

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS



EFEECTO ANTAGÓNICO DE YOGURT CON *Lactobacillus acidophilus*
SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS: *Escherichia coli*,
Salmonella enterica, *Vibrio cholerae*

PRESENTADO POR:

ELENA PATRICIA BARAHONA AVALOS
ROSA CANDIDA ZULETA CHÁVEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

ABRIL DE 2014

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

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

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZABALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITÉ DE TESIS

MSc María Evelin Sánchez de Ramos

Miembro Docente Director

MSc Andrés Wilfredo Rivas

Miembro Comité de Tesis

MSc Coralia de los Ángeles González de Díaz

Miembro Comité de Tesis

COORDINACION DEL PROