos endógenos y son secretados en el lumen por las células de Paneth. Estas células confieren resistencia innata a factores del medio ambiente y microorganismos patógenos. A su vez, están presentes en gran cantidad en el intestino delgado y se encuentran en promedio de 5 a 15 células en las bases de las criptas intestinales. Las células de Paneth contienen lisozimas, fosfolipasa-A2, DNAsas y tripsina.

Los antígenos suministrados en forma oral interactúan con el tejido linfoide, el cual no solo involucra la protección del huésped de patógenos pero además previenen al huésped de la reacción ante alguna proteína ingerida. Las proteínas administradas oralmente algunas veces inducen respuestas sistémicas conocidas como tolerancia oral e inducir respuesta inmune. La respuesta inmune mediada por la producción de células IgA y la secreción IgA, constituye aproximadamente el 80% del total de los anticuerpos producidos en la mucosa asociada a tejido. Estos antígenos inhiben la adherencia microbiana y además previenen la absorción de antígenos.

Muchos autores han demostrado la importancia de las BAL contenidas en alimentos fermentados y preparaciones probióticas, en la salud humana y animal. Algunas BAL pueden proteger contra patógenos y tumores, ya que tienen la capacidad de incrementar la respuesta inmune.

Autores como Hanne Cristensen ⁽²¹⁾, mencionan que las bacterias probióticas ejercen su influencia en el sistema inmune por su capacidad para modular la expresión de citocinas (moléculas similares a las hormonas que regulan respuestas inmunológicas).

3.10 Prevención de enfermedades intestinales ⁽²⁴⁾

Mediante estudios se ha comprobado que animales criados en un ambiente libre de bacterias son altamente susceptibles a infecciones, por lo que la microbiota es considerada un importante constituyente de la barrera de defensa de las mucosas. Los probióticos tienen un efecto antagónico frente

al crecimiento de patógenos, como por ejemplo ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella typhimurium***, ***Clostridium perfringens***, entre otros. Las bacterias probióticas aumentan la resistencia contra patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Mediante la colonización competitiva, los probióticos inhiben la adhesión de patógenos gastrointestinales a la mucosa intestinal. La producción de ácidos orgánicos disminuye el pH intestinal, inhibiendo el desarrollo y colonización de patógenos o bacterias no deseadas, y la producción de elementos tóxicos derivados del metabolismo (amonio, fenol, aminas, etc.). Dichos ácidos orgánicos aumentan los movimientos peristálticos, removiendo indirectamente los patógenos ya que aumenta el tiempo de tránsito por el intestino. A su vez, numerosas bacteriocinas muestran acción antagónica contra los patógenos.

Un balance entre los grupos microbianos presentes en el intestino humano es crucial para mantener la salud, por ello se puede llegar a un estado de enfermedad cuando dicho balance bacteriano se ve perturbado.

Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) se adaptan muy bien a las condiciones gastrointestinales, en especial aquellos microorganismos considerados como probióticos. Estos microorganismos poseen características que los hacen posibles de ser seleccionados como complementos en la dieta humana y animal: capacidad para tolerar los ácidos gástricos, capacidad para tolerar la bilis en el intestino, adherencia a la superficie epitelial, actividad antagonista contra patógenos y capacidad de colonizar temporalmente el intestino. Luego de la ingesta, las bacterias probióticas se enfrentan a dichas barreras biológicas hostiles. La necesidad de una buena tolerancia a la acidez estomacal por parte de los potenciales probióticos es requerida para un exitoso pasaje por el estómago; es frecuentemente evaluado por medio de su habilidad de sobrevivir a bajos pHs por 3 horas (tiempo promedio de pasaje por el estómago).⁽²⁴⁾

Además, para que sobrevivan al pasaje por el duodeno hasta llegar al sitio de acción en el intestino, los potenciales probióticos deben mostrar una

tolerancia considerable a la secreción de bilis; esto se evalúa generalmente *in vitro*, haciendo crecer las cepas en un medio que contiene sales biliares.

3.11 Tolerancia a la acidez ⁽²⁴⁾

A pesar de las diferencias existentes entre cepas y especies, los microorganismos generalmente muestran una gran sensibilidad a valores de pH por debajo de 3, por lo tanto, la tolerancia a la acidez es considerada como una de las principales propiedades utilizadas para seleccionar bacterias potenciales como probióticos. Antes de alcanzar el tracto intestinal, las bacterias probióticas primero deben sobrevivir al tránsito por el estómago, donde la secreción de ácido gástrico constituye un primer mecanismo de defensa contra microorganismos ingeridos.

La tolerancia a la acidez de ***Lactobacillus*** es atribuida por la presencia de un gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático. Los microorganismos gram positivos utilizan un mecanismo conocido como F1-F0 ATPasa como protección en condiciones de acidez. La F1-F0 ATPasa es una subunidad enzimática múltiple, conteniendo una porción catalítica (F1), incorporando subunidades para la hidrólisis de ATP; y una porción integral de membrana (F0) que incluye subunidades que funcionan como canales de membrana para la translocación de protones.

3.12 Tolerancia a las sales biliares ⁽²⁴⁾

La bilis es una solución acuosa de color amarillo verdoso, sintetizada en el hígado y secretada en la porción superior del duodeno por el ducto biliar. El mayor constituyente orgánico de la bilis son las sales biliares y, en menor cantidad, el colesterol, fosfolípidos, y el pigmento biliverdina. Las sales biliares son sintetizadas a partir del colesterol en el hígado, y son almacenadas como aminoácidos conjugados en la vesícula biliar.

Las sales biliares son muy tóxicas, por lo que su síntesis y catabolismo deben ser regulados de manera estricta. En condiciones fisiológicas, el 70% de los ácidos biliares en el humano están compuestos por ácido cólico, 30%

por ácido quenodesoxicólico y otros ácidos biliares secundarios que producen las bacterias al pasar por el intestino. A partir del ácido cólico, se deriva el ácido desoxicólico y del quenodesoxicólico el ácido litocólico. Este último se conjuga con glicina o taurina, productos que no se reabsorben de forma eficiente y nunca constituyen más del 5% de las sales biliares en forma normal.

Por otro lado, el ácido ursodesoxicólico se considera un isómero del ácido quenodesoxicólico. Una vez sintetizados ambos ácidos, se conjugan con glicina o taurina, mejorando la solubilidad. Dichos ácidos conjugados se encuentran como sales aniónicas a pH fisiológico, llamándose sales biliares. La concentración de las sales biliares en el intestino delgado está en el rango de 0,2% - 2.0% (p/v), dependiendo del tipo y cantidad de alimento ingerido. La formación de bilis se considera un proceso vital, ya que durante la digestión, la bilis es secretada en el intestino, jugando un rol muy importante en la emulsificación y absorción de grasas y en la transformación en productos más solubles de sustancias que serán eliminadas. Además, la bilis muestra una fuerte actividad antimicrobiana induciendo disgregación de la membrana lipídica y también causando estrés oxidativo en el ADN. Por lo tanto, la tolerancia a las sales biliares en concentración fisiológica es crucial para la colonización del intestino por las bacterias probióticas. Las sales biliares no conjugadas no actúan de la misma forma que las sales biliares conjugadas en la solubilización y absorción de lípidos. Muy poco se sabe sobre el mecanismo de respuesta y de tolerancia a la bilis por las bacterias ácido lácticas; se cree que varias proteínas de membrana están involucradas en el mecanismo de resistencia. Científicos han sugerido que enzimas responsables de la no conjugación de las sales biliares sean parte de dicho mecanismo, aumentando moderadamente la resistencia a la bilis, disminuyendo la potente toxicidad de las sales biliares conjugadas. La tolerancia a la bilis es considerada una característica muy importante en probióticos, que les permite sobrevivir, crecer y realizar sus actividades en el intestino delgado.

3.13 Efectos de los probióticos en diversas patologías ⁽²⁴⁾

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.

3.13.1 Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales ⁽²⁴⁾

-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.

-Efecto del probiótico sobre la diarrea aguda ⁽²⁴⁾

- 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.

-Diarrea asociada a antibióticos

El uso de antibióticos puede producir diarrea, al alterar el equilibrio de la flora intestinal con descenso de los Lactobacilos y Bifidobacterias, que son los responsables de la resistencia a la colonización por patógenos, produciéndose infecciones por microorganismos oportunistas como:

-Clostridium difficile.

-Klepsiella oxytoca.

-S. aureus.

-Candida sp.

-Salmonella sp.

- Diarrea del viajero

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**.

-Enfermedad inflamatoria intestinal

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.

3.14 Salmonella thypimurium ⁽³²⁾

Salmonella entérica subgrupo **entérica** serotipo **typhimurium** (también llamada **Salmonella typhimurium**). El nombre entérica está asociado al

intestino. La salmonela es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia **Enterobacteriaceae**. La causa más común del envenenamiento de comida por especies de Salmonella es la **S. typhimurium**. Como su nombre sugiere, esta bacteria causa enfermedades parecidas a la fiebre tifoidea en ratones.

En humanos, **S. typhimurium** no causa una enfermedad tan severa como la **S. typhi** (otra variación de **Salmonella** que causa la fiebre tifoidea) y normalmente no es fatal. La enfermedad se caracteriza por causar diarreas, dolores abdominales, vómitos y náuseas, y suele durar unos siete días.

Desafortunadamente, en personas cuyo sistema inmune esté comprometido, como es el caso de las personas de edad, jóvenes y personas con el sistema inmune deprimido, la infección por la salmonella termina siendo fatal si no se trata a tiempo con antibióticos.

La salmonelosis (gastroenteritis por **Salmonella**) es causada por más de 2000 serovariedades de **Salmonella** (serovariedad; una categoría de subespecie). **S typhimurium** es la serovariedad que con más frecuencia afecta al hombre. Es un bacilo Gram negativo, móvil, no esporulado.

La fuente inicial de la bacteria es el tracto intestinal de aves y otros animales. Los seres humanos adquieren la bacteria a través de alimentos contaminados como carne de vaca, aves de corral, huevos y sus derivados, o el agua.

Una vez en el cuerpo, el periodo de incubación de la bacteria es sólo de 8 a 48 horas. La enfermedad se produce como consecuencia de una verdadera infección transmitida por alimentos, puesto que las bacterias se multiplican e invaden la mucosa intestinal, donde producen una enterotoxina y citotoxina que destruyen las células epiteliales. Los síntomas más llamativos son dolor abdominal, espasmos, diarrea, náuseas, vómitos y fiebre, que suelen persistir de 2 a 5 días pero que pueden durar varias semanas. Durante la fase aguda de la enfermedad se pueden encontrar hasta mil millones de salmonelas por gramo de heces. La mayoría de los adultos se recuperan, pero la pérdida de líquidos puede causar problemas en niños y ancianos.

El diagnóstico de laboratorio se realiza aislando la bacteria del alimento o de las heces de los pacientes. El tratamiento se realiza con reposición de líquidos y electrolitos. La prevención depende de prácticas correctas de manipulación de alimentos, refrigeración y cocinado adecuados. ⁽³³⁾

3.14.1 Microbiología ⁽³²⁾

Salmonella crece con facilidad en agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología clínica se aísla con medios selectivos, Selenito, Hektoen, SS o XLD para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprófita.

3.14.2 Patogenia ⁽³²⁾

Produce salmonelosis con un período de incubación de entre 5 horas y 5 días, diarrea y dolor abdominal. A través de las heces (excremento) del enfermo se elimina un gran número de esta bacteria y se observa fiebre entérica con un periodo de incubación de 7 a 28 días, causante de dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y diarrea, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas y las personas curadas eliminan **Salmonella**. También puede ocasionar fiebres entéricas o infección intestinal por intoxicación con algunos alimentos.

3.14.3 Virulencia ⁽³²⁾

Salmonella, al igual que otras bacterias Gram negativas, usa un sistema secretor especializado (denominado tipo III) para inyectar dentro de células eucariotas ciertas proteínas efectoras que manipulan las vías de señalización celular y de la bacteria. Se ha observado la entrega de la proteína *Sip-A* a células que debilitan la maquinaria intracelular del huésped y promueven la virulencia en mamíferos en aproximadamente en 10 minutos, dejando la bacteria virtualmente desprovista de *Sip A*, efectivamente estableciendo un nicho para la multiplicación intracelular de la bacteria.

3.14.4 Descripción y significado ⁽³²⁾

Salmonella typhimurium es una bacteria patógena Gram-negativas que se encuentra predominantemente en la luz intestinal. Su toxicidad es debida a una membrana externa que consiste en gran parte de los lipopolisacáridos (LPS) que protegen a las bacterias desde el entorno. El LPS está compuesto de un antígeno-O, un núcleo de polisacárido, y un lípido, el cual se conecta a la membrana externa. El lípido A está compuesto de dos glucosaminas fosforiladas que están unidas a ácidos grasos. Estos grupos fosfato determinan la toxicidad bacteriana.

3.14.5 Patología ⁽³²⁾

Salmonella typhimurium causa gastroenteritis en humanos y otros mamíferos. Cuando las células bacterianas entran en las células epiteliales que recubren el intestino provocan ondulamiento de la célula huésped que temporalmente daña las microvellosidades de la superficie de la célula. Esto provoca una oleada de células blancas de la sangre en la mucosa, que arroja las proporciones entre la absorción y la secreción, y conduce a la diarrea. En los ratones ***S. typhimurium*** produce síntomas parecidos a la fiebre tifoidea.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

4.1.1 Prospectivo: Los datos obtenidos de esta investigación se podrán tomar como una referencia para otros trabajos de graduación sobre los efectos que los *Lactobacillus* ejercen sobre las bacterias patógenas.

4.1.2 Experimental: Las determinaciones de la parte práctica de esta investigación fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.1.3 Investigación Bibliográfica:

Se realizó en las diferentes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- De las ingenierías de la Universidad de El Salvador.
- Química y Farmacia, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Internet.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Elaboración de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*. (Ver anexo N° 2 y N° 3). (23), (51), (52).

La elaboración del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* se realizó utilizando ingredientes naturales y de

calidad microbiológica comprobada para asegurar que el yogurt que se preparó se encontraba libre de microorganismos que pudieran afectar el estudio que se realizó. Para la preparación del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** se utilizaron 4 litros de leche de vaca fresca para cada tipo de yogurt. La leche para ambos tipos de yogures se incorporó en recipientes idóneos y se procedió a calentarla a temperatura de 55°C y se le agregó 200 g de leche en polvo y 200g de azúcar para cada tipo de yogurt, se mezcló con agitación mecánica para disolver los grumos y posteriormente se pausterizó a temperatura de 85°C por aproximadamente 1-2 minutos. En seguida los recipientes con leche se colocaron en un baño de agua fría y se disminuyó la temperatura a 43°C, en ese momento se le adicionó 2.0g de polvo de ***Streptococcus thermophilus*** y ***Lactobacillus bulgaricus*** a concentración de 10^6 ufc/g a cada uno de los dos tipos de yogurt. Posteriormente para obtener una concentración de 10^6 ufc/g de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 se pesó 1.0 g de éste y se adicionó a 99.0mL de leche de vaca fresca, se tomó una alícuota de 2.67mL y se añadió únicamente a la leche para preparar el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** (Ver cálculos en Anexo N° 3); inmediatamente la mezcla obtenida de los dos recipiente se incubó a temperatura entre 40-45°C durante 6-7 horas para obtener la fermentación completa de la leche. Después del proceso de la fermentación se obtuvo un cuajo parecido al del queso, que se fragmentó con agitación suave, los dos tipos de yogurt obtenidos se almacenaron en refrigeración a temperatura de 4°C.

4.2.2 Conteo de las bacterias ácidolácticas en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** durante 0, 8, 15, 22, y 30 días. (Ver anexo N° 4).^{(5), (10), (49).}

El conteo periódico de las bacterias ácidolácticas se realizó mediante el método de recuento en placa, para el cual se efectuaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril, inoculando 1.0mL de las últimas 3 diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de petri previamente identificadas y luego se adicionó

20.0 mL de agar MRS (para conteo de *Lactobacillus*), posteriormente se incubaron las placas a una temperatura de 37°C por 48-72 horas, en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂ y se efectuó el conteo de dichas bacterias ácidolácticas en los dos tipos de yogures, durante los días de monitoreo 0, 8, 15, 22 y 30 días, esto se realizó con el objetivo de constatar si el número de bacterias ácidolácticas en ambos tipos de yogures se había mantenido constante a lo largo de los 30 días del análisis.

4.2.3 Medición del pH en el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los días 0, 8, 15, 22 y 30 días.⁽³⁹⁾ (Ver Anexo N° 5)

Durante cada día de monitoreo se determinó el pH de las muestras inoculadas con la bacteria patógena para comprobar si esta medición se había mantenido constante a lo largo de los 30 días del análisis.

Para determinar el pH se utilizó un pH-metro Crison GLP 22, cuyo procedimiento se detalla a continuación:

- Se calibró el pH-metro (con compensación automática de temperatura utilizando una sonda CAT) con buffer pH 7.0 y luego con buffer pH 4.0.
- Se agitaron las muestras para obtener una mezcla homogénea y se procedió a medir el pH sumergiendo el electrodo directamente en cada muestra.
- Se lavó el electrodo con agua destilada y se procedió a realizar la siguiente toma de pH.

4.2.4 Identificación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.^{(5), (6), (49)} (Ver Anexo N° 6, N° 7 y N° 8).

Se partió de la *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y se procedió a identificarla mediante un frotis bacteriano por tinción al gram y se observó al microscopio, posteriormente se efectuaron las pruebas bioquímicas para asegurar que el microorganismo con que se trabajó era *Salmonella*.

4.2.5 Estandarización de la bacteria patógena *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ⁽⁴⁴⁾ (Ver Anexo N° 9)

La estandarización de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de Estandarización del Inóculo presentada en el manual de Procedimiento Bauer Kirby y su Control de Calidad ⁽⁴⁴⁾, lo cual se realizó por el método espectrofotométrico, en el que se realizó la siembra de la bacteria patógena en agar TSA y después de la incubación a 37°C por 24 horas se preparó una suspensión madre a partir de las colonias aisladas. De la suspensión madre se procedió a colocar en tubos de ensayo con solución salina estéril 100µL de la suspensión madre, y posteriormente a tomar la transmitancia de dicha solución teniendo como blanco la solución salina estéril, después de haber leído en el espectrofotómetro la transmitancia inicial de la solución preparada, se procedió a adicionar más cantidad de solución madre hasta llegar a leer en el espectrofotómetro un % de transmitancia de 75.2%, 82.2% y 95%, estas 3 lecturas se tomaron como parámetro para poder conocer la concentración a la que se encontraba cada una de las 3 soluciones. De las 3 soluciones se realizaron 5 diluciones seriadas en solución salina estéril y se sembraron las últimas 3 diluciones en agar Plate count y después del periodo de incubación a 37°C por 24 horas se procedió al conteo de las bacterias esperando obtener un conteo equivalente a 10⁶ufc/mL. De los conteos realizados se obtuvo que al 82.2%T se tiene un equivalente de 10⁶ufc/mL. Por lo tanto para el día de inoculación de las muestras de los dos tipos de yogurt se volvió a realizar el mismo procedimiento pero en este caso solamente se estandarizó a 82.2%T que equivale a una concentración de 10⁶ufc/mL de la bacteria patógena.

4.2.6 Estandarización de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356. ^{(44), (49), (52)}.
(Ver Anexo N° 10).

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 se hizo crecer en caldo MRS a 37°C por 48 horas en atmósfera anaeróbica al 5% de CO₂, para esto se pesó 1.0g del polvo de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 equivalente a 1.50×10^{11} ufc/g y se inoculó en 10.0mL de caldo MRS, después del periodo de incubación se realizaron diluciones en solución salina estéril para obtener una concentración de 10^6 ufc/mL, dicha concentración se estandarizó en el espectrofotómetro a 580nm y 25%T. Una vez realizada la estandarización se efectuaron 5 diluciones seriadas en agua peptonada estéril y se inoculó 1.0mL de las últimas 3 diluciones (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) en cada una de dos placas de petri, luego se les agregó 20.0mL de agar MRS. Las placas se incubaron en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂ por 48-72 horas y posteriormente se realizó el recuento de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356.

4.2.7 Determinación de la sobrevivencia de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** ^{(6), (15), (37), (49)}. (Ver Anexo N° 11 y N° 12).

A partir de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 estandarizada a la concentración de 10^6 ufc/mL se realizaron diluciones seriadas con solución salina estéril para obtener las concentraciones de inóculo patógeno de 10^5 , 10^4 y 10^3 ; Se tomó 1.0 mL de cada una de las concentraciones de bacteria patógena (10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL) y se adicionó a cada una de las muestras de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** (Ver Anexo N°12) dichas muestras se incubaron a 4°C y se les realizó un monitoreo durante los días 0, 8, 15, 22 y 30. Durante cada día de monitoreo se efectuaron diluciones seriada para cada una de las muestras inoculadas con bacteria patógena, para esto se tomó

1.0mL de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y 1.0mL de yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* y se inocularon respectivamente en 9.0mL de agua peptonada estéril; De las últimas dos diluciones realizadas se inoculó 1.0mL en cada una de dos placas de petri y luego se agregó 20mL de agar XLD, las placas se homogenizarón en forma de ocho, se dejaron solidificar y se incubaron a 37°C por 24 horas a continuación se realizó el conteo bacteriano para determinar la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* a los 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo.

4.2.8 Evaluación de la tolerancia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. (Ver Anexo N° 13). ⁽¹⁾, ⁽¹⁵⁾, ⁽³⁷⁾ ⁽⁴⁷⁾.

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 se evaluó de acuerdo a la técnica descrita por Vallejo et al ⁽⁴⁷⁾ en combinación con la técnica descrita por Cueto-Vigil et al ⁽¹⁵⁾ y Rodríguez I, ⁽³⁷⁾ en caldo MRS ajustado a pH de 2.0 y en caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%. Se prepararon 30 mL de caldo MRS, (Ver Anexo N° 14, Figura N° 31) y se repartió en cantidades de 10mL (Sistema A y Sistema B), luego se ajustó el pH del sistema "A" a pH de 2.0 con HCL 3M y NAOH 3M, posteriormente se esterilizaron los 2 sistemas en el autoclave a 121°C x 15min a 15lbs de presión, consecutivamente se prepararon las sales biliares de origen bovino al 0.3 % ⁽¹⁾, ⁽³⁷⁾ (Ver anexo N° 15). Después de la esterilización se le adicionó 0.3mL o 300µL de sales biliares al sistema "B".

Se transfirió 1.0mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 estandarizado a concentración de 10^6 ufc/mL (Ver Anexo N° 10) a 10.0mL de caldo MRS ajustado a pH de 2.0 y se incubó a 37°C x 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂, después de la incubación se inoculó cada una de dos placas de petri con 1.0mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecido en caldo MRS a pH de 2.0 y se adicionó 20mL de agar MRS, las

placas fueron incubadas a 37°C por 48-72 horas en condiciones de microaerofilia al 5% de CO₂.

Posteriormente se adicionó 1.0mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 estandarizado a concentración de 10⁶ufc/mL a 10.0mL de caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%, éste se incubó a 37°C x 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂, después de la incubación se inoculó a cada una de dos placas de petri 1.0mL de la cepa probiótica crecida en caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3% y se adicionó 20mL de agar MRS, luego se incubaron las placas de petri en condiciones de microaerofilia en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂ a 37° C por 48-72 horas.

4.2.9 Determinación del porcentaje de células viables. ⁽¹⁵⁾

El conteo de células viables se realizó por el método de conteo en placa en agar MRS. Determinando el número de unidades formadoras de colonias, el porcentaje de supervivencia fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

Porcentaje de sobrevivencia

$$\% = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100$$

Donde N_1 representa el total de unidades formadoras de colonias obtenidas de los recuentos después de las 24-48 horas de incubación en agar MRS.

N_0 representa el número inicial de BAL inoculadas. ⁽¹⁵⁾

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Elaboración de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.^{(23), (51), (52).}

La elaboración del yogurt incorporado con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 fue uno de los puntos que permitió hacer posible el resto de determinaciones de dicha investigación; el haber obtenido un yogurt con buenas características organolépticas sirvió para comprobar que es factible que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sea incluido en la elaboración de yogures y por consiguiente en la dieta diaria de quienes los consumen.

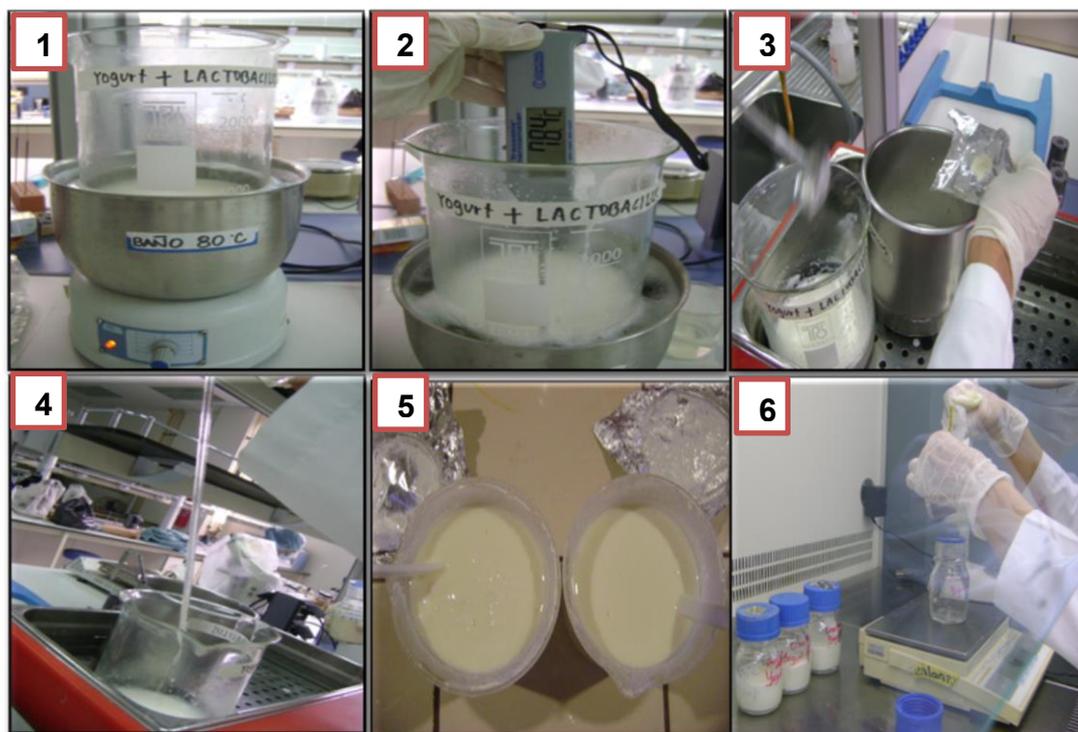


Figura N° 2: Procedimiento para la elaboración de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.^{(23), (51), (52).}

La preparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* se realizó según la metodología del numeral 4.2.1, como se muestra en la Figura N° 2, en donde se observa la manera

artesanal que se empleó para la preparación de los dos tipos de yogurt. El resultado de la fermentación de la leche después de 7 horas de incubación a 43°C fue la formación de una mezcla viscosa, de carácter homogéneo, semifluida y sin aspecto grumoso, además no se le observó sinéresis, y presentó un olor característico a yogurt ^{(27), (35)}, así también el pH inicial que se obtuvo para el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** fue de 4.45, mientras que para el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** fue de 4.48, lo cual indica que ambos presentaron un pH que se encuentra dentro del rango normal según lo establecido en la NMX-F-444-1983. Alimentos, yogurt o leche búlgara ⁽¹⁸⁾, que determina que el pH debe ser menor de 4.50 para yogures semisólidos.

5.2 Conteo de las bacterias ácidolácticas en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** durante 0, 8, 15, 22, y 30 días. ^{(5), (10), (49)}.

El conteo de las bacterias ácidolácticas en los dos tipos de yogurt se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 4.2.2, en donde se especifica que se realizó un recuento de dichas bacterias durante los días de monitoreo 0, 8, 15, 22, y 30 días, con el objetivo de determinar si el número de bacterias ácidolácticas se mantuvo constante durante los 30 días del análisis. En la tabla N° 1 se muestran los resultados obtenidos para yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***, los datos obtenidos reflejan que en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***, el número de bacterias ácidolácticas se mantuvo en una concentración exponencial de 10^6 ufc/g, tal y como lo especifica la Organización Panamericana de la Salud en el Código Alimentario Argentino ⁽¹³⁾ que la carga de células viables debe estar comprendida entre 10^6 y 10^9 ufc/g y como se establece en la Norma del Codex para leches fermentadas Codex Stand 243-2003 ⁽²⁷⁾ que determina que para el yogurt a base de cultivos alternativos, debe presentar como mínimo un conteo de 10^6 ufc/g; Por otra parte para el

yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** la concentración fue menor en el factor exponencial, pero se mantuvo constante en el factor de 10^5 ufc/g.

En la Figura N° 3 se puede observar la tendencia que el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** presentaron en los 5 tiempos de monitoreo, la gráfica para el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** es constante durante los días 0, 8, 15 y 22, y se observa una tendencia decreciente hasta el día 30; en el caso del yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** la tendencia es similar, difiere únicamente en el día 22 y 30, donde se puede observar una disminución de los conteos de las bacterias ácidolácticas. Por lo cual se considera que las condiciones de almacenamiento de 4°C son bastante factibles para que las bacterias ácidolácticas se mantengan viables durante los 30 días de vida útil del yogurt, esto se considera de mucha importancia ya que para asegurar que el yogurt actuará de manera eficaz al contrarrestar los microorganismos patógenos, debe contener una concentración de bacterias ácidolácticas constante durante todo el periodo de vida útil.

Tabla N° 1. Conteos de las bacterias ácidolácticas durante los 30 días de monitoreo.

Tiempo/Días	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)
0	1.70E+06*	1.50E+05
8	1.70E+06	1.50E+05
15	1.70E+06	1.50E+05
22	1.70E+06	1.20E+05
30	1.60E+06	1.00E+05

* 1.70E+06 es equivalente a decir 1.70×10^6 ufc/g.

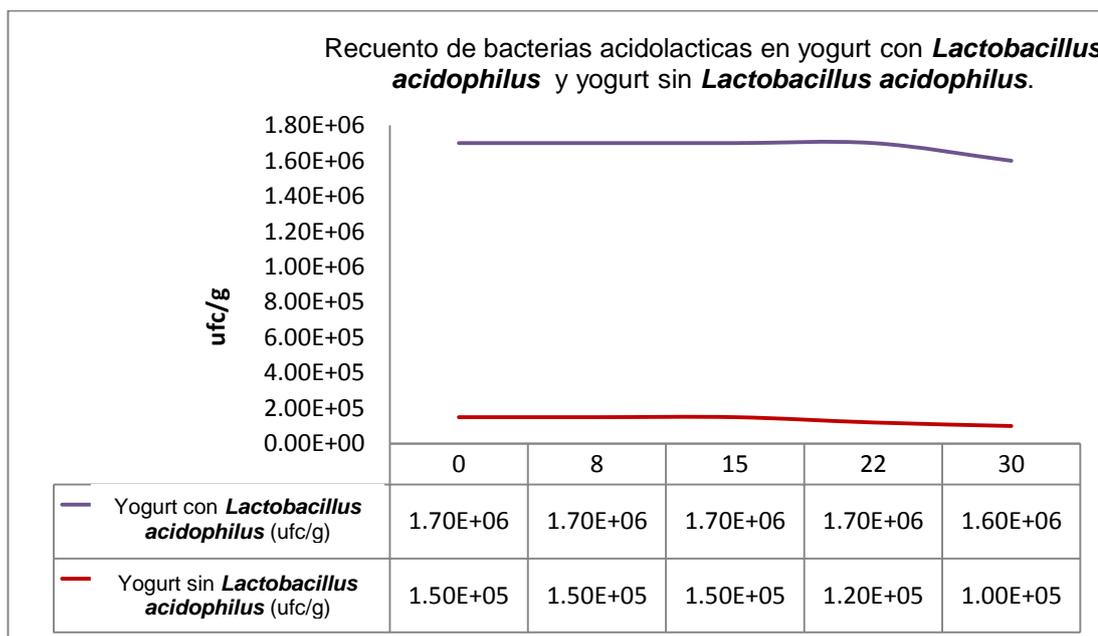


Figura N°3: Recuento de bacterias ácidolácticas en yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.

5.3 Medición del pH de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los días 0, 8, 15, 22 y 30. ⁽³⁹⁾

La medición del pH tanto del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* como del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los 5 días de monitoreo se ven reflejados en la Tabla N° 2 y N° 3 en donde se muestran datos significativos, ya que se demuestra que el pH de ambos tipos de yogurt se mantuvo dentro del parámetro de 4.40 a 4.48 durante los 30 días del análisis, lo cual es significativo porque refleja, que las condiciones de almacenamiento a 4°C son factibles para mantener la acidez de éste alimento en parámetros normales, asimismo de mencionar que dicha acidez está relacionada con la estabilidad del producto y por consiguiente con el número de bacterias ácidolácticas viables

Tabla N° 2: Resultados obtenidos del pH de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* durante los 5 días de monitoreo a las 4 concentraciones de *Salmonella typhimurium* evaluadas.

pH (Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>)				
Tiempo/Días	10 ⁶ ufc/mL	10 ⁵ ufc/mL	10 ⁴ ufc/mL	10 ³ ufc/mL
0	4.45	4.45	4.45	4.45
8	4.44	4.44	4.44	4.45
15	4.42	4.43	4.44	4.45
22	4.42	4.42	4.42	4.45
30	4.4	4.4	4.4	4.43

Tabla N° 3: Resultados obtenidos del pH de yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los 5 días de monitoreo a las 4 concentraciones de *Salmonella typhimurium* evaluadas.

pH (Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>)				
Tiempo/Días	10 ⁶ ufc/mL	10 ⁵ ufc/mL	10 ⁴ ufc/mL	10 ³ ufc/mL
0	4.48	4.48	4.48	4.48
8	4.47	4.44	4.45	4.43
15	4.44	4.44	4.44	4.43
22	4.42	4.42	4.44	4.42
30	4.4	4.4	4.43	4.4

Los valores de pH reflejados en la Tabla N° 2 y N° 3 demuestran que las bacterias ácidolácticas presentes en ambos tipos de yogurt son capaces de fermentar los carbohidratos para su buen desarrollo, pues al fermentarlos dan lugar a la formación de ácido láctico que disminuye el pH del medio donde se encuentran ⁽³⁷⁾. Los rangos de pH obtenidos en las diferentes concentraciones de inóculo patógeno demuestran que el pH se mantuvo en el intervalo de 4.40-4.45 para el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y de 4.40-4.48 para el yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, lo cual es un dato que se encuentra dentro del rango que establece la norma mexicana NMX-F-444-1983. Alimentos, yogurt o leche búlgara ⁽¹⁸⁾, que determina que el pH debe ser menor de 4.50 para yogures semisólidos.

-Comparación del pH en ambos tipos de yogurt durante los 5 días de monitoreo

Tabla N° 4: Resultados obtenidos del pH de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^6 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

10 ⁶ ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .		
Tiempo/Días	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
0	4.45	4.48
8	4.44	4.47
15	4.42	4.44
22	4.42	4.42
30	4.40	4.40

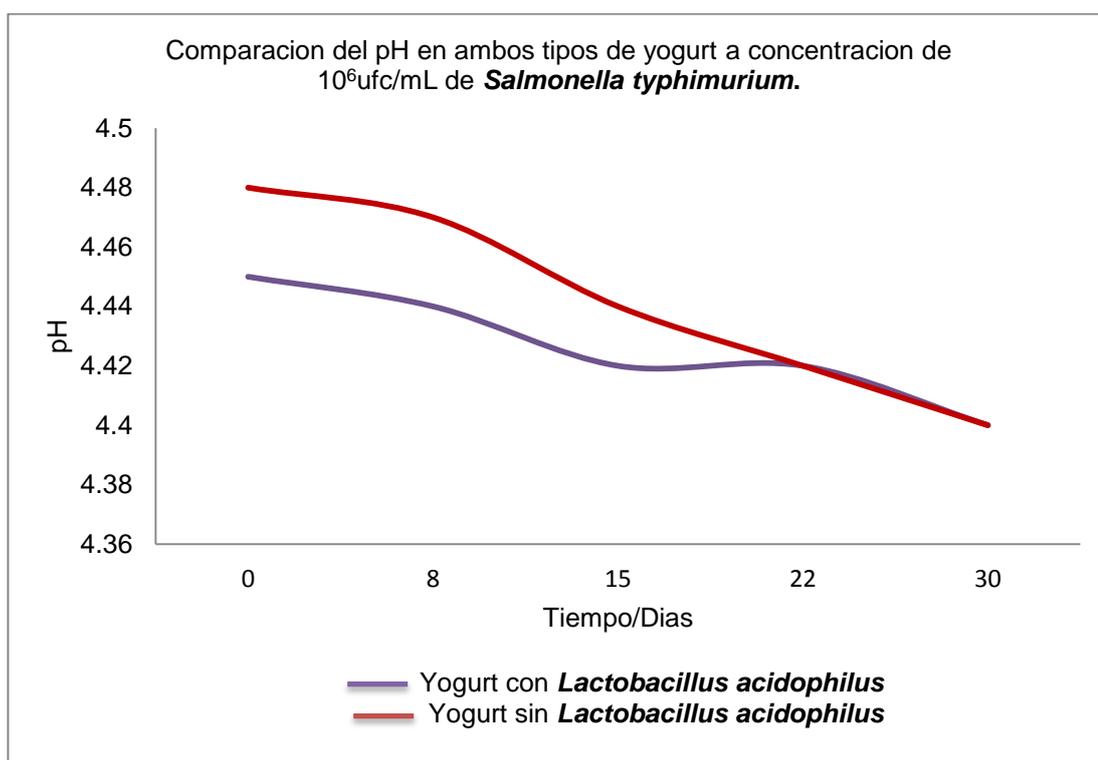


Figura N° 4: Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

En el gráfico anterior se puede evidenciar la tendencia de ambos tipos de yogurt inoculados con ***Salmonella typhimurium*** en concentración de 10^6 ufc/mL en el transcurso de los 30 días del análisis, la tendencia que ambos presentan es casi similar, ya que se puede evidenciar que a lo largo del tiempo el pH va disminuyendo, presentando una tendencia decreciente, esto se debe a que las bacterias ácidolácticas mediante la fermentación de los carbohidratos tienden a dar lugar a la formación de ácido láctico y de otros compuestos volátiles que tienden a disminuir el pH del yogurt.⁽³⁸⁾ Según Samaniego Fernández⁽³⁸⁾ los ***Lactobacillus*** son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor de 4.0, mediante la formación de ácido láctico, de esta manera evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, excepto el de las otras bacterias ácido lácticas y el de las levaduras.⁽³⁸⁾

Tabla N° 5: Resultados obtenidos del pH de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^5 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

10 ⁵ ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .		
Tiempo/Días	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
0	4.45	4.48
8	4.44	4.44
15	4.43	4.44
22	4.42	4.42
30	4.40	4.40

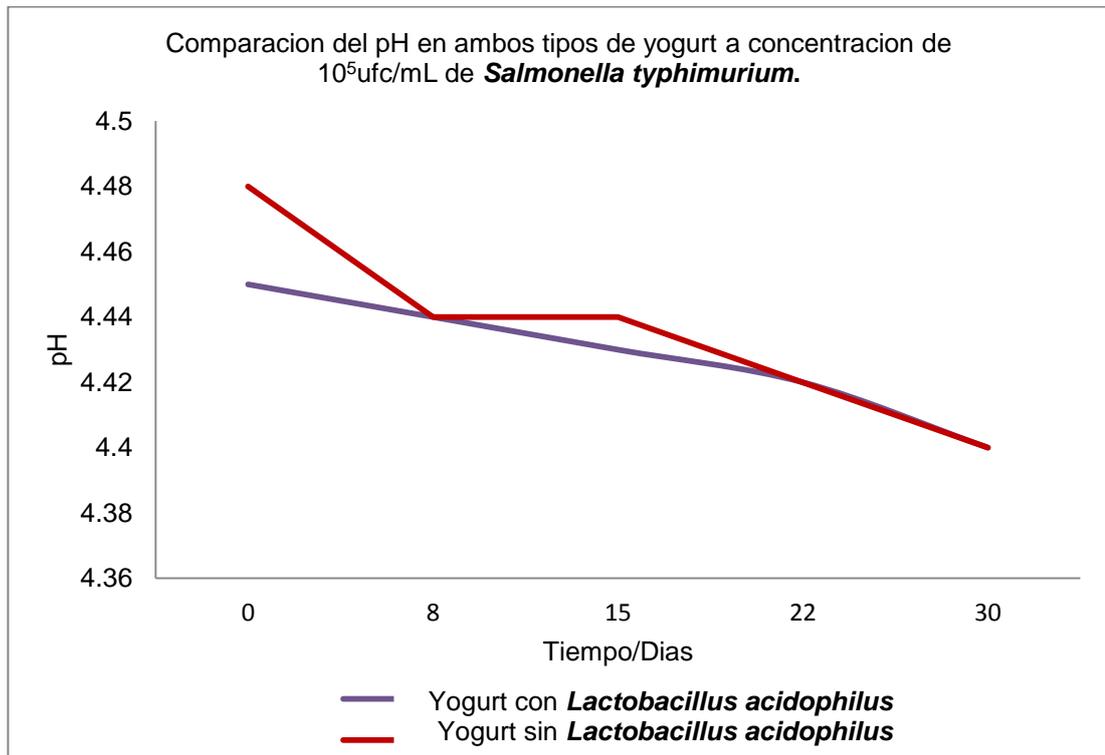


Figura N° 5: Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

En el caso del yogurt con *Lactobacillus acidophilus*, que fue inoculado con bacteria patógena a la concentración de 10^5 ufc/mL se observa que para la tendencia del pH es decreciente a lo largo de los 30 días del análisis, por otra parte en el caso del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, la tendencia también es decreciente pero con mayor lentitud que lo que refleja el yogurt con *Lactobacillus acidophilus*, lo cual, como ya se mencionó con anterioridad se debe a que en el caso del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* por tener una bacteria probiótica adicional, existe mayor producción de ácido láctico que hace que el pH del medio sea más ácido y por lo tanto con mayor capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos competidores.

Tabla N° 6: Resultados obtenidos del pH de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

10 ⁴ ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .		
Tiempo/Días	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
0	4.45	4.48
8	4.44	4.45
15	4.44	4.44
22	4.42	4.44
30	4.40	4.43

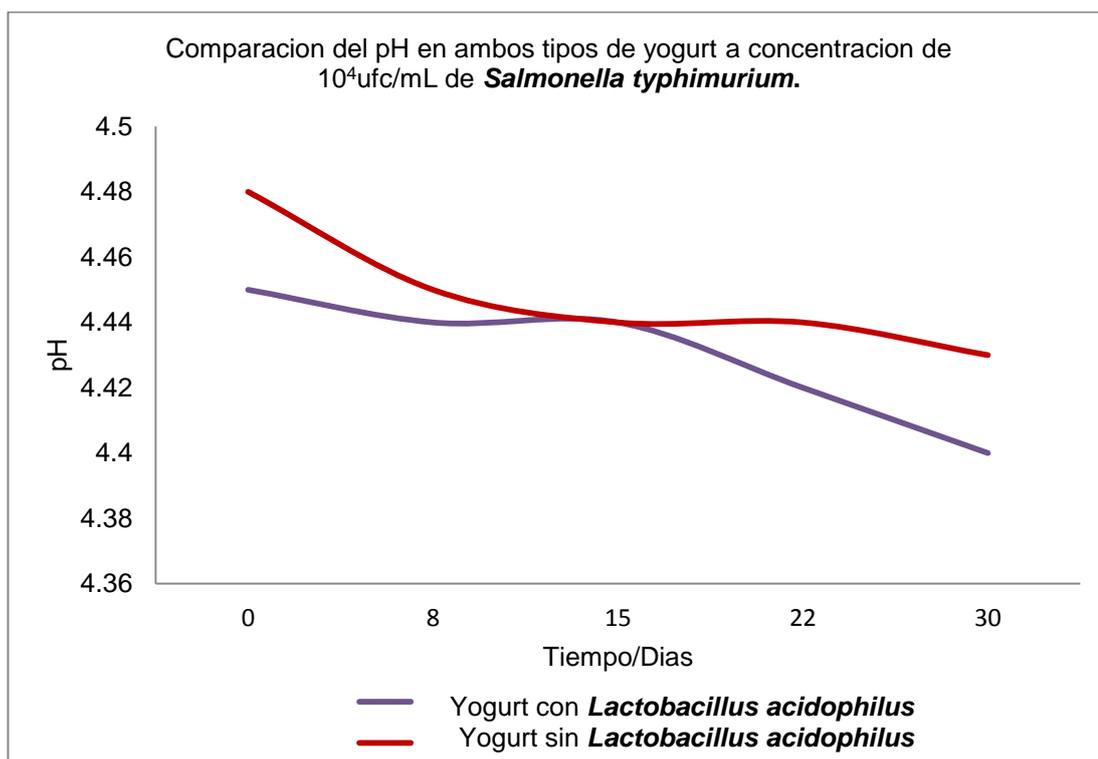


Figura N° 6: Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

Los datos obtenidos para los dos tipos de yogurt inoculados con bacteria patógena en concentración de 10^4 ufc/mL, se ven expresados en la Tabla N° 6, los resultados reflejan que al día 15 de monitoreo se obtiene un valor de

pH igual en ambos tipos de yogurt el cual es de 4.44, esto se puede ver evidenciado en la Figura N° 6 en donde se constata un punto unánime en los dos tipos de yogurt. Por otra parte si se observa el valor obtenido en ambos tipos de yogurt en el día 22, se puede apreciar que para el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***, existe una disminución del pH a 4.42 y que para el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** el pH se mantiene en 4.44, esto puede deberse, a que existe una fase estacionaria en donde la producción de ácido láctico empieza a ser menor por la poca cantidad de carbohidratos que existen disponibles para su fermentación, lo que hace que el valor del pH se mantenga igual durante un periodo de tiempo, por otra parte cabe la posibilidad de que el dato obtenido en alguna de las lecturas del pH no fue tomado adecuadamente, o que la homogenización del producto no fue lo suficiente como para obtener un valor real.

Tabla N° 7: Resultados obtenidos del pH de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** durante los 5 días de monitoreo a concentración de 10^3 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

10 ³ ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .		
Tiempo/Días	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
0	4.45	4.48
8	4.45	4.43
15	4.45	4.43
22	4.45	4.42
30	4.43	4.40

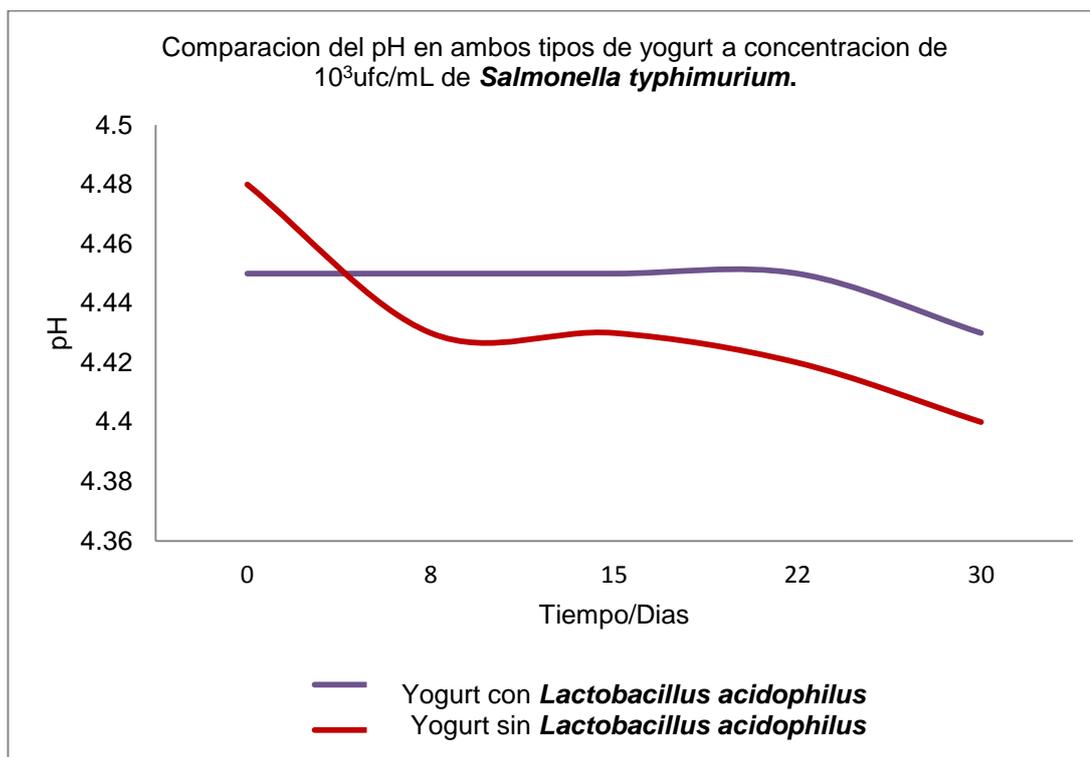


Figura N° 7: Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

Los datos del pH de los dos tipos de yogurt inoculado con bacteria patógena en concentración de 10^3 ufc/mL, se ven reflejados en la Tabla N° 7 en donde se puede evidenciar que en el yogurt con *Lactobacillus acidophilus*, los datos de los días 0, 8, 15 y 22 días son de 4.45 lo cual demuestran una repetitividad, pero que en el día 30 se observa una disminución a 4.43. En el caso del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, los datos de los días 8 y 15 son repetitivos, pero siempre tiene una tendencia a la disminución, por lo que se puede decir que para el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* existe un posible error en la calibración o en la toma de la lectura del pH.

5.4 Identificación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ^{(5), (6), (49)}.

Los resultados de la identificación de *Salmonella typhimurium* se especifican en la Tabla N° 8, en donde se hace constar que efectivamente se trabajó con dicha bacteria patógena, ya que se demuestra que las

pruebas bioquímicas coinciden con los descritos en la literatura, por otra parte al realizar la tinción al gram no solo se constató que se trabajó con una bacteria Gram negativa sino que también se verificó que la bacteria no se encontraba contaminada por microorganismos del ambiente. En la Figura N° 8 se observa el crecimiento efectivo que *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 presentó al sembrarla en agar XLD, con esto se pudo verificar que el medio donde se efectuarían las determinaciones posteriores, la bacteria tendría un crecimiento idóneo y efectivo.

Tabla N° 8: Resultados de las pruebas bioquímicas para *Salmonella typhimurium*.^{(5), (6), (49)}.

Prueba	Resultado Esperado	Resultado Obtenido	Observación
Rojo de Metilo	(+)	(+)	Formación de anillo rojo
Voges Proskauer	(-)	(-)	Coloración amarilla.
Indol	(-)	(-)	Coloración amarilla.
Movilidad	(+)	(+)	Crecimiento en todo el tubo.
Citrato	(+)	(+)	Coloración azul
TSI	K/A GAS (+ ó -)	K/A-Gas (+)	Coloración negra con producción de gas

Tabla N° 9: Resultados de la tinción al Gram.^{(5), (6)}.

Tipo de tinción.	Gram
Descripción de la Morfología microscópica observada.	Bacilos cortos y ovalados de color rosa tenue
Tipo de Bacteria según la tinción.	Bacteria Gram (-)

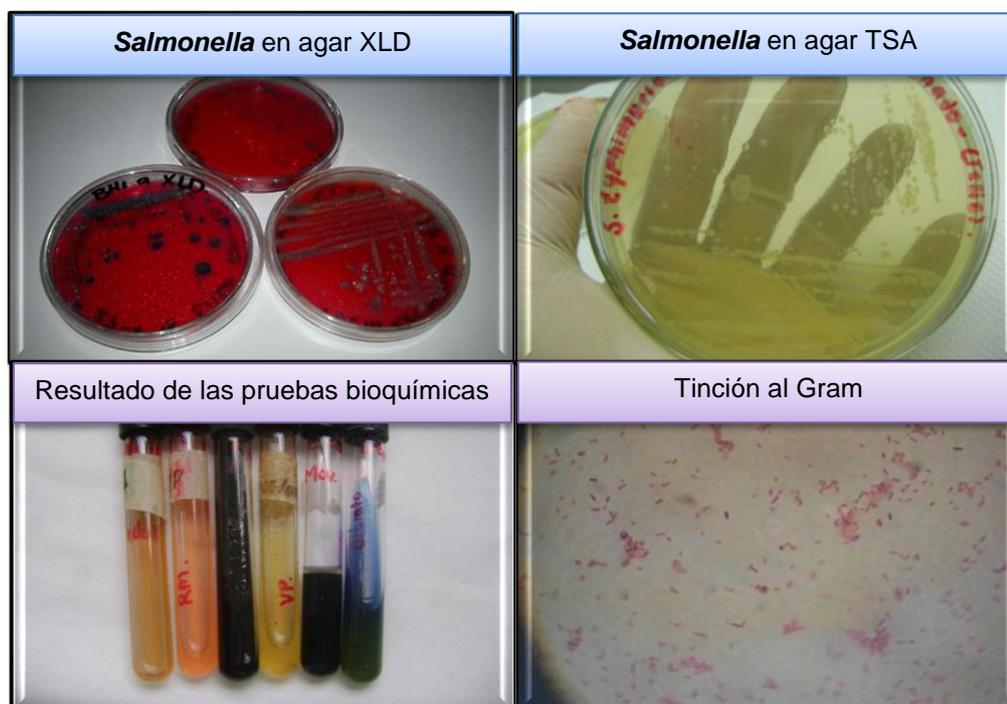


Figura N° 8: Resultados de la identificación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ^{(5), (6)}.

5.5 Estandarización de la bacteria patógena *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ⁽⁴⁴⁾

Los resultados obtenidos de la estandarización se ven reflejados en la Tabla N° 10 en donde se muestran los porcentajes de transmitancia con sus respectivos conteos equivalentes de *Salmonella typhimurium*, en la figura N° 9 se muestra la curva patrón realizada con los datos de la Tabla N° 10 en dicha figura se puede apreciar que al 82.2%T se obtiene un equivalente de *Salmonella typhimurium* de 10^6 ufc/mL los otros datos obtenidos pueden ser utilizados como una referencia para la realización de un análisis posterior en el que se desee conocer la concentración de la bacteria patógena a una determinada transmitancia. Como cualquier otro método el espectrofotómetro tiene ventajas y desventajas, una de las ventajas es que sus medidas son rápidas y reproducibles, sin embargo, sólo puede utilizarse para cultivos relativamente densos, y no puede distinguir entre células muertas y vivas, tampoco puede utilizarse con células que tiendan a formar

agregados, porque dejan de suspenderse rápidamente y desaparece la turbidez, más sin embargo es un método más confiable que realizarlo por comparación con el estándar de Mac Farland.

Tabla N° 10: Resultados de la estandarización de *Salmonella typhimurium*.

Resultados de la estandarización de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
% T	ufc/mL
75.20%	1.00E+07*
82.20%	1.00E+06
95%	1.00E+05

* 1.00E+07 es equivalente a decir 1.0×10^7 ufc/g.

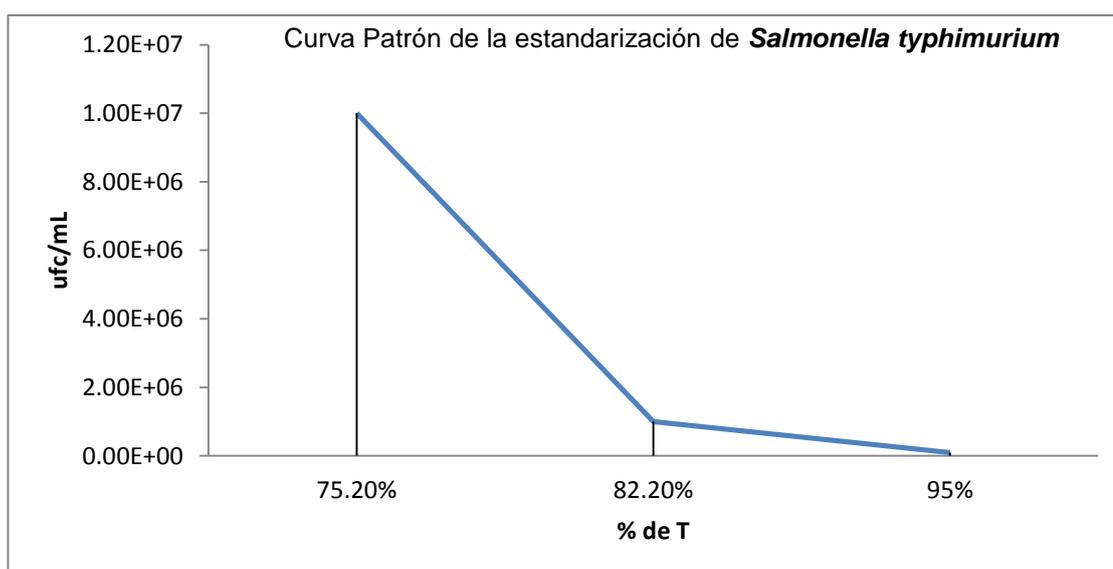


Figura N° 9: Curva patrón de la estandarización de *Salmonella typhimurium*.⁽⁴⁴⁾

5.6 Estandarización del *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. ^{(44), (49), (52)}.

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 se estandarizó mediante la técnica descrita en el numeral 4.2.6. en el cual se describe el procedimiento realizado para obtener una concentración de 10^6 ufc/mL de *Lactobacillus acidophilus*.

El resultado obtenido del enriquecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 fue efectivo ya que éste presentó buen crecimiento al sembrarlo en Agar MRS y la técnica de las diluciones seriadas fue lo suficientemente práctica ya que los conteos de dicha bacteria probiótica fueron más factibles. Por otra parte el resultado de la lectura en el espectrofotómetro de la concentración 10^6 ufc/mL fue de 77%T a 580nm. El haber estandarizado la concentración de 10^6 ufc/mL de *Lactobacillus acidophilus* permite tener un parámetro confiable para posteriores análisis en los que se requiera utilizar una concentración diferente de *Lactobacillus acidophilus* y no se conozca la concentración con la que se está trabajando, además de constatar por medio del recuento que la transmitancia leída en el espectrómetro que en este caso fue de 77% efectivamente es equivalente a la concentración de 10^6 ufc/mL.

5.7 Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*. ^{(6), (15), (37), (49)}.

La sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, se determinó mediante la metodología descrita en el numeral 4.2.7, en donde se especifica que durante 5 días se realizó un monitoreo para determinar si realmente *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 sobrevivía a la presencia de las bacterias ácidolácticas del yogurt y además de comprobar si *Lactobacillus*

acidophilus ATCC 4356 permitía que la sobrevivencia de la bacteria patógena fuera menor.

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de probióticos presentan una acción antagónica en contra de patógenos intestinales y del deterioro de alimentos ^{(7), (10)}. Esta acción fue constatada al evaluar el yogurt inoculado a diferentes concentraciones de la bacteria patógena a través del tiempo, los cuales presentaron una disminución en la población del microorganismo patógeno tal como se especifica en la Tabla N° 5 y N° 6.

-Análisis estadístico de los resultados de la sobrevivencia de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028. ^{(2), (22), (36), (45)}.

En el análisis de varianza, se realiza una serie de pasos, siendo el primero de ellos el planteamiento de hipótesis, con la finalidad de poder aceptar o rechazar lo planteado, utilizando la prueba *F* como herramienta estadística de contraste. A continuación se presenta un resumen que se utilizó para realizar el ANOVA de un solo factor.

Tabla N° 11: Resumen de los conteos de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 durante los 5 tiempos de monitoreo, en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***.

Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .				
Tiempo/Días	Conteos de <i>Salmonella typhimurium</i> a diferentes concentraciones			
	1.00E+06*	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03
0	4.00E+06	3.30E+05	1.50E+04	1.00E+03
8	1.30E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
15	1.20E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
22	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

* 1.00E+06 es equivalente a decir 1.0×10^6 ufc/g.

Tabla N° 12: Resumen de los conteos de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 durante los 5 tiempos de monitoreo, en el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***.

Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> .				
Tiempo/Días	Conteos de <i>Salmonella typhimurium</i> a diferentes concentraciones			
	1.00E+06*	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03
0	5.60E+06	3.70E+05	2.90E+04	1.80E+04
8	3.0E+06	2.40E+05	0.00E+00	0.00E+00
15	1.40E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
22	6.00E+05	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

* 1.00E+06 es equivalente a decir 1.0×10^6 ufc/g.

La variable dependiente es el conteo de la bacteria patógena a diferentes concentraciones, el factor o variable independiente fue el tiempo en días, en cuatro niveles y se analizaron 20 muestras por cada tipo de yogurt, haciendo un total de 40 muestras analizadas (Ver Anexo N° 12).

En la tabla N° 11 y N° 12 se puede observar que para el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***, al octavo día del análisis no se observó crecimiento de la bacteria patógena en las concentraciones de 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc/mL y que para el día veintidós a la concentración de 10^6 ufc/mL no hubo crecimiento de ***Salmonella typhimurium***; mientras tanto para el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** al octavo día de monitoreo, a las concentraciones de 10^3 y 10^4 ufc/mL no se observó crecimiento alguno de dicha bacteria patógena, y que hasta el día quince y treinta no se observó crecimiento de las concentraciones de 10^5 ufc/mL y 10^6 ufc/mL respectivamente.

En las tablas ANOVA que se detallan más adelante se determinó si hubo diferencias significativas entre el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en lo que respecta a la disminución del crecimiento de la bacteria patógena, a continuación se presentan los

pasos y resultados del análisis de varianza para seleccionar el tipo de yogurt que presenta mejor disminución del crecimiento de la bacteria patógena en lo que respecta a tiempo y concentración reducida o dicho de otra manera cuál de los dos tipos de yogurt presenta mejor efectividad en cuanto a la reducción de la bacteria patógena.

- Planteamiento de hipótesis nula para la concentración de 10^6 ufc/mL:

H_0 : $\mu 10^6$ ufc/mL yogurt con *Lactobacillus acidophilus* \neq $\mu 10^6$ ufc/mL yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.

El conteo de la bacteria patógena a la concentración de 10^6 ufc/mL es el mismo en ambos tipos de yogurt.

- Planteamiento de hipótesis alternativa:

H_a : $\mu 10^6$ ufc/mL yogurt con *Lactobacillus acidophilus* \neq $\mu 10^6$ ufc/mL yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.

El conteo de la bacteria patógena a la concentración de 10^6 ufc/mL no es el mismo en ambos tipos de yogurt.

De modo que la hipótesis nula se rechazará si los datos indican que una o varias de las medias es o son diferentes significativamente de las otras. Se hará la decisión sobre el rechazo o no rechazo de H_0 utilizando la distribución F y la estadística F .

-Criterios del contraste (22), (45).

Nivel de significancia: 0.05

Estadística de prueba o de contraste: Distribución F .

(Ver los valores críticos de la distribución F en Anexo N° 20)

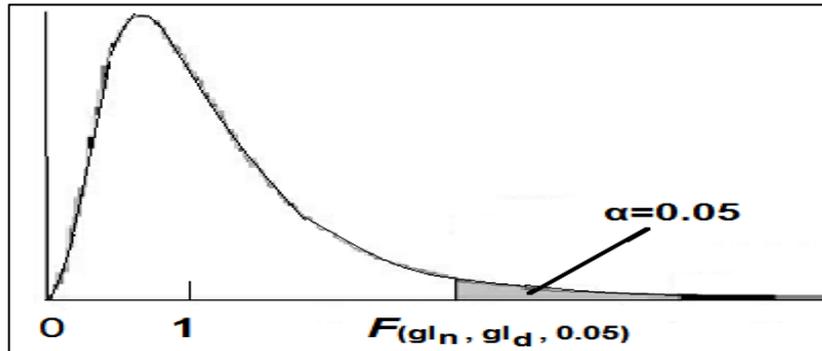


Figura N° 10: Curva de Distribución F . (39), (45).

En la figura N° 10 se observa la curva de distribución F , en donde todos los valores que caen en la región crítica se rechazan y los que caen fuera se aceptan. Los valores críticos de F registrados en la Tabla N° 23 del Anexo N° 20 presentan un área bajo la curva a la derecha de 0.05, donde:

$gl_{(n)}$ = Grados de libertad del numerador.

$gl_{(d)}$ = Grados de libertad del denominador.

$\alpha=0.05$ = Nivel de significancia.

- Resultados estadísticos para la concentración de 10^6 ufc/mL. (2), (36), (22),

(39), (45).

Para rechazar o aceptar la hipótesis se calcula el valor F con la siguiente ecuación:

$$F = \frac{CM(\text{factor})}{CM(\text{error})}$$

Dónde:

F = Valor calculado de F para el factor en análisis.

$MC(\text{factor})$ = Media de cuadrados del factor.

$MC(\text{error})$ = Media de cuadrados del error.

Tabla N° 13: Análisis de varianza para el recuento de **Salmonella typhimurium** ATCC 14028 a concentración de 10^6 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.681E+12	1	1.681E+12	0.4353794	0.52789629	5.317655072
Dentro de los grupos	3.0888E+13	8	3.861E+12			
Total	3.2569E+13	9				

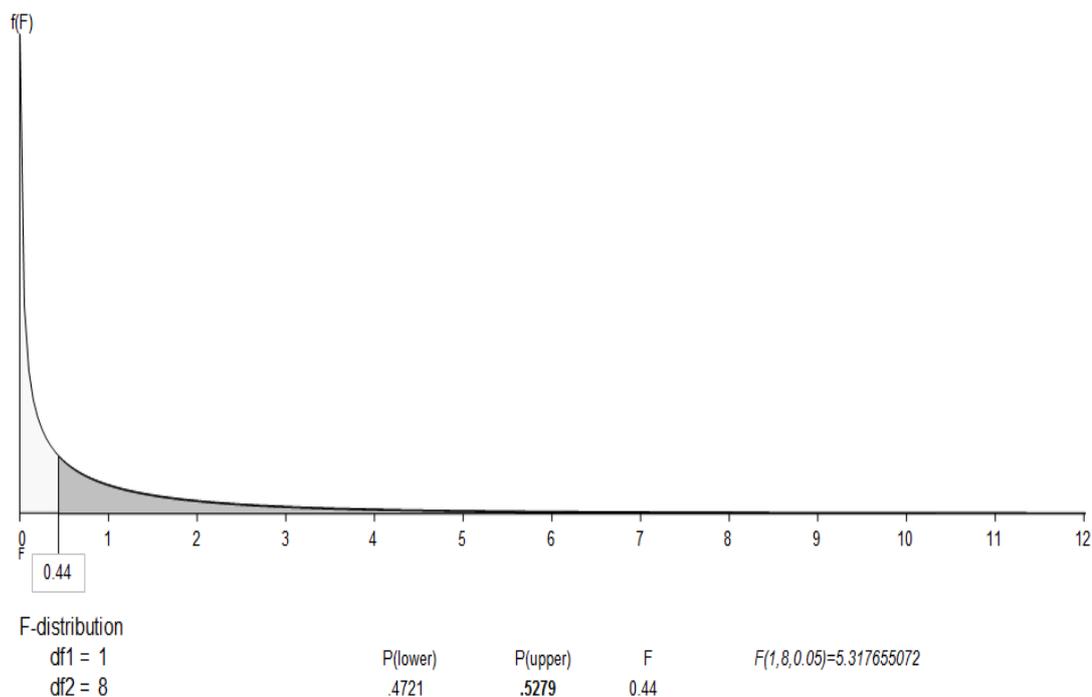


Figura N°11: Curva de distribución F para la comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL.

No se rechaza H_0 , ya que el valor de F calculado es menor que el F crítica. No existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Según los datos obtenidos de la aplicación del método Análisis de Varianza (ANOVA) en el programa de Excel se obtienen resultados que permiten

indicar que si el valor de F calculado es de 0.435379435379435 y el valor de F crítica es de 5.31765507157872, por lo tanto el valor de F calculado es menor que el F crítica, por lo que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y se puede concluir que la medida de variabilidad dentro de cada uno de los niveles que se están contrastando son significativamente similares, o dicho de otra manera el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** es tan efectivo como el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***.

Los resultados estadísticos para las concentraciones de 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL se ven reflejados en el Anexo N° 19.

-Comparación de la reducción de ***Salmonella typhimurium*** a diferentes concentraciones durante los 5 días de monitoreo.

La comparación de los resultados obtenidos en los 5 días de monitoreo en ambos tipos de yogurt a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL de bacteria patógena inoculada, se detallan a continuación:

Tabla N° 14: Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

Tiempo/Días	10^6 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)
0	4.00E+06*	5.60E+06
8	1.30E+06	3.0E+06
15	1.20E+06	1.40E+06
22	0.00E+00	6.00E+05
30	0.00E+00	0.00E+00

* 4.00E+06 es equivalente a decir 4.0×10^6 ufc/g.

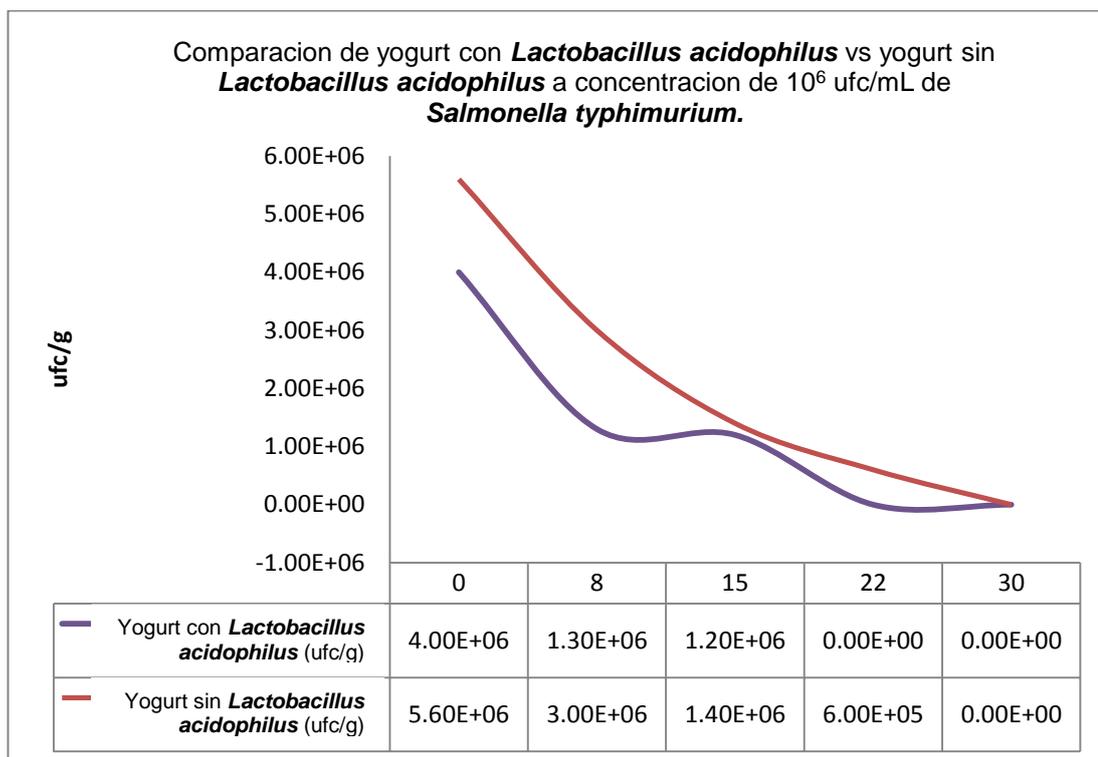


Figura N° 12: Comparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* a concentración de 10^6 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

En la gráfica anterior se puede demostrar que a pesar de ser una concentración de inóculo patógeno grande, las bacterias ácidolácticas presentes en los dos tipos de yogurt, demuestran buena capacidad de disminuir el crecimiento microbiano de *Salmonella typhimurium*, la tendencia que la gráfica del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* presenta con respecto a la del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* es que en el día 22 ya no se evidenció crecimiento alguno de la bacteria patógena, mientras que para el yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* el crecimiento evidenciado en el día 22 fue de una concentración de 6.0×10^5 ufc/g un conteo significativo que en el caso del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* se vio disminuido por la presencia de la cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* que ejerció un efecto sinérgico con las bacterias ácidolácticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

Tabla N° 15: Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

Tiempo/Días	10^5 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)
0	3.30E+05*	3.70E+05
8	0.00E+00	2.40E+05
15	0.00E+00	0.00E+00
22	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00	0.00E+00

* 3.30E+05 es equivalente a decir 3.3×10^5 ufc/g.

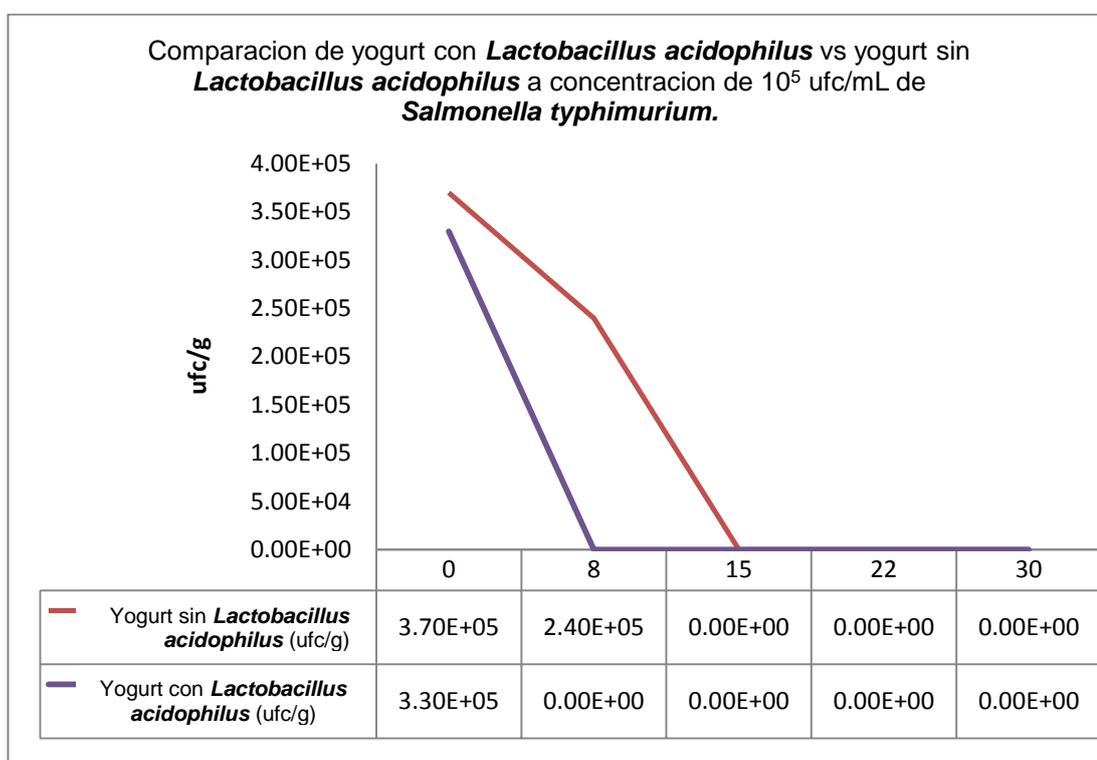


Figura N°13: Comparación de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** a concentración de 10^5 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

Según los datos reflejados en la gráfica de comparación del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** versus yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** a concentración de 10^5 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***, se puede evidenciar que en el caso del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***, al

octavo día de monitoreo las bacterias ácidolácticas en efecto sinérgico con *Lactobacillus acidophilus*, ejercieron inhibición total del crecimiento de *Salmonella typhimurium*, lo cual es un dato significativo porque a pesar de ser una concentración de inóculo patógeno bastante grande se puede manifestar que *Lactobacillus acidophilus* presenta un buen efecto inhibitorio con respecto a dicha bacteria patógena. Por otra parte el yogurt sin *Lactobacillus*, al octavo día de monitoreo presentó una disminución del conteo de *Salmonella typhimurium* y al día quince la inhibición de la misma fue total, por lo que es un parámetro importante porque se evidencia que las bacterias ácidolácticas que contiene el yogurt ejercen un efecto inhibitorio con respecto a *Salmonella typhimurium*, no obstante se debe tomar en cuenta que el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* presenta un efecto más eficaz y más rápido con respecto a la disminución de *Salmonella typhimurium*.

Tabla N° 16: Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*

Tiempo/Días	10^4 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)
0	1.50E+04*	2.90E+04
8	0.00E+00	0.00E+00
15	0.00E+00	0.00E+00
22	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00	0.00E+00

* 1.50E+04 es equivalente a decir 1.50×10^4 ufc/g.

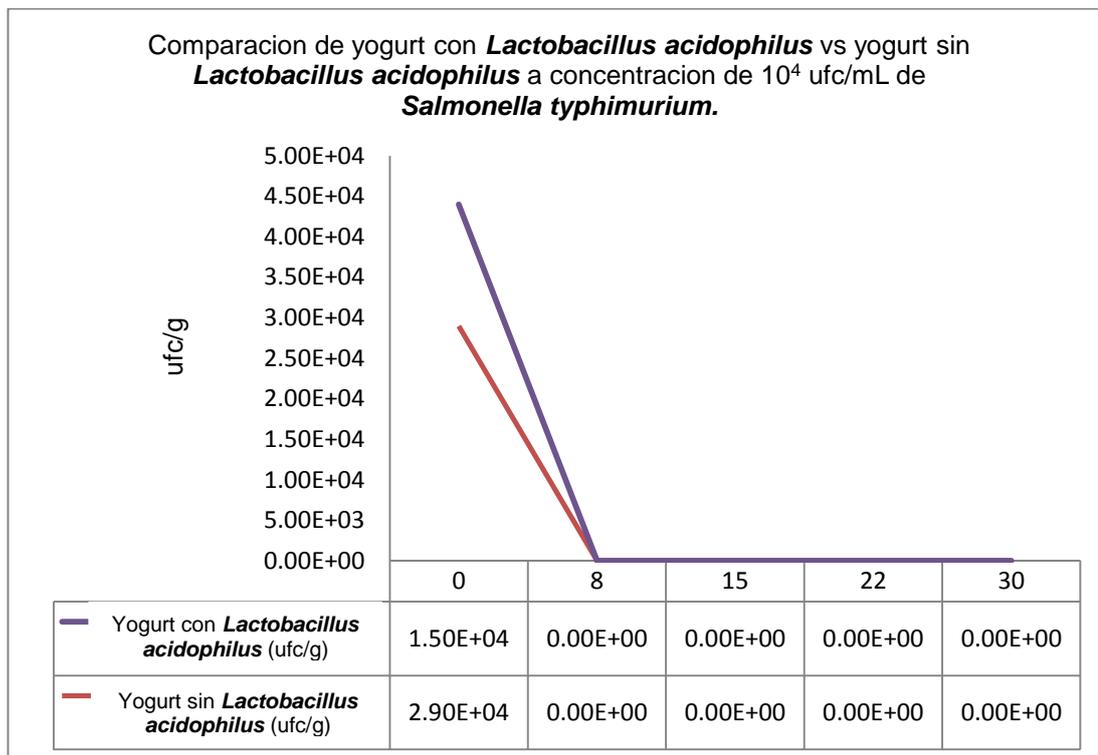


Figura N°14: Comparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* a concentración de 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*.

Los resultados obtenidos de la reducción de *Salmonella typhimurium* a concentración de 10^4 ufc/mL se demuestran claramente en la Tabla N°16 en donde se puede apreciar que tanto en el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* como en el yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, al octavo día de monitoreo ya no se observó crecimiento alguno de *Salmonella typhimurium*, esto es importante sobre todo porque se evidencia una reducción recíproca en el que a menor concentración de *Salmonella typhimurium* menor tiempo para su reducción. Asimismo la concentración de 10^4 ufc/mL de bacteria patógena es una concentración que se debe de tomar en cuenta porque es una de las concentraciones que ya pertenecen a la dosis infectiva de *Salmonella typhimurium* por lo que ahí radica la importancia de poder evaluar cuál de los dos tipos de yogurt disminuye en mayor cantidad la bacteria patógena y en mayor rapidez. Si se analizan detenidamente los resultados obtenidos en el yogurt con

Lactobacillus acidophilus como en el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***, y tomando en cuenta el análisis de varianza realizado, se puede decir que el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** presenta mejor rapidez en cuanto a la reducción de ***Salmonella typhimurium***.

Tabla N° 17: Comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

Tiempo/Días	10^3 ufc/mL de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
	Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)	Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/g)
0	1.00E+03*	1.80E+03
8	0.00E+00	0.00E+00
15	0.00E+00	0.00E+00
22	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00	0.00E+00

* 1.00E+03 es equivalente a decir 1.0×10^3 ufc/g.

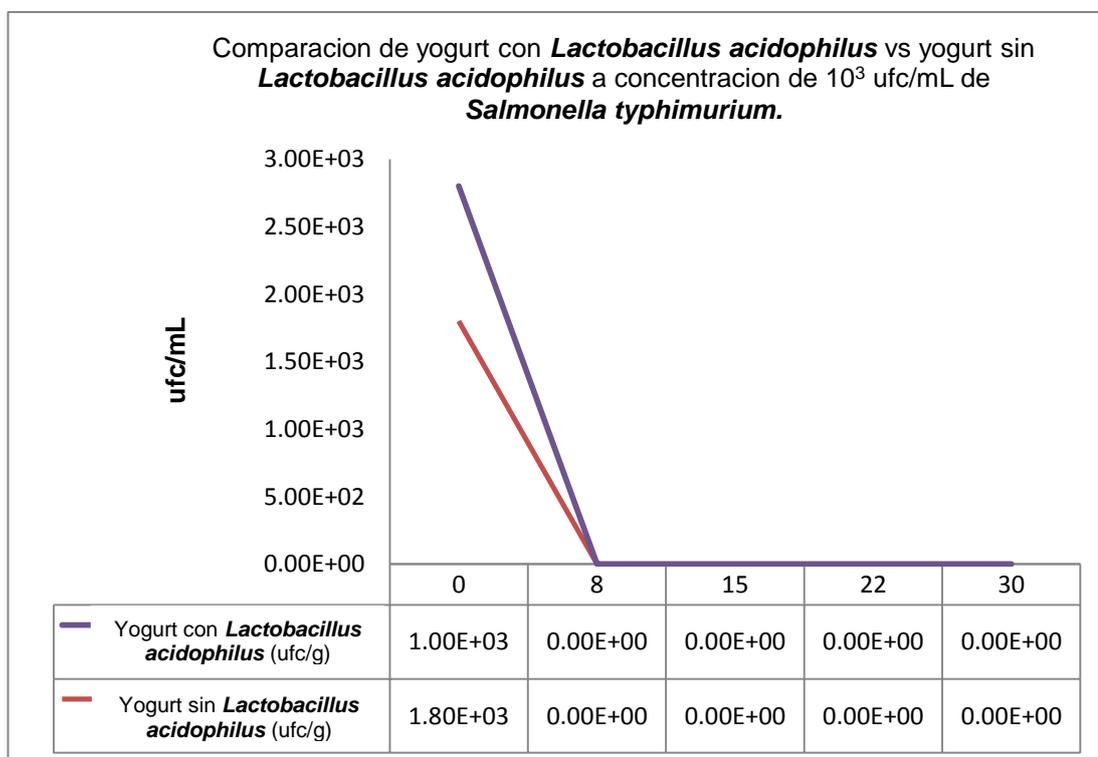


Figura N°15: Comparación de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** a concentración de 10^3 ufc/mL de ***Salmonella typhimurium***.

Los datos obtenidos de la reducción de *Salmonella typhimurium* a la concentración de 10^3 ufc/mL se ven reflejados en la Tabla N°17, y se puede apreciar, al igual que a la concentración de 10^4 ufc/ml que al octavo día de monitoreo, no existe crecimiento de *Salmonella typhimurium*, la diferencia única que existe en la concentración de 10^3 ufc/mL de *Salmonella typhimurium* es el conteo que se ha obtenido en el día cero, lo cual constituye un punto clave en el aspecto de tomar en cuenta cuál de los dos es mejor en reducir el crecimiento patógeno; a pesar que no existe mucha diferencia porque ambos conteos se encuentran dentro del factor exponencial de 10^3 , es posible decir que el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* supera al yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en la reducción de la bacteria patógena. Este dato obtenido es el más significativo dentro de las 4 concentraciones de inóculo patógeno evaluado porque se considera que dicha concentración se encuentra en el rango de la dosis infectiva 10^3 - 10^4 ufc/mL, por lo tanto con respecto a éste y a los demás análisis realizados de las otras concentraciones de inóculo patógeno es posible determinar cuál de los dos tipos de yogurt es más recomendado para el consumo de la población que padece de las más comunes enfermedades del tracto gastrointestinal.

Tabla N° 18. Comparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* versus yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en las diferentes concentraciones y días de monitoreo.

Conteos de <i>Salmonella typhimurium</i> a diferentes concentraciones en los 5 días de monitoreo.								
ufc/mL Tiempo/Días	Yogurt con <i>L. acidophilus</i> 10 ⁶ ufc/mL	Yogurt con <i>L. acidophilus</i> 10 ⁵ ufc/mL	Yogurt con <i>L. acidophilus</i> 10 ⁴ ufc/mL	Yogurt con <i>L. acidophilus</i> 10 ³ ufc/mL	Yogurt sin <i>L. acidophilus</i> 10 ⁶ ufc/mL	Yogurt sin <i>L. acidophilus</i> 10 ⁵ ufc/mL	Yogurt sin <i>L. acidophilus</i> 10 ⁴ ufc/mL	Yogurt sin <i>L. acidophilus</i> 10 ³ ufc/mL
0	4.00E+06*	3.30E+05	1.50E+04	1.00E+03	5.60E+06	3.70E+05	2.90E+04	1.80E+04
8	1.30E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.00E+06	2.40E+05	0.00E+00	0.00E+00
15	1.20E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.40E+06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
22	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.00E+05	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
30	0.00E+00							

*4.00E+06 es equivalente a 4.0×10^6 ufc/mL.

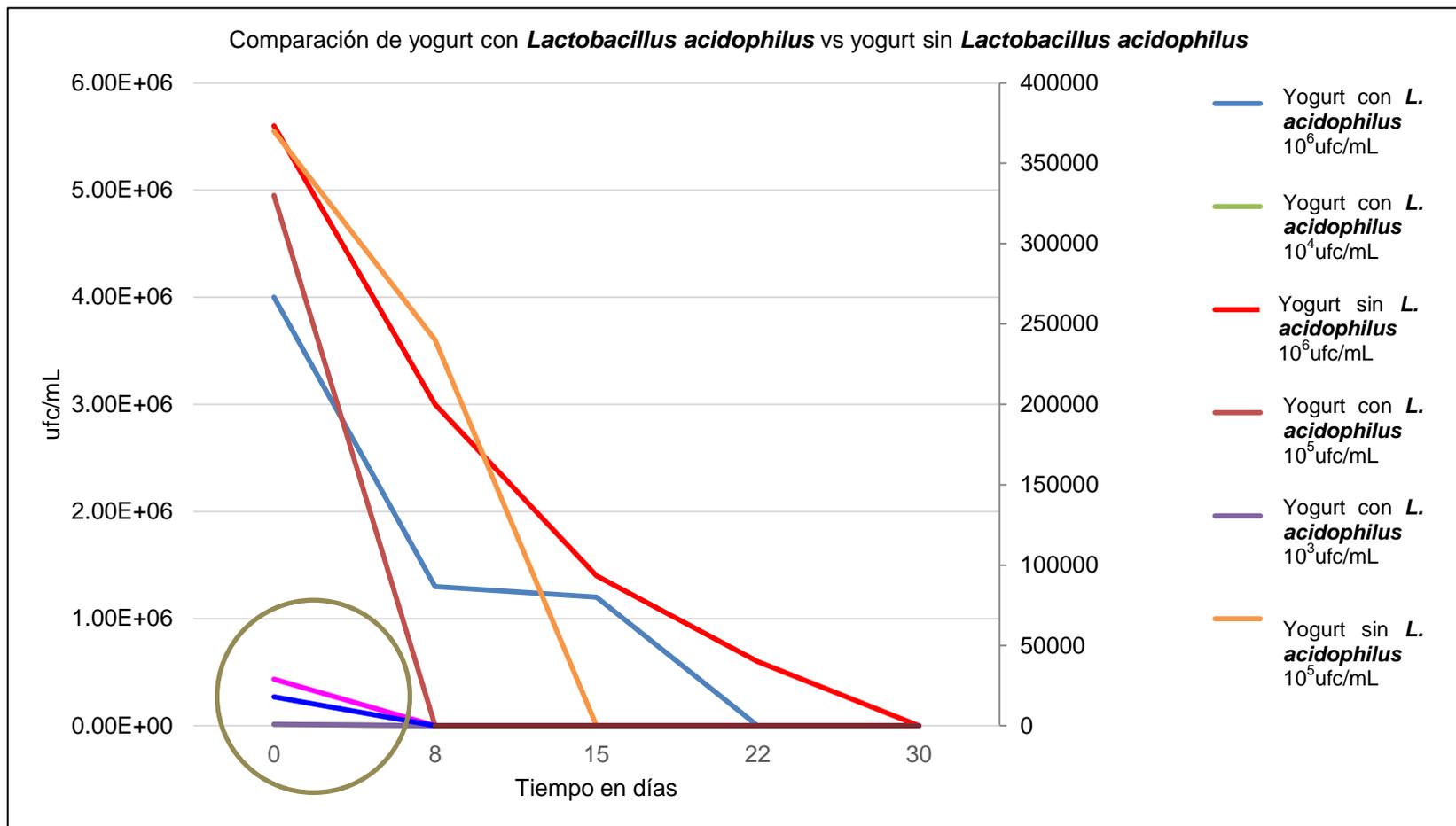


Figura N°16: Comparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* vs yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en las diferentes concentraciones de *Salmonella typhimurium* durante 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo.

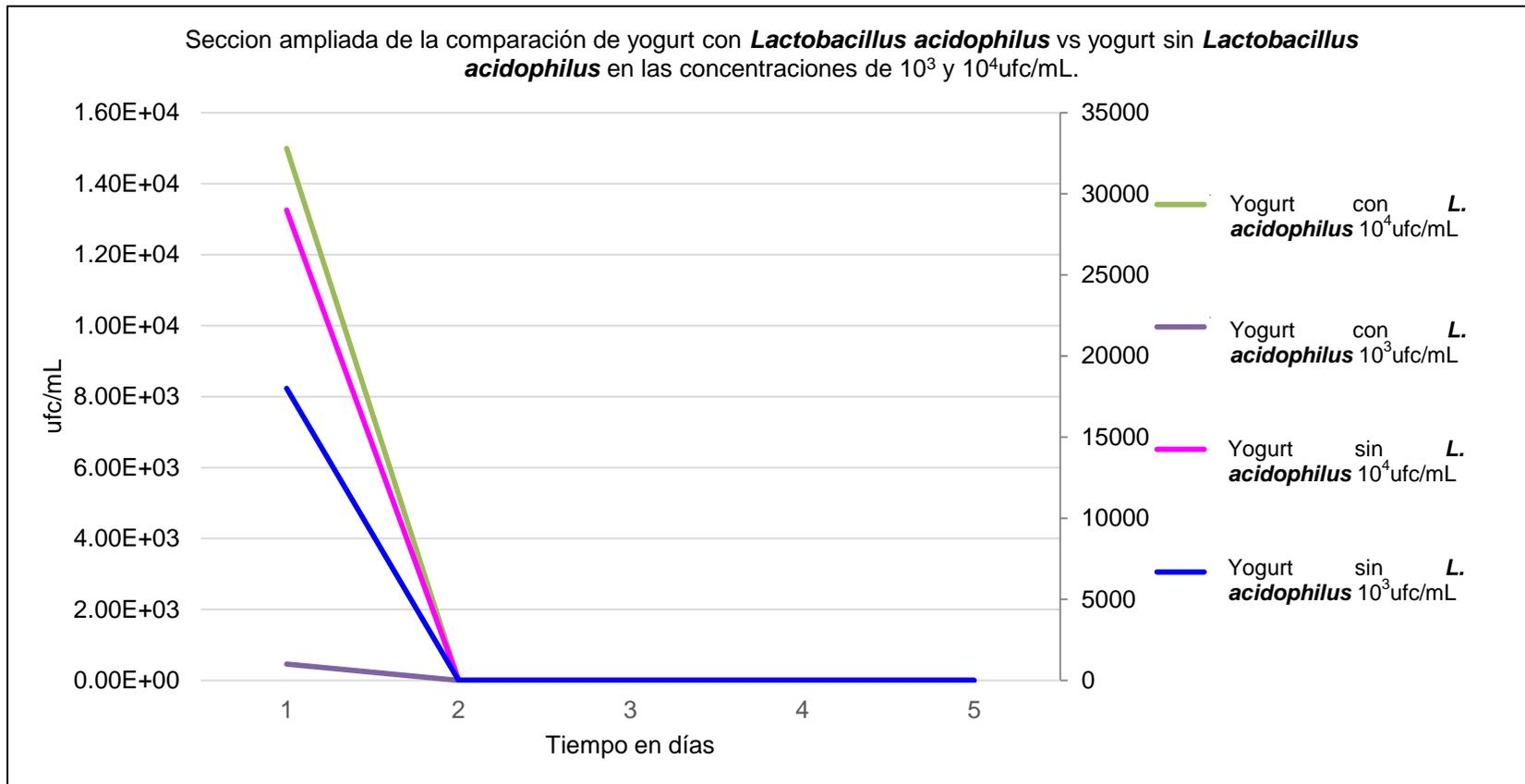


Figura N°17: Comparación de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* vs yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en las concentraciones de 10^3 y 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium* durante 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo.

La Figura N° 16 refleja la comparación de los dos tipos de yogurt inoculados con *Salmonella typhimurium* a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL, en los diferentes tiempos de monitoreo, se puede apreciar la disminución que hubo en los conteos de *Salmonella typhimurium* con respecto al tiempo; La sección encerrada en el círculo se puede ver ampliada en la Figura N° 17 en donde las concentraciones de 10^3 y 10^4 ufc/mL de *Salmonella typhimurium*, se pueden evidenciar claramente, ya que la escala de la Figura N° 16 no permite visualizar el gráfico correspondiente a yogurt con *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 10^4 ufc/mL.

En la Figura N° 16, se puede apreciar que en la concentración de *Salmonella typhimurium* de 10^5 ufc/mL correspondiente a yogurt con *Lactobacillus acidophilus*, en el día 8 la tendencia del gráfico es a cero, ya que en ese punto no se evidenció crecimiento alguno de *Salmonella typhimurium*, mientras que en la misma concentración pero del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*, se puede notar que la disminución total del crecimiento bacteriano se evidenció hasta el día 15; La tendencia de las concentraciones de 10^4 y 10^3 ufc/mL en los dos tipos de yogurt es a cero en el día 8 de monitoreo.

La comparación de los dos tipos de yogurt permite señalar que ambos poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, la diferencia se ve marcada en gran medida, en el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* que inhibe a la bacteria patógena en un periodo de tiempo más corto, y en los conteos a una misma concentración de bacteria patógena, el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* inhibe mayor cantidad de *Salmonella typhimurium*, debido a esto se considera que el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* es mucho más efectivo que el yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*. Ambos tipos de yogurt se consideran con buena capacidad para inhibir a *Salmonella typhimurium*, pero en términos de rapidez y eficacia se sabe que el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* supera al yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*.

5.8 Evaluación de la tolerancia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. ^{(1), (15), (37) (47)}.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la tolerancia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago, fueron obtenidos al efectuar la metodología descrita en el numeral 4.2.8 en la cual se evaluaron 2 sistemas denominados A y B, de los cuales, al sistema A se le ajusto el pH a 2.0, y al sistema B se enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%. Los resultados obtenidos de esta parte son uno de los parámetro más importantes al evaluar una cepa probiótica ya que como lo especifica la FAO/OMS ⁽²⁸⁾, para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir con ciertas características entre las cuales una de las más importantes es la de sobrevivir al pH ácido del estómago y a las sales biliares.

El *Lactobacillus acidophilus* presenta la capacidad de poder sobrevivir al pH ácido del estómago al ser evaluado durante un periodo de 2 horas, al mismo tiempo se puede decir que crece bien a concentraciones de sales biliares de 0.3% durante 2 horas, siendo estas propiedades de estrés las que suelen ser empleadas en la elaboración de un producto con probióticos, puesto que es capaz de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal.

5.9 Determinación del porcentaje de células viables. ⁽¹⁵⁾

$$\% = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100$$

Donde N_1 representa el total de células viables después de los tratamientos y N_0 representa el número inicial de BAL inoculadas. ⁽¹⁵⁾

-Porcentaje de sobrevivencia de las bacterias ácidolácticas a pH de 2.0

$$\% \text{ de Sobrevivencia a pH de 2.0} = \frac{\log UFC N1 \times 100}{\log UFC No}$$

$$\% \text{ de Sobrevivencia a pH de 2.0} = \frac{\log 5.8 \times 10^4 \times 100}{\log 1.0 \times 10^6}$$

$$\% \text{ de Sobrevivencia a pH de 2.0} = 79.39046656.$$

-Porcentaje de sobrevivencia de las bacterias ácidolácticas a las sales biliares.

$$\% \text{ de Sobrevivencia a sales biliares} = \frac{\log UFC N1 \times 100}{\log UFC No}$$

$$\% \text{ de Sobrevivencia a sales biliares} = \frac{\log 6.4 \times 10^4 \times 100}{\log 1.0 \times 10^6}$$

$$\% \text{ de Sobrevivencia a sales biliares} = 80.10299957.$$

Del análisis de resistencia a pH 2.0 y tolerancia a sales biliares de origen bovino al 0.3%, que son las condiciones que afectan la sobrevivencia bacteriana durante el paso a través de un modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal durante las 2 horas que tarda la comida en atravesar el sistema digestivo ⁽¹⁵⁾, se observó que ***Lactobacillus acidophilus*** presenta la capacidad de sobrevivir a las condiciones drásticas de pH de 2.0 por un periodo de 2 horas en un porcentaje de 79.4% y que el porcentaje de éste

mismo a las sales biliares de origen bovino al 0.3% por un periodo de 2 horas fue de 80.1%, por lo que según los resultados obtenidos presenta buena capacidad de sobrevivir a las condiciones drásticas simuladas *in vitro* del estómago⁽¹³⁾ por lo tanto se puede decir que cumple con dos de los requisitos importantes para ser considerado como una cepa probiótica⁽¹³⁾, consecuentemente puede ser incluida en el consumo diario de yogurt.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El efecto que ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 ejerce sobre ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 es muy significativo ya que esta cepa probiótica es capaz de inhibirla cuando la bacteria patógena se encuentra a una concentración de 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc/mL al octavo día de monitoreo.
2. ***Lactobacillus acidophilus*** es capaz de presentar un porcentaje de sobrevivencia a pH de 2.0 de 79.4% y que éste mismo frente a las sales biliares de 80.1%, lo cual permite afirmar que ***L. acidophilus*** puede pasar a través del estómago completamente viable y ejercer efecto inhibitorio hacia las bacterias patógenas.
3. La sobrevivencia demostrada de ***Lactobacillus acidophilus*** a las sales biliares y al pH ácido del estómago demuestran que puede ser considerada como una cepa probiótica y que puede ser incluida en el consumo diario de yogurt como una medida de prevención en la adquisición de enfermedades gastrointestinales originadas por bacterias patógenas.
4. La comparación de ambos tipos de yogurt permitió establecer que ambos inhiben el crecimiento de ***Salmonella typhimurium***, la diferencia consiste en que el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** inhibe a ***Salmonella typhimurium*** en periodos de tiempo más cortos que el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***, por lo que se considera que el primero de ellos es mucho más efectivo.

5. El pH obtenido en ambos tipos de yogurt durante los 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo se mantuvo en un rango de 4.40-4.48, lo cual es un parámetro que permite reflejar que las condiciones de almacenamiento a 4°C son fiables para mantener la acidez de este alimento en parámetros normales.

6. El conteo de las bacterias ácidolácticas en los dos tipos de yogurt se mantuvo constante durante los 0, 8, 15, 22 y 30 días de monitoreo, esto permite asegurar que el yogurt actuará de manera eficaz al contrarrestar los microorganismos patógenos por contener una concentración de bacterias ácidolácticas constante durante todo el periodo de vida útil.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que las personas con problemas de tipo gastrointestinal y sistema inmunodeprimido, incluyan en su dieta diaria el consumo de yogurt que contenga cepas probióticas como el ***Lactobacillus acidophilus***.
2. Que el personal docente de la cátedra de Microbiología continúe realizando investigaciones relacionadas con bacterias con potencial probiótico y que dichas investigaciones puedan contribuir a mejorar la salud de personas que padecen de las más comunes enfermedades del tracto gastrointestinal.
3. Realizar una validación del método para la determinación de la sobrevivencia de ***Salmonella typhimurium*** frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt.
4. Que el Ministerio de Salud a través de la Dirección de la Unidad de Salud, gestione proyectos, incluyendo a los promotores de Salud, para promocionar la ingesta de yogurt con bacterias probióticas, y que éste pueda ser incluido en la dieta de los niños desde edades tempranas para poder fortalecer el sistema inmune y prevenirlos que padezcan de enfermedades gastrointestinales.
5. Que la Universidad de El Salvador, a través del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) gestione proyectos para realizar intercambios con otros investigadores que están desarrollando temas relacionados al consumo de yogurt con probióticos.

6. Que se realicen investigaciones con diferentes marcas de yogurt que se comercializan en El Salvador, para constatar si están adicionando a sus productos, cepas probióticas que efectivamente cumplan con las características mínimas exigidas.
7. Que los fabricantes declaren en la etiqueta el género, especie y cepa de cada microorganismo probiótico.

BIBLIOGRAFIA

1. Acedo E, Martínez E.B, Pérez M. Un Método Alternativo para la Evaluación de Resistencia a pH Ácido y Sales Biliares dentro de la Caracterización Probiótica de Cepas de *Lactobacillus reuteri*. [revista en línea] 2009 [acceso 25 de agosto de 2013]; 19(1). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95911638014>
2. Anderson D. R, Sweeney D.J, Williams T.A. Estadística para administración y economía. 10ª ed. México: Cengage Learning, 2008. 490-542.
3. Araujo Ortiz, R.J. Beneficios de la utilización de un producto a base de probióticos y enzimas, para la ganancia de peso y reducción de mortalidad en pollos de engorde. [tesis de grado.] San Salvador: Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia; 2004. 53p.
4. Bengmark S. Econutrición y mantenimiento de la salud - un concepto nuevo para evitar la inflamación gastrointestinal ulceración y sepsis.[revista en internet]1996 [acceso 12 de marzo de 2013]; 15(1).Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843987>
5. Bergey D. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. [Libro en línea]. 9th ed.USA; 1994. [Acceso el 15 de abril de 2013]. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?id=9cwgo9lyTUC&pg=PA1257&dq=6.%09David+Bergey.+Bergey's+Manual+of+Determinative+Bacteriology.+9th+Ed.USA:+Editorial+;1994.&hl=es419&sa=X&ei=ChFuUfTMO6qr0AHhsoCwCw&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=6.%09David%20Bergey.%20Bergey's%20Manual%20of%20Determinative%20Bacteriology.%209th%20Ed.U SA%3A%20Editorial%20%3B1994.&f=false>

6. Bermúdez E. Pruebas bioquímicas para enterobacterias fundamentos. [Presentación power point] 2010 [acceso 10 de agosto de 2013]. Disponible en:<http://es.scribd.com/doc/4743830/pruebasbioquimicasparaenterobacterias>
7. Barrantes X, Railey D, Arias ML, Chaves C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. Archivos latinoamericanos de nutrición. [revista en internet]. 2004 [consultado el 24 de agosto de 2013]; 54(3). Disponible en : http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt&pid=S0004-06222004000300006
8. Berrocal D, Arias M. L, Henderson M, Wong E. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur [revista en línea] 2002 [acceso 14 de abril de 2013]; 52. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222002000400008&script=sci_arttext
9. Calderón G. Consultora FAO. Estudio de caso Enfermedades transmitidas por alimentos en El Salvador. [Acceso el 15 de abril de 2013]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03.pdf>
10. Calderón O, Padilla C, Chávez C, Villalobos L, Arias L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. archivos latinoamericanos de nutrición.[revista en internet]. 2007 [consultado el 20 de febrero de 2013]; 57(1). Disponible en : http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222007000100007&script=sci_arttext

11. Centers for Disease Control and Prevention. Brote de infecciones por *Salmonella typhimurium* en humanos vinculados a los erizos[sede Web]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention [actualizada el 16 de abril de 2013; acceso 17 de abril de 2013]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-hedgehogs-09-12/index.html>
12. Chandan R, Shahani, K. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *Journal of Dairy Science*. [revista en internet] 1979 [acceso 24 de marzo de 2013]62(10). Disponible en : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030279834815.pdf>
13. Código alimentario argentino. Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011 (19/12/2011) [Acceso el 28 de agosto de 2013]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Alimentos/Resolucion_Conjunta_261-2011_y_22-2011.pdf
14. Condony S.R. Font M.A, Martinez MR. Yogurt: Elaboración y valor Nutritivo. Fundación Española de la Nutrición. [revista en internet] 1988 [acceso 11 de noviembre de 2013] 10(1). Disponible en: <http://www.fen.org.es/imgPublicaciones/33-Yogur-elaboraci%C3%B3n.pdf>
15. Cueto M, Yudtanduly A, Valenzuela J. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño.[revista en internet] 2010 [acceso 10 de marzo de 2013]; 32(93).Disponible en: <https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache>
16. Cruz Pacheco K. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. [tesis doctoral]. México D.F., Instituto Politécnico Nacional, 2010.

17. Díaz M.A, Montes M.G. Efecto de probiótico a base de *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactobacillus* sp., en la sobrevivencia y crecimiento larval del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en la estación de maricultura los Cóbano, Sonsonate. [tesis de grado.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas; 2012. 130p.
18. Dirección general de normas. Alimentos, yogurt o leche búlgara. Normas mexicanas. NMX-F-444-1983. [Acceso el 30 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-444-1983.PDF>
19. Food and Drug Administration [sede Web]. Washington: The FDA; Resumen FDA investigación: Brote de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella newport* en infecciones relacionadas con el cultivo de melón en granjas de Chamberlain en el suroeste de Indiana; 2013 [acceso 15 de abril de 2013]. Sección de Alimentos. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/CORENetwork/ucm315879.htm>
20. Food and Drug Administration [sede Web]. Washington: The FDA; Profesionales de la medicina - Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos; 2011 [acceso 15 de abril de 2013]. Sección de Alimentos. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/PeopleAtRisk/ucm091976.htm>
21. Hanne R.C, Hanne F, James J.P. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* [revista en internet] 2002 [acceso 24 de marzo de 2013] 168(171). Disponible en : <http://www.jimmunol.org/content/168/1/171.full.pdf+html>

22. Johnson R. Estadística elemental. Grupo Editorial Iberoamericana S.A de C.V. México D.F. 1991.
23. Karl F. Elaboración artesanal de mantequilla, yogurt y queso. 1ra ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.; 1998.
24. León F. Evaluación *in vitro* de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Nativas con Potencial Probiótico [Tesis de Pregrado] Montevideo: Universidad de la república. Facultad de ciencias; 2012. 54p
25. Manzano H, Rivera W. Evaluación de la calidad microbiológica del yogurt comercializado en la ciudad de San Salvador. El Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. 1998. 74p.
26. Ministerio de Salud. Datos Epidemiológicos (Por Edad y Por Departamento), Virus Respiratorios, Casos de Influenza (2010-2013), Casos Confirmados de Rotavirus (2011-2013). [base de datos en internet]. El Salvador: Ministerio de Salud, Unidad de Salud Ambiental; 2013 [actualizada en abril 2013; acceso 16 de abril de 2013]. Disponible en: http://www.salud.gob.sv/archivos/vigi_epide2013/Datos_VIGEPES_Semana142013.pdf
27. Norma del Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003. [acceso el 15 de abril de 2013]. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_243s.pdf
28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS; 2006. Estudios FAO alimentación y nutrición: 85 [Acceso el 20 de febrero de 2013]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

29. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos. 1998; 3-19. [Acceso el 15 de Abril de 2013]. Disponible en: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf
30. Oyetayo V, Adetuyi F, Akinyosye F. Safety and Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. African Journal of Biotechnology. [revista en internet] 2003 [acceso 24 de marzo de 2013] 2(11). Disponible en : www.ajol.info/index.php/ajb/article/.../58616
31. Parras R.A. Yogurt en la salud humana. [revista en línea] 2012 [acceso 30 de agosto de 2013]; 9 (2). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v9n2/v9n2a17.pdf>
32. Prado M, Bringué E, Solé M, Hervera C, López G, Gomà B. Bacteriemia en el curso de gastroenteritis a *Salmonella*. [artículo en internet] 1997 [consulta: 17 de febrero de 2013]; 46(2). Disponible en: <http://www.aeped.es/sites/default/files/anales/46-2-11.pdf>
33. Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A. Microbiología. Quinta edición. España. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2004.
34. Productos lácteos. Leche de vaca pasteurizada y ultrapasteurizada. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.0.2:06 Diario Oficial, n° 380 (17/07/2008) [Acceso el 28 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://www.infoq.org.sv/dbnormas/NSO%2067.01.02.06.pdf>
35. Productos lácteos. Yogurt especificaciones. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.10:08 Diario Oficial, N° 384

(28/07/2009) [Acceso el 28 de agosto de 2013]. Disponible en:
<http://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/LACTEOS/NORMA%20DE%20YOGURT.pdf>

36. Ramírez J.D. Conceptos estadísticos básicos para el análisis, interpretación e inferencias en resultados cuantitativos en Ciencias Químicas [Trabajo de graduación]. S.S, El Salvador, C:A. 1999
37. Rodríguez I, Salazar M, Villalobos E. *Lactobacillus spp.* del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. [revista en línea] 2012 [acceso 30 de agosto de 2013]; 32 (2). Disponible en:
http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=139&Itemid=149
38. Samaniego Fernández LM, Sosa del Castillo M. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. [artículo en internet] [consulta: 17 de febrero de 2013]. Disponible en:
<http://revistas.mes.edu.cu/greenstone/collect/repo/import/repo/20081023/9789591601131.pdf>
39. Santos A, Vega D. Estandarización del proceso de fermentación de leche ultrapasteurizada con gránulos de kéfir. [tesis de grado.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia; 2012. 102p.
40. Shah N. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. [revista en internet] 2000 [consultado: 1 de abril de 2013] 83 (4). Disponible en:
<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030200749538.pdf>

41. Silva A.M, Bambirra E.A, Oliveira A.L, Souza P.P, Gomes D.A, Viera E.C, Nicoli J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. Journal of Applied Microbiology [revista en internet] 1999 [acceso 24 de marzo de 2013] 86(331). Disponible en : <http://eanimal.snu.ac.kr/Aboutus/seminar/protective%20effect%20of%20bifidus%20milk%20on%20the%20experimental%20infection%20with%20sal>
42. Speck Chairman, Marvin L. (editor) Compendium of methods for the microbiological examination of food. APHA. Washington DC, 1976.
43. Tannock G. Molecular Genetics: A New Tool for Investigating the Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. Microbial Ecology [revista en internet] 1988 [acceso 24 de marzo de 2013]; 15(239). Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02012640?LI=true#page-2>
44. Torrico E, Trigos C. Manual de procedimiento Bauer-Kirby y su control de calidad interno. 1ª ed. La Paz: OPS/OMS, 2003. [Acceso el 20 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://enfermeria.bvsp.org.bo/textocompleto/bvsp/boxp79/tcd/nacional/nman13.pdf>
45. Triola M. Estadística. 10ª ed. México: Pearson educación, 2009. 634-673.
46. Urrutia C.A, Guerra G.J. Detección de ***Salmonella spp*** resistente a antibióticos en carne molida de res distribuidas en los supermercados en la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de san salvador. [tesis de grado.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia; 2012. 132p.
47. Vallejo M, Marguet E.R, Etchehoury V. E. Potencial Probiótico de Cepas de *Lactobacillus* Aisladas de Quesos Ovinos Patagónicos. Revista de la

Facultad de Salud Pública y Nutrición. [revista en internet] 2008 [acceso 24 de marzo de 2013] 9(4). Disponible en :

http://www.respyn.uanl.mx/ix/4/articulos/probioticos_quesos.

48. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison M, Christakis A. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pub-med [revista en internet] 2002 [acceso 24 de marzo de 2013] 109(4). Disponible en :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927715>

49. Wallace A, Hammack T. *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual [Manual en línea] 1998 [Acceso el 15 de abril de 2013]. (8a ed.). Disponible en:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/>

50. Whigham, L.D., M.E. Cook and R. L. Atkinson. Conjugated linoleic acid: implications for human health. Pharmacol Res. [revista en internet] 2000 [acceso 24 de marzo de 2013] 42(6). Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058400>

51. www.danisco.com [Acceso el 03 de Septiembre de 2013]. Product description-pd 205568-8.0EN. Material 41111.

52. www.danisco.com [Acceso el 03 de Septiembre de 2013]. Certificado de análisis. *L. acidophilus*. Material 1248156.

GLOSARIO (14), (39), (46).

- Bacterias ácido lácticas homofermentativas:** bacterias que poseen las enzimas aldolasa y hexosa-isomerasa, pero carecen de la fosfocetolasa. Usan la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para la producción de dos moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucosa consumida. Sólo forman pequeñas cantidades de otros metabolitos diferentes del ácido láctico el cual representa del 90 al 97% de la lactosa fermentada.

- Bacterias ácido lácticas heterofermentativas:** grupo de bacterias que contiene la enzima fosfocetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa-isomerasa; así que en lugar de seguir la vía EMP para la degradación de la glucosa, utilizan las vías del hexosa monofosfato o la de la pentosa. La producción de ácido es más débil; además del ácido láctico se forman otros ácidos, sustancias diversas y CO₂.

- Aerotolerante:** Bacterias del ácido láctico, aunque pueden CRECER en Presencia de Oxígeno, no pueden utilizarlo, Sino Que obtienen Energía Exclusivamente porción fermentación.

- Microaerofilia:** Condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno que requieren determinados organismos para su desarrollo, conocidos como microaerófilos.

- Anaerobios:** Los organismos anaerobios o anaeróbicos son los que no utilizan oxígeno (O₂) en su metabolismo, más exactamente que el aceptor final de electrones es otra sustancia diferente del oxígeno.

- Anaerobios Facultativos:** Microorganismos aeróbicos, que pueden desarrollarse en ausencia de oxígeno, por medio de la fermentación.

- Bacterias Mesófilas:** Se denominan así aquellas bacterias cuya temperatura optima de desarrollo ésta alrededor de los 25-30°C, incluso hasta los 37°C.

-Bacterias Termófilas: Se denominan así aquellas bacterias cuya temperatura óptima de desarrollo está alrededor de los 45°C.

-Bacteriocinas: son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos.

-Pasteurización: Tratamiento térmico menos energético que la esterilización. Se aplican temperaturas entre 62 y 88°C, durante un tiempo variable. El grado de destrucción de los microorganismos es inferior al de la esterilización, por lo que se obtiene un producto de vida más corta, ya que la cifra de gérmenes residual es mayor. Por el contrario, este tratamiento afecta menos a los caracteres sensoriales y nutricionales del alimento tratado.

-pH: Valor o escala de valores exponenciales (logaritmo negativo de la concentración de iones H⁺), utilizada para expresar la acidez (valores de 0 a 7) o alcalinidad (valores de 7 a 14) de un medio.

-Microorganismos Viables: Aquellos que se encuentran en formas capaces de vivir y reproducirse.

-Caseína: Principal proteína de la leche y sus derivados, y que presenta un elevado valor biológico por su composición en aminoácidos.

-Cepa: Unidad taxonómica. La cepa o clon puede considerarse como una población de características idénticas.

-Cepa ATCC: (American Type Culture Collection. Rockville, EU) Obtención directa a partir de una colección internacional reconocida, con su respectivo registro y certificado

-Inocuidad de alimentos: acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos, deberá abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo

ANEXOS

ANEXO N° 1

Datos Epidemiológicos del Ministerio de Salud ⁽²⁶⁾

Cuadro N° 4. Datos epidemiológicos reportados por el Ministerio de Salud sobre Diarreas y Gastroenteritis ⁽²⁶⁾

No.	Diagnóstico	GRUPOS DE EDAD																		Acumulado por sexo		Total acumulado
		<1 AÑO		1 a 4		5 a 9		10 a 19		20 a 29		30 a 39		40 a 49		50 a 59		60 a +				
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F			
1	Parálisis Flácida Aguda	0	0	2	2	5	1	6	1	3	0	4	0	2	0	0	1	1	3	23	8	31
2	Sospecha de Sarampión	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
3	Sospecha de Meningitis Meningocócica	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3	2	5
4	Infecciones Respiratorias Agudas	34277	31214	85479	80834	54431	55350	36539	48844	28616	54899	25533	51908	18990	39337	12437	25744	16163	27867	312465	415997	728462
5	Neumonías	2330	1596	2534	1871	379	335	189	172	70	122	95	131	79	146	103	168	560	837	6339	5378	11717
6	Diarrea y Gastroenteritis	8115	6660	16023	14361	4777	4557	3293	3993	6251	7043	4935	6253	3565	4967	2183	3353	2750	4393	51892	55580	107472
6	Diarrea y Gastroenteritis	8115	6660	16023	14361	4777	4557	3293	3993	6251	7043	4935	6253	3565	4967	2183	3353	2750	4393	51892	55580	107472
8	Intoxicación Alimentaria Aguda	1	0	9	4	7	4	20	4	15	12	13	11	6	3	3	5	2	5	76	48	124
9	Intoxicación Paralizante o Neurotóxica por mariscos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Hepatitis Aguda Tipo A	3	3	62	53	92	88	53	59	12	13	8	9	6	9	1	6	4	5	241	245	486
11	Mordidos Por Animales Transmisores de Rabia	12	6	336	222	706	451	900	644	415	439	374	404	305	425	211	310	461	619	3720	3520	7240
12	Sospecha de Rabia Humana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Sospecha de Leptospirosis	0	1	1	2	2	3	10	8	8	8	10	3	3	2	0	0	0	2	34	29	63
14	Sospecha de Dengue Grave	5	3	10	2	17	18	25	11	4	6	1	2	1	3	2	0	1	4	66	49	115
15	Sospecha de Dengue	129	138	439	376	476	419	701	528	337	244	158	126	98	56	32	55	36	59	2406	2001	4407
16	Sospecha de Paludismo	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5	2	7
17	Sospecha de Conjuntivitis Hemorrágica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	Conjuntivitis Bacteriana Aguda	1460	1258	2331	2139	1457	1299	1220	1514	1036	1433	1084	1408	706	996	496	707	802	996	10592	11750	22342

Datos preliminares

Fuente: Vigilancia epidemiológica de El Salvador (VIGEPES)

ANEXO N° 2

Procedimiento para la elaboración de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***. (23), (51), (52)



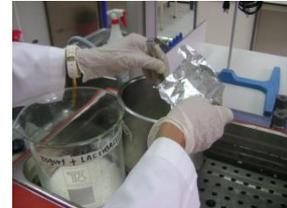
Colocar la leche en 2 recipientes idóneos y calentar a temperatura de 55°C, luego agregue 200.0g de leche en polvo + 200.0g de azúcar, disuelva



Calentar la leche a 85°C por 1-2 min y enfríe rápidamente en un baño de agua fría hasta 43 °C.



Pesar 1.0g de polvo de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y diluirlo en 99.0ml de leche de vaca



Adicione 2.0g de polvo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* a concentración de 10^6 ufc/g a cada uno de los 2 recipientes conteniendo la



Posteriormente tomar una alícuota de 2.67mL y agregarla únicamente al yogurt con *L. acidophilus* (Ver cálculos en Anexo N° 3)



A continuación incuba a temperatura de 40-45°C durante 6-7 horas para obtener la fermentación completa de la leche.

Figura N°18. Procedimiento para la elaboración de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*. (23), (51), (52).



Después del periodo de fermentación agite suavemente para romper el cuajo formado.

Dispense el yogurt en recipientes adecuados.



Refrigere el yogurt a una temperatura de 4°C.

Figura N° 18. Continuación.

ANEXO N° 3

Cálculos para *Lactobacillus acidophilus*, preparación del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* ^{(51), (52)}.

-Preparar 4L con 10^6 ufc/ml

-Para preparar 4L necesitará tener ufc:

$$10^6 \text{ ufc/mL} \times (4\text{L}) \times (1000\text{mL/L}) = 4 \times 10^9 \text{ ufc}$$

Por regla de 3, para 4L de mezcla se necesitarán Xg de *Lactobacillus acidophilus*.

$$1\text{g} \text{-----} 150 \times 10^9 \text{ ufc}$$

$$X \text{-----} 4.0 \times 10^9 \text{ ufc}$$

$$X = (1\text{g} \times 4 \times 10^9 \text{ ufc}) / (150 \times 10^9 \text{ ufc})$$

X = 0.0267g de *Lactobacillus acidophilus* (para los 4L)

Preparar 4L de leche o mezcla con 10^6 ufc/mL. Total ufc = 4000 mL x 10^6 ufc/mL = 4×10^9 ufc.

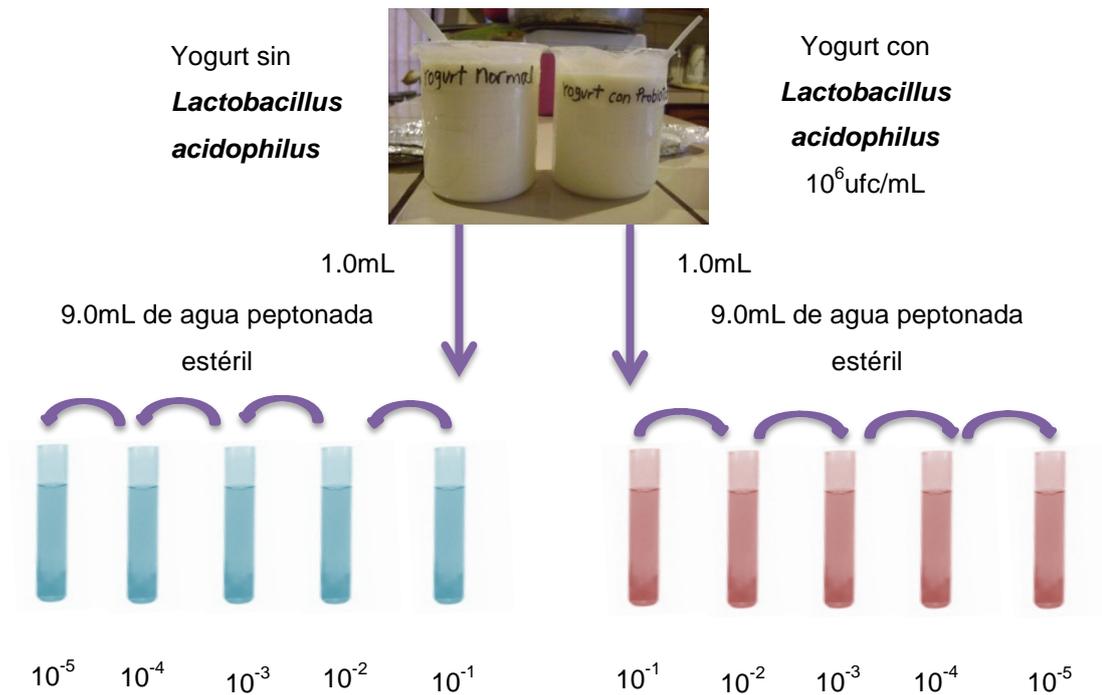
Tabla N° 19: Diluciones para la inoculación de *Lactobacillus acidophilus*.

Acción	<i>L. acidophilus</i> Cantidad	<i>L. acidophilus</i> ufc total	mL de leche o mezcla	Total mezcla (mL)	ufc / mL
Dilución	1g	1.50E+11*	99	100	1.50E+09
Dosis	2.67E+00	2.67mL			2.67mL a los 4L de leche

* 1.50E+11 es equivalente a decir 1.5×10^{11} ufc/g.

ANEXO N° 4

Conteo de bacterias ácidolácticas en el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y en el yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***. (5), (10), (49).



Realizar diluciones seriadas, y de las ultimas 3 diluciones, colocar 1.0mL en cada una de 2 placas de petri y adicione aprox. 20mL de agar MRS, homogenice en forma de 8 y deje solidificar.

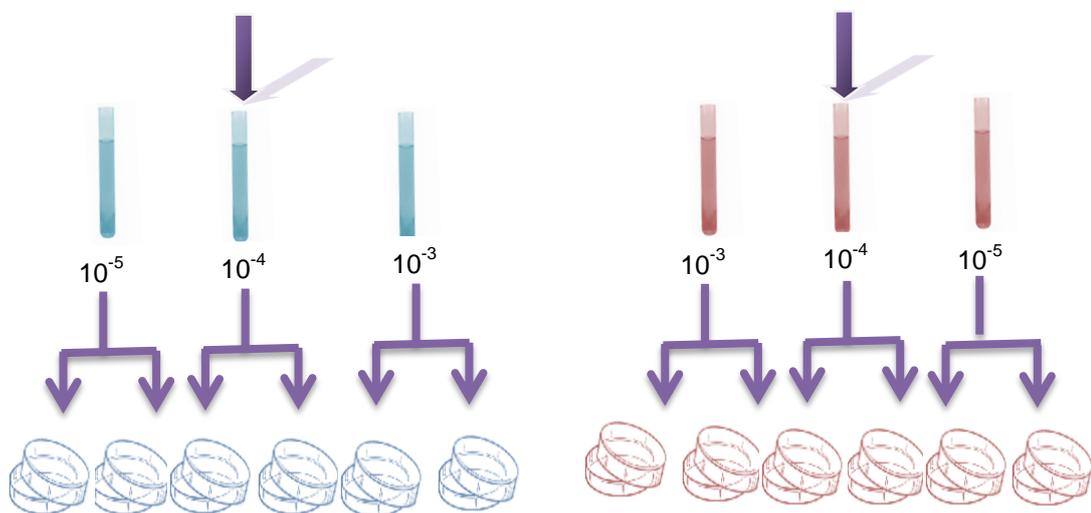
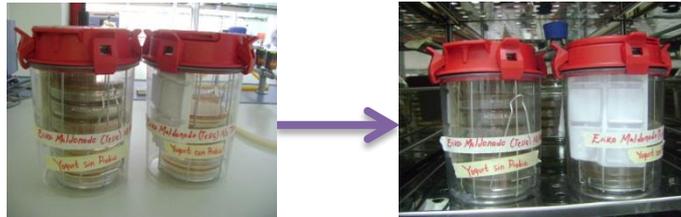
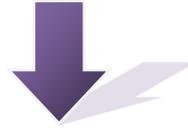
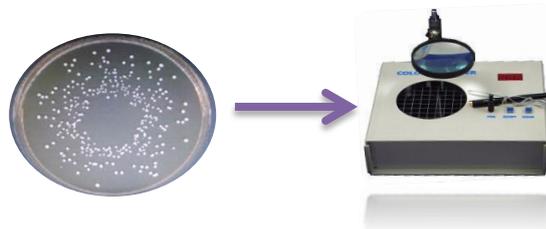


Figura N° 19. Procedimiento para realizar el conteo de las bacterias ácidolácticas presentes en el yogurt con *L. acidophilus* y en el yogurt sin *L. acidophilus*. (5), (10), (49).



Incube las placas a 37°C en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂ entre 48-72 horas.



Realice el conteo de las bacterias ácidolácticas. Efectuar el mismo procedimiento durante cada día de monitoreo (0, 8, 15, 22 y 30 días) para comprobar que el número de bacterias ácidolácticas se mantiene constante a lo largo de los 30 días del análisis.

Figura N°19. Continuación.

ANEXO N° 5



Calibrar el equipo con el buffer fosfato de pH 7.0 y posteriormente con el buffer pH 4.0.



Posteriormente de la calibración del equipo se procede a agitar la muestra hasta que esté completamente homogénea.



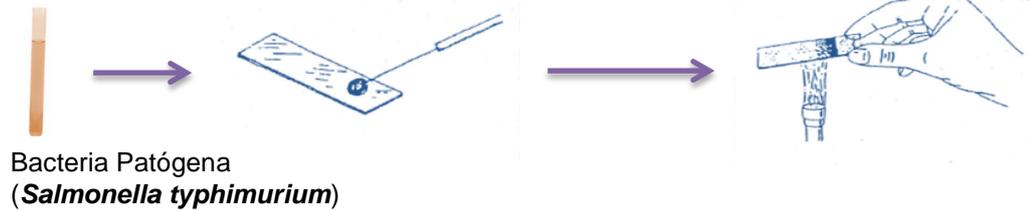
Luego se sumerge el electrodo en la muestra y se hace la medición del pH.

Figura N° 20. Medición del pH en el yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* durante los días 0, 8, 15, 22 y 30 días. ⁽³⁹⁾

ANEXO N° 6

Tinción al gram de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ^{(5), (49)}.

Preparación del frotis bacteriano:



Recoger por medio de un asa de platino, una porción del cultivo líquido de la bacteria patógena y extenderlo sobre un porta objetos de vidrio, para formar una película.

A continuación flamear el frotis para fijar la bacteria al portaobjetos y luego deje secar cerca del mechero.

Preparación de la tinción al Gram:

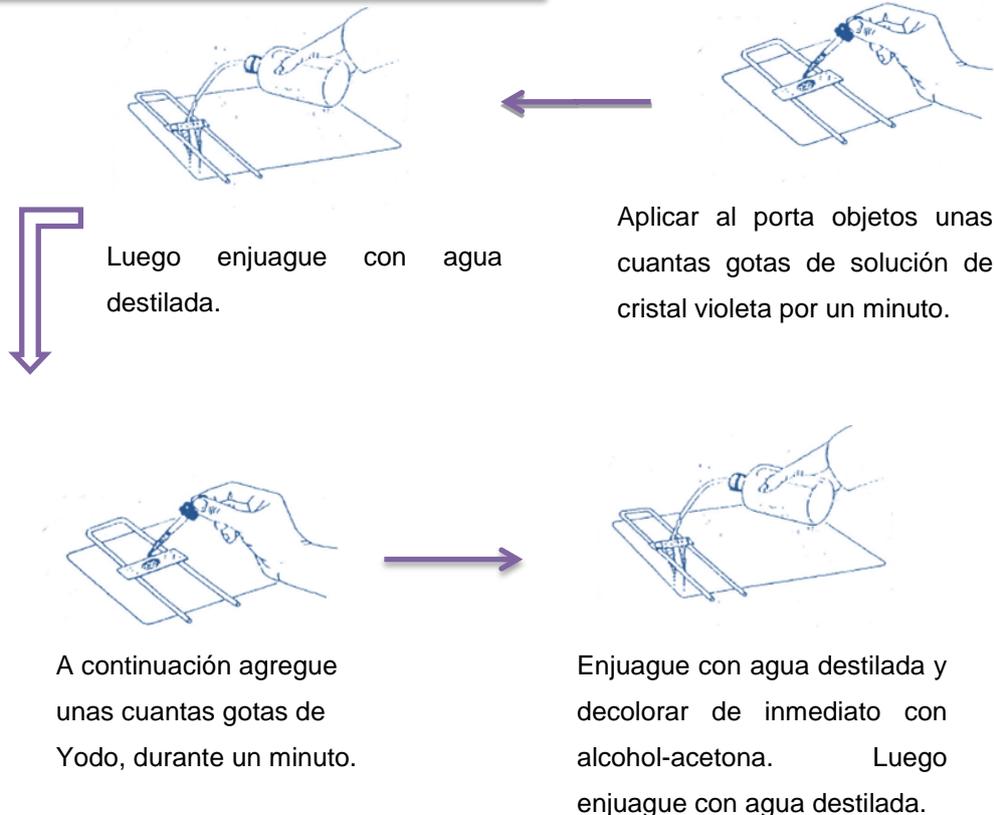
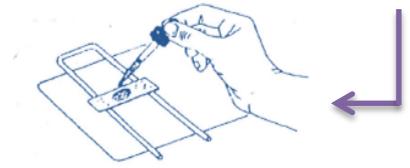


Figura N° 21. Procedimiento para realizar frotis bacteriano y tinción al Gram para la identificación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. (5), (49).



Elimine el exceso de agua y seque con papel toalla para quitar la humedad.



Después adicione gotas de safranina hasta cubrir el frotis, espere 1min. y enjuague con agua destilada



Observe al microscopio y determine la morfología y el tipo de Bacteria, (Gram (-) o Gram (+)).



Figura N° 21. Continuación

ANEXO N° 7

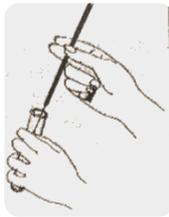
Pruebas Bioquímicas para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. (5), (6),

(49).

-Pruebas Bioquímicas



A partir de la bacteria patógena previamente identificada, realizarle las pruebas bioquímicas para comprobar si realmente se está trabajando con ***Salmonella typhimurium***.



Para la prueba de movilidad el microorganismo se inocula por picadura con el asa en punta. (Para el resto de las pruebas ver el cuadro resumen)



Incubar los tubos a 37 ± 2 °C durante 24- 48 horas.



Inocular los tubos para las diferentes pruebas bioquímicas con el microorganismo patógeno (***Salmonella typhimurium***)



Los tubos con agar TSI se inoculan por estría simple en la superficie y por picadura hasta el fondo del tubo



Realizar la lectura de los tubos mediante la comparación con tubos control, que contienen los mismos medios de cultivo pero sin microorganismo inoculado.

Figura N° 22. Procedimiento para la realización de pruebas bioquímicas de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028. (5), (6), (49).

Cuadro N°5. Resumen de Pruebas Bioquímicas para Enterobacteriáceas. (6).

(49).

Prueba	Procedimiento
Indol	Agregue 5 gotas de éter etílico +5 gotas de reactivo de Erlich.
Rojo de Metilo	Agregue 5 gotas de rojo de Metilo
Voges Proskauer	Adicione 1 mL de KOH + 15 gotas de alfa-naftol.
Citrato	Medio de color verde inicial .Cambia a azul si la prueba es (+) después de la incubación.
Movilidad	Utilizar en la siembra del microorganismo la técnica del asa en punta.
TSI	Ver coloración de bisel y fondo. Observar producción de gas y H ₂ S.



Después de realizar las Pruebas bioquímicas, siembre la bacteria patógena (***Salmonella typhimurium***) en una placa de petri con agar XLD (para ***Salmonella***) e incube a 37 °C, para tenerla lista para posteriores ensayos.



Figura N° 22. Continuación.

ANEXO N° 8

Resumen de Resultados de las pruebas bioquímicas para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Cuadro N° 6. Resultado de pruebas bioquímicas para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ^{(5), (6), (49)}.

	Prueba	Resultado
TSI	Bisel	K/A
	Fondo	GAS (+ ó -)
	H ₂ S	+
	Movilidad	+
	Lactosa	-
	Indol	-
	VP	-
	RM	+
	Citrato	+
	Ornitina	+
	Fenilalanina	-
	Urea	-
	KCN	-
	Oxidasa	-

ANEXO N° 9

Estandarización de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. ⁽⁴⁴⁾

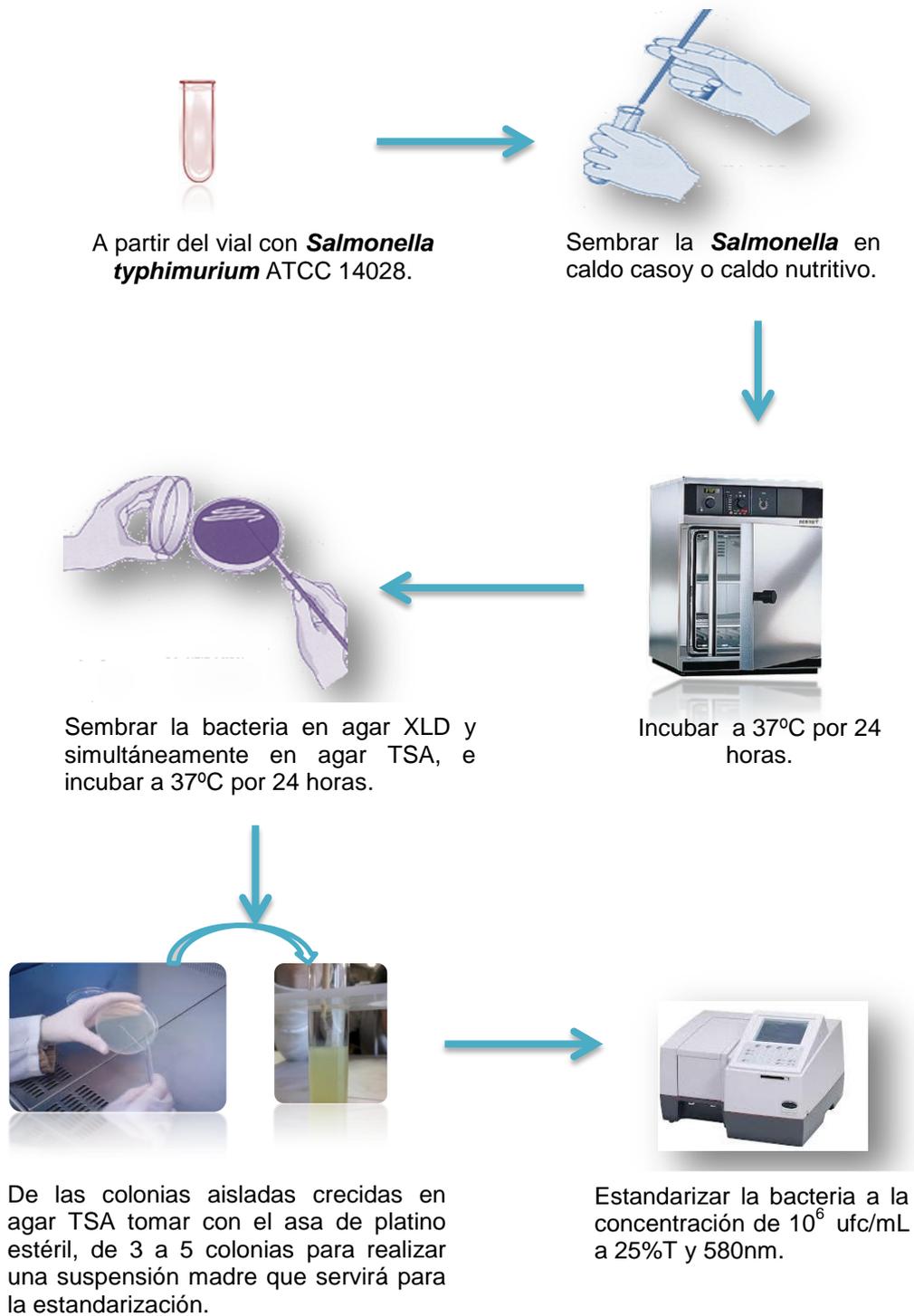
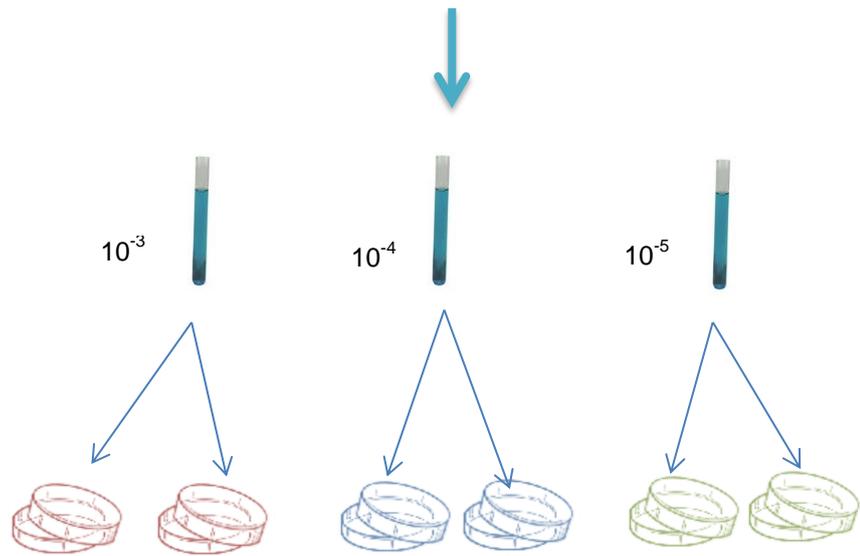
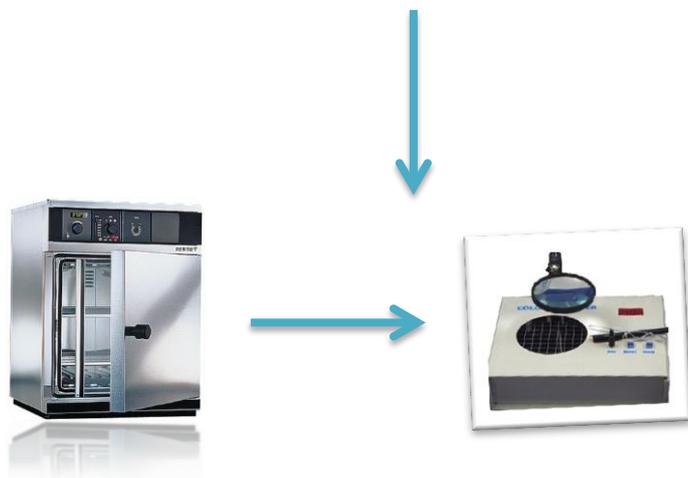


Figura N° 23. Procedimiento para realizar la estandarización de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028. ⁽⁴⁴⁾



Una vez estandarizada la bacteria patógena realice 5 diluciones con solución salina estéril y siembre por placa vertida 1.0mL de cada una de las ultimas 3 diluciones (en Agar Plate Count y simultáneamente en Agar XLD).



Incube a 37°C por 24 horas y realice el conteo de las ufc/mL para asegurar que realmente se trabajará con la concentración de 10^6 ufc/mL.

Figura N° 23. Continuación.

ANEXO N° 10

Estandarización de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. ^{(44), (49), (52)}.

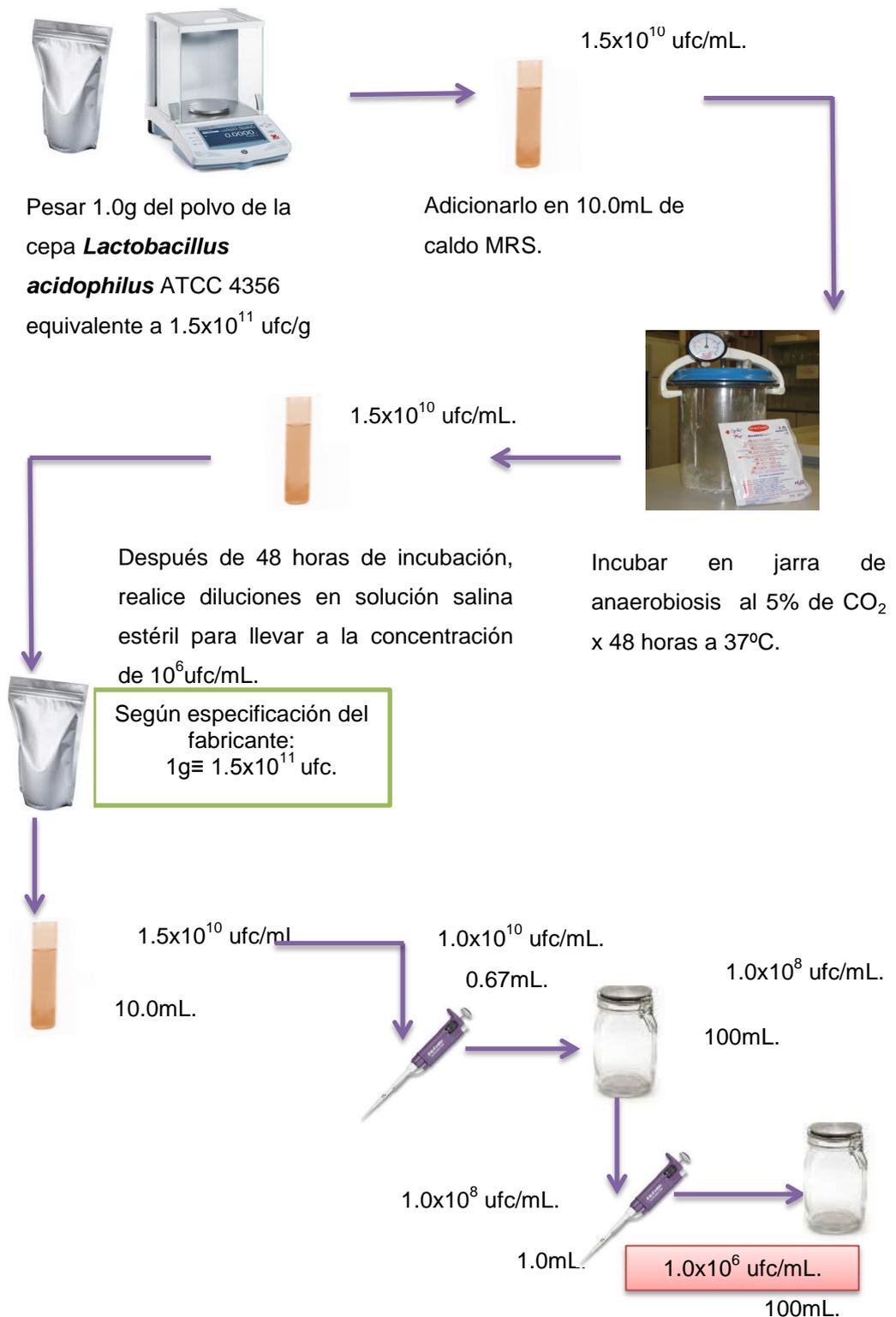


Figura N° 24. Estandarización de la cepa probiótica ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356. (44), (49), (52).

De la concentración 10^6 ufc/mL, estandarice en el espectrómetro a 580nm



A continuación realice 5 diluciones seriadas en agua peptonada estéril e inocule 1.0mL de las ultimas 3 diluciones en placas de petri y adicione aprox. 20mL de agar MRS. Incube en jarra de anaerobiosis al 5% CO_2 a 37°C 48-72h, realice el conteo de las colonias de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para verificar si la concentración de dicha cepa es de 10^6 ufc/mL.

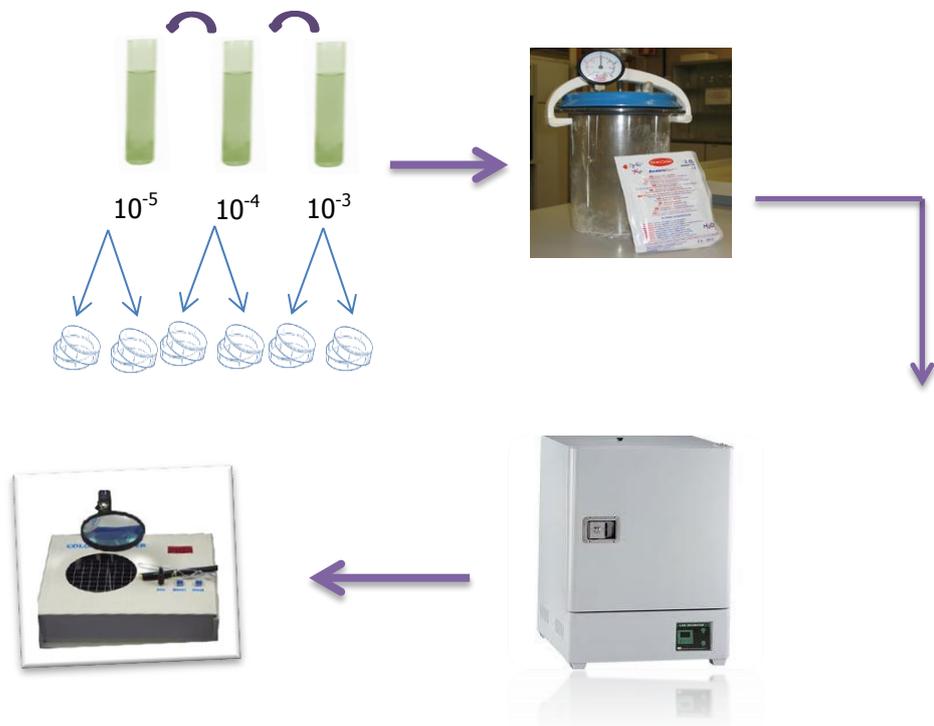
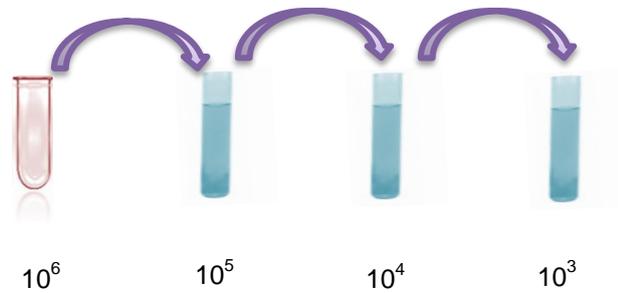


Figura N° 24. Continuación.

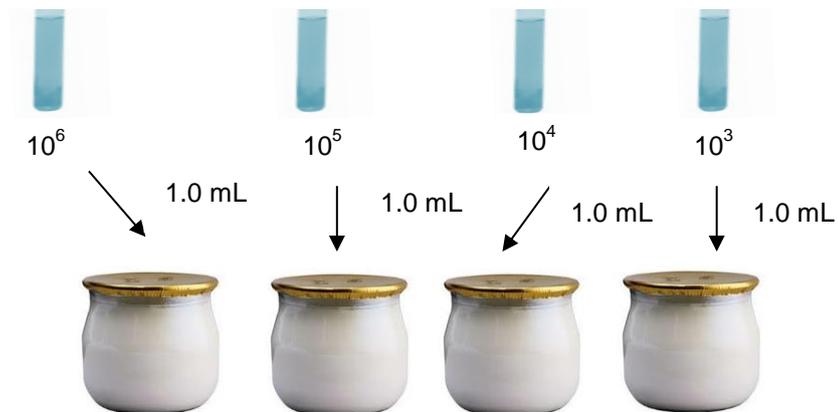
ANEXO N° 11

Determinación de la sobrevivencia de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***.^{(6), (15), (37), (49)}

A partir de la ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 estandarizada a 10^6 ufc/mL (Ver Anexo N° 9) realice diluciones con solución salina estéril para obtener las concentraciones de 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL.



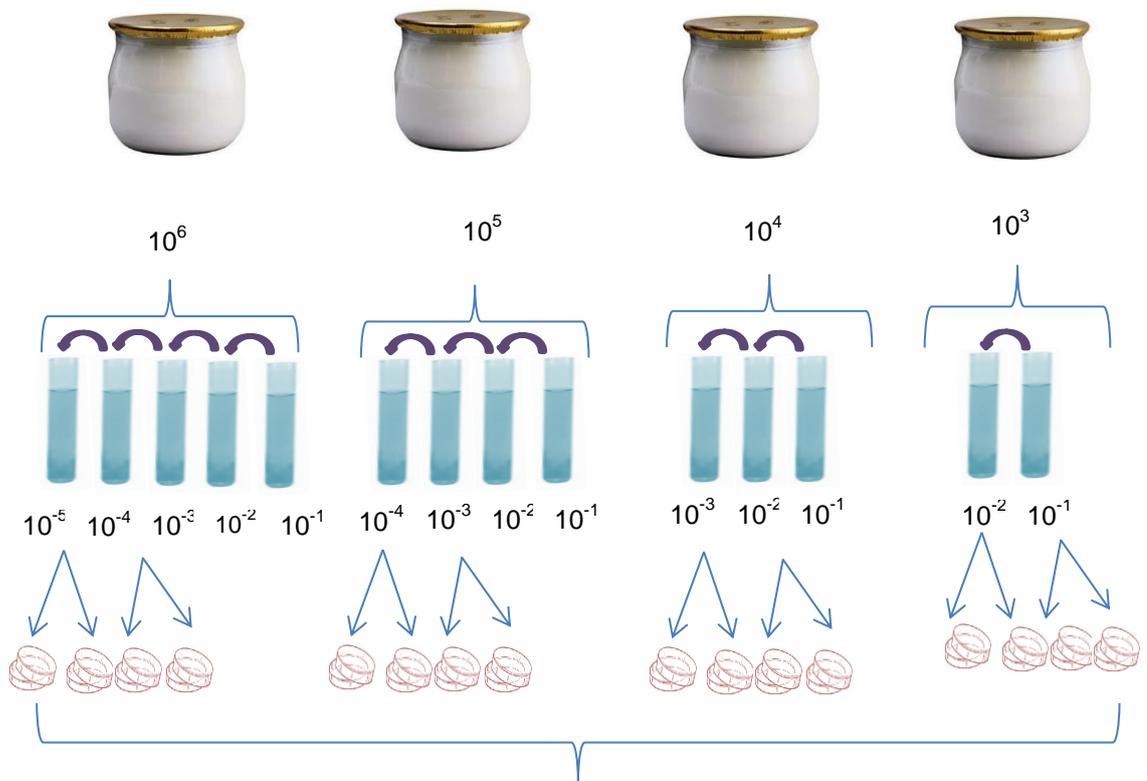
Inocule las 40 muestras de yogurt mencionadas en el (Anexo N° 12), con las concentraciones 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL.



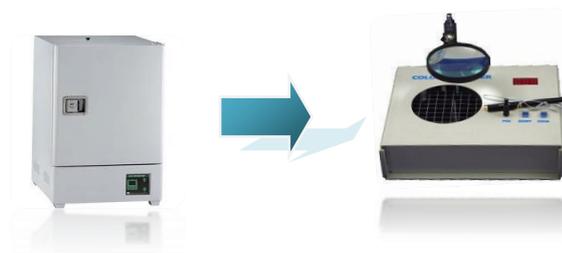
Refrigerar a 4°C y realice el monitoreo cada 0, 8, 15, 22 y 30 días. Durante cada día de monitoreo realice diluciones como a continuación se detallan, para evitar obtener conteos saturados.



Figura N° 25. Procedimiento para realizar el recuento total de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 adicionada al yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus***. (6), (15), (37), (49)



Coloque 1.0mL de las últimas dos diluciones hechas de cada concentración en placas de petri y adicione 20mL de agar XLD, homogenice en forma de ocho y deje solidificar.



A continuación incubar las placas de petri a 37°C y realizar el conteo de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028, después de 24h de incubación.

Figura N° 25. Continuación.

ANEXO N° 13

Evaluación de la tolerancia de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. ^{(1), (15), (37) (47)}.

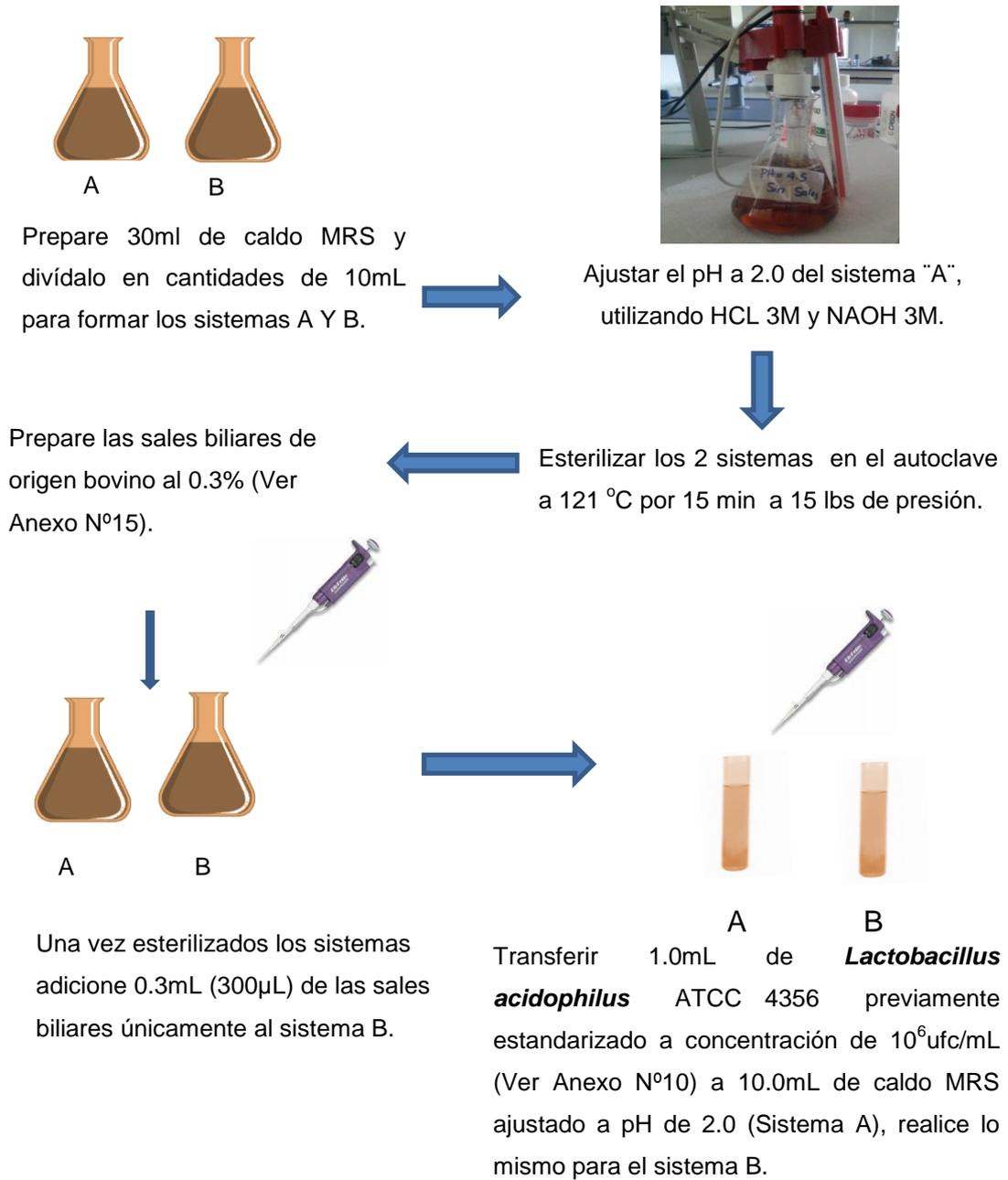
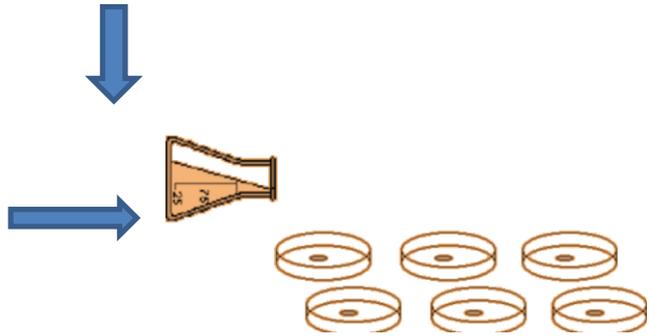


Figura N° 26. Procedimiento para realizar la simulación de la tolerancia al jugo gástrico y sales biliaras. (1), (15), (37) (47).



Incubar a 37°C x 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂,



Transferir 1.0mL de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356 crecido en caldo MRS a pH de 2.0, a cada una de dos placas de petri y adicionar 20mL del agar MRS. Realice lo mismo para el sistema B.



Realice el conteo de las colonias de ***Lactobacillus acidophilus*** ATCC 4356.



Incubar las placas de petri en condiciones de microaerofilia (en jarra de anaerobiosis al 5%de CO₂) a 37° C por 48-72 h.

Figura N° 26. Continuación.

ANEXO N° 14

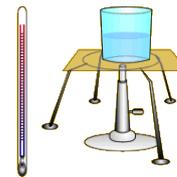
Preparación de Medios de Cultivos. ⁽⁴⁹⁾



Pesar 14.773 g. en balanza semi-analítica de Agar MRS (para conteo de ***lactobacillus.***)



Disuelva los 14.773 g en 220mL de agua destilada.



Caliente a ebullición para disolver completamente.



Luego esterilice en el autoclave a 121°C, 15lbs. de presión por 15 min.

Figura N° 27. Procedimiento para la preparación del agar MRS.



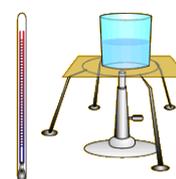
Pesar 26.50 g. en balanza semi-analítica de Agar XLD (para crecimiento de **Salmonella**.)



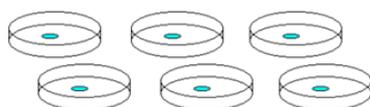
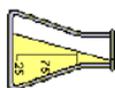
Disuelva los 26.50 g en 500 mL de agua destilada.



Colóquelo en un baño de maría a 43°C



Caliente a ebullición para disolver completamente.



Luego viértalo en las placas a utilizar.

Figura N° 28. Procedimiento para la preparación del Agar XLD.



Pesar 1.275g. en balanza semi-analítica de Sal al 0.85%.



Disuelva los 1.275g. de sal en 100 mL de agua destilada.



Agite con el agitador magnético a 500rpm hasta disolver completamente.



Distribúyalo en tubos de ensayo con rosca en cantidades de 9.0mL



Luego esterilice en el autoclave a 121°C ,15lb. de presión por 15 min.

Figura N° 29. Preparación de Solución Salina Estéril.



Pesar 10.0 g. en balanza semi-analítica de peptona bufferada.



Disuelva los 10.0 g en 500 mL de agua destilada.



Distribúyalo en tubos de ensayo con rosca en cantidades de 9.0mL



Agite con el agitador magnético a 500rpm hasta disolver completamente.

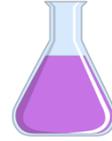


Luego esterilice en el autoclave a 121°C ,15lb. de presión por 15 min.

Figura N° 30. Preparación del Agua Peptonada Estéril.



Pesar 5.1 g. en balanza semi-analítica del polvo para preparar caldo MRS.



Suspenda los 5.1 g en 100 mL de agua destilada.



Distribúyalo en tubos de ensayo con rosca en cantidades de 9.0mL.



Mezclar con el agitador magnético a 500rpm hasta disolver completamente.



Luego esterilice en el autoclave a 121°C ,15lb. de presión por 15 min.

Figura N° 31. Procedimiento para la preparación de Caldo MRS.

ANEXO Nº 15



A partir de la bilis de buey se procedió a preparar una solución al 0.3%.



Se pesó 0.3g de bilis de buey y se colocó en 100mL de agua destilada estéril



Luego se agito hasta obtener una mezcla homogénea.

Figura Nº 32. Preparación de Sales Biliares de origen bovino al 0.3%.^{(1), (37)}

ANEXO Nº 16

Cuadros de recolección de resultados

Cuadro N°8: Recolección de datos del recuento de bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día cero.

Día cero		
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	

Cuadro N° 9: Recolección de datos del recuento de bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día ocho.

Día ocho		
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	

Cuadro N° 10: Recolección de datos del recuento de bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día quince.

Día quince		
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10^{-3}	10^2	
10^{-4}	10^1	
10^{-5}	10^0	

Cuadro N° 11: Recolección de datos del recuento de bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día veintidós.

Día veintidós		
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10 ⁻³	10 ²	
10 ⁻⁴	10 ¹	
10 ⁻⁵	10 ⁰	
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10 ⁻³	10 ²	
10 ⁻⁴	10 ¹	
10 ⁻⁵	10 ⁰	

Cuadro N° 12: Recolección de datos del recuento de bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día treinta.

Día treinta		
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10 ⁻³	10 ²	
10 ⁻⁴	10 ¹	
10 ⁻⁵	10 ⁰	
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Conteo (ufc/mL)
10 ⁻³	10 ²	
10 ⁻⁴	10 ¹	
10 ⁻⁵	10 ⁰	

Cuadro N° 13: Recolección de datos para la toma del pH del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y del yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en el día cero.

Día cero			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		

Cuadro N° 14: Recolección de datos para la toma del pH del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y del yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en el día ocho.

Día ocho			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		

Cuadro N° 15: Recolección de datos para la toma del pH del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día quince.

Día quince			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		

Cuadro N° 16: Recolección de datos para la toma del pH del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día veintidós.

Día veintidós			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		

Cuadro N° 17: Recolección de datos para la toma del pH del yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y del yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** en el día ocho.

Día treinta			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	pH	Temperatura
	10 ⁶		
	10 ⁵		
	10 ⁴		
	10 ³		

Cuadro N° 18: Recolección de datos de la sobrevivencia de ***Lactobacillus acidophilus*** al pH ácido del estómago.

Agar MRS-ph=2.0	
Concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/ml)	Conteo (ufc) después de periodo de incubación.
10 ⁶ ufc/mL	

Cuadro N° 19: Recolección de datos de la sobrevivencia de ***Lactobacillus acidophilus*** a las sales biliares de origen bovino.

Agar MRS+ sales biliares al 0.3%	
Concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/ml)	Conteo (ufc) después de periodo de incubación.
10 ⁶ ufc/mL	

Cuadro N° 20: Recolección de datos para la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día cero.

Día cero			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	
Día cero			
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	

Cuadro N° 21: Recolección de datos para la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día ocho.

Día ocho			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	
Día ocho			
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	

Cuadro N° 22: Recolección de datos para la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día quince.

Día quince			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	
Día quince			
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	

Cuadro N° 23: Recolección de datos para la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día veintidós.

Día veintidós			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	
Día veintidós			
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	

Cuadro N° 24: Recolección de datos para la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* frente a las bacterias ácidolácticas del yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y del yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* en el día treinta.

Día treinta			
Yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	
Día treinta			
Yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
# De muestra	Concentración de <i>S. typhimurium</i>	Dilución	Conteo (ufc)
	10 ⁶	10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
		10 ⁻⁶	
	10 ⁵	10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
		10 ⁻⁵	
	10 ⁴	10 ⁻²	
		10 ⁻³	
		10 ⁻⁴	
	10 ³	10 ⁻¹	
		10 ⁻²	
		10 ⁻³	

ANEXO N° 17

Ficha técnica de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. ⁽⁵¹⁾



First you add knowledge...
Επιστήμη για καλύτερα προϊόντα

PRODUCT DESCRIPTION - PD 205568-8.0EN Material no. 41111 YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

Description

A blend of defined strains of lactic bacteria for direct vat inoculation of milk, milk bases and other food applications. The culture is a freeze-dried powder.

cultures. YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU is a blend of selected strains for direct vat inoculation of manufacturing milk, these strains have been carefully chosen and combined to answer your specific needs in term of acidification, texture and taste.

Usage levels

Product	Dose
yogurt	10 - 20 DCU / 100 l of vat milk
Fermented milk	10 - 20 DCU / 100 l of vat milk
yogurt	38 - 75 DCU / 100 gallons of vat milk
Fermented milk	38 - 75 DCU / 100 gallons of vat milk

-YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU gives quick acidification to pH 4.70 - 4.60 and then, a slower acidification to reach lower pH. This characteristic allows an exceptional pH stabilisation during the end of fermentation processing time and the shelf life. This enables a handling of large tank fermentations, a flexibility in the management of the cooling step, a lower post-acidification.

The quantities of inoculation indicated should be considered as guidelines.

-YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU contains exopolysaccharide producing strains that enable a smooth and thick texture: possibility to perform at 43°C as well as 37°C, formulation cost-saving, reduction of milk protein content, reduction/no need of E.labelling thickening agents, excellent resistance to shear stress at the cooling step and during storage before conditioning, good syneresis control, good performance on recipe with sugar.

Directions for use

Sanitize sachet with chlorinated water or appropriate sanitizer before opening (blot dry with a paper towel if necessary to prevent clumping around sachet opening). Once sachet has been opened add culture directly to the pasteurized mix. Agitate for approx. 30 minutes on low speed.

-End user benefits: safer end-products, controlled taste and texture consistency, mild flavour and low post-acidification during shelf life, no water release when consumed. A phage alternative is available on request.

Recommended incubation temperature: 35 - 45°C (95-113°F), depending upon set time desired by manufacturer.

Composition

Streptococcus thermophilus
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

Carrier:
Sucrose
Maltodextrins

Physical/chemical specifications

Quantitative/Activity standard

Test medium:

Sterilised reconstituted milk (10% solids)
Heated 20 min at 110°C. Standardised to pH 6.60.

Properties

-Processing benefits: freeze dried form facilitates the storage and handling of

Temperature: 42 °C
Inoculation rate: 20 DCU / 100 l

Delta pH: 1.35
 Time to reach the delta <= 3.5 hours

Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods

Non-lactic acid bacteria < 500 CFU/g
 Enterobacteriaceae < 10 CFU/g
 Yeasts and Moulds < 10 CFU/g
Enterococci < 100 CFU/g
 Coagulase-positive
Staphylococci < 10 CFU/g
Listeria monocytogenes neg. / 25 g
Salmonella spp. neg. / 25 g

Analytical methods available upon request

Storage

18 months from date of production at <=4°C

Packaging

Sachets made with three layers of material (polyethylene, aluminium, polyester).

Quantity

Selling unit: 1 carton containing 50 sachets.

Purity and legal status

YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU complies with all EU food legislations.

Other local regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

Safety and handling

SDS is available on request.

Halal status

certified by Halal Food Council of Europe (HFCE)

Allergens

Below table indicates the presence of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	wheat	
	X	other cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	Eggs	
	X	Fish	
	X	Peanuts	
	X	Soybeans	
	X	milk (including lactose)	
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	
	X	Lupin	
	X	molluscs	

Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

Additional information

ISO 9001 certified
 ISO 22000 certified
 FSSC 22000 certified

GMO status

YO-MIX™ 495 LYO 500 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

ANEXO N° 18

Ficha técnica de *Lactobacillus acidophilus*.⁽⁵²⁾

Certificado de Análisis

Fecha: 05 Jul 2013

n/ ref.: 0

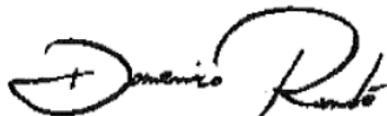
s/ ref.:

Material:	1248156	HOWARU Dophilus LYO 40 DCU
Nº de lote:	4111910180	Fecha de caducidad: 18 Feb 2014
		Fecha de producción: 22 Ago 2012

Prueba	Resultado	Especificación	Unidad
net weight +/- 0,1 g:	22.0		
Microbiological quality control:			
Cell count, CFU / g*	2.9E+11		/g
Cell count, CFU / sachet	6.4E+12	> 4.0E+12	
Non-lactic acid bacteria	< 100	< 100	/g
Enterobacteriaceae	< 10	< 10	/g
Yeasts and moulds	< 10	< 10	/g
Enterococci	< 10	< 10	/g
Coagulase-positive staphylococci	< 10	< 10	/g
Salmonella spp. neg. / 25 g	Negativo	Negativo	
Listeria monocytogenes neg. / 25 g	Negativo	Negativo	

Comentarios

Este certificado se genera automáticamente



Dr. Domenico Randò

Departamento del Control de calidad

ANEXO N° 19

Cálculos Estadísticos. (2), (22), (36), (45).

-Resultados estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) para las concentraciones de 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc/mL

Tabla N° 20: Análisis de varianza para el recuento de *Salmonella typhimurium* a concentración de 10^5 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	784000000	1	784000000	0.302702	0.59721511	5.317655072
Dentro de los grupos	2.072E+11	8	2.59E+10			
Total	2.1504E+11	9				

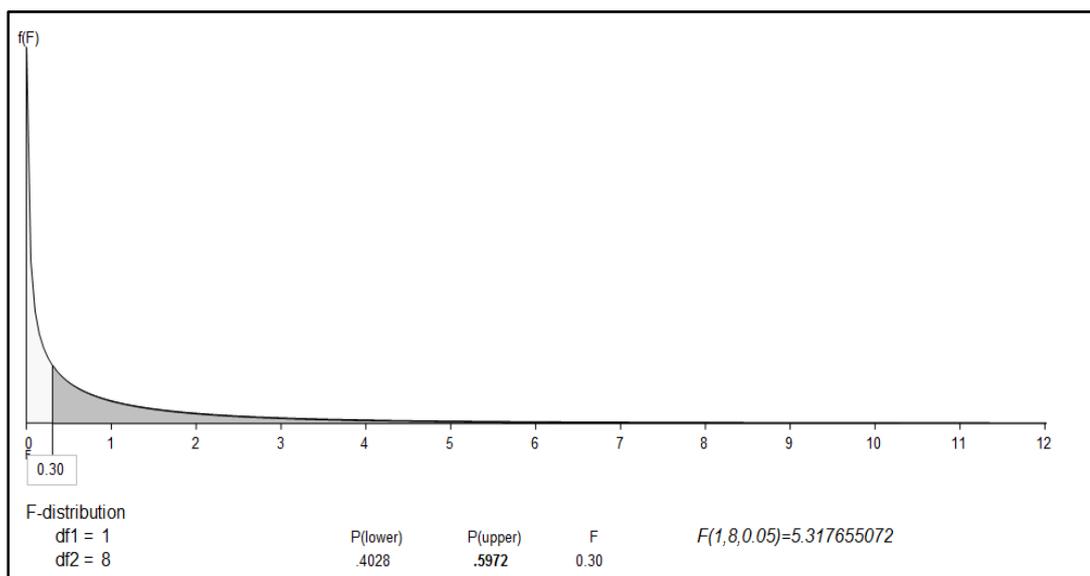


Figura N° 32: Curva de distribución F para la comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 ufc/mL.

No se rechaza H_0 , ya que el valor de F calculado es menor que el F crítica. No existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Tabla N° 21: Análisis de varianza para el recuento de **Salmonella typhimurium** a concentración de 10^4 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	19600000	1	19600000	0.18386492	0.67938516	5.31765507
Dentro de los grupos	852800000	8	106600000			
Total	872400000	9				

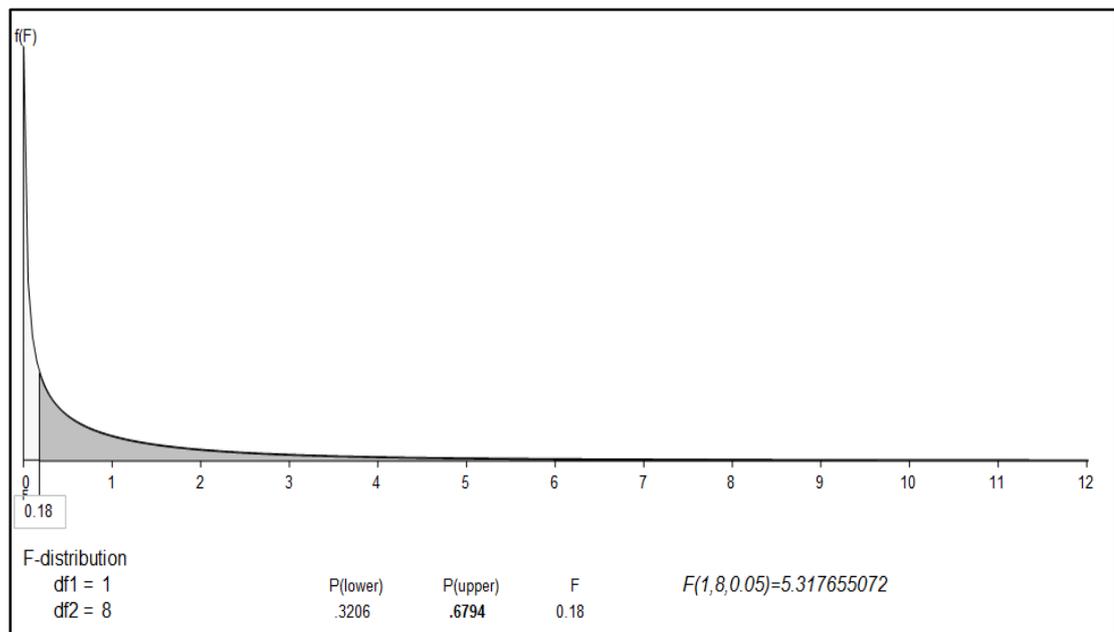


Figura N° 33: Curva de distribución F para la comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 ufc/mL.

No se rechaza H_0 , ya que el valor de F calculado es menor que el F crítica. No existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Tabla N° 22: Análisis de varianza para el recuento de **Salmonella typhimurium** a concentración de 10^3 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	gl	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	64000	1	64000	0.1509434	0.70777059	5.31765507
Dentro de los grupos	3392000	8	424000			
Total	3456000	9				

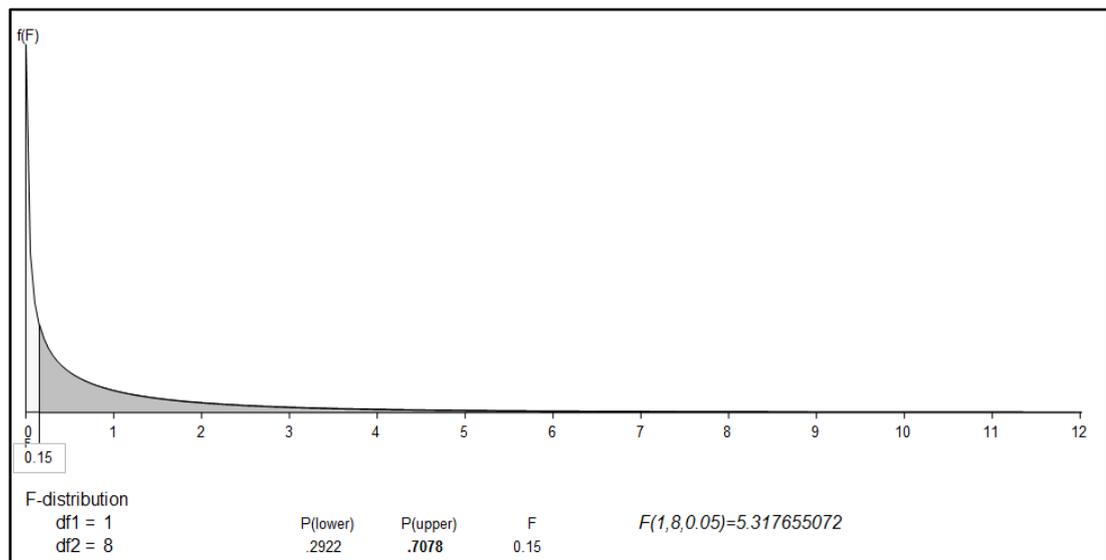


Figura N° 34: Curva de distribución F para la comparación de ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 ufc/mL.

No se rechaza H_0 , ya que el valor de F calculado es menor que el F crítica. No existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

ANEXO N° 20

Valores críticos de la distribución $F_{(22), (39)}$.

Tabla N° 23. Valores críticos de F para los cuales el área bajo la curva a la derecha es igual a 0.05. ^{(22), (39)}.

$U_2 \backslash U_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242
2	18.5	19.00	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83

U_1 = Grados de Libertad del numerador.

U_2 = Grados de Libertad del denominador.

Tabla N° 23. Continuación.

$U_1 \backslash U_2$	12	15	20	24	30	40	60	120	00
1	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,50
3	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8-53
4	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,37
0	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,41
12	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34^	2,30	2,25	2,21
14	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	196
18	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	197	192
19	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	198	193	188
20	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	195	190	184
21	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	196	192	187	181
22	2,23	2,15	2,07	2,03	198	194	189	184	178
23	2,20	2,13	2,05	2,01	196	191	186	181	176
24	2,18	2,11	2,03	1,98	194	1,89	184	179	173
25	2,16	2,09	2,01	1,96	192	1,87	182	177	171
30	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	179	174	168	162
40	2,00	1,92	1,84	1,79	174	169	164	158	151
60	1,92	1,84	1,75	170	165	159	153	147	139
120	183	1,75	1,66	161	155	150	143	135	125
00	1,75	1,67	1,57	152	146	139	132	122	100

U_1 = Grados de Libertad del numerador.

U_2 = Grados de Libertad del denominador.

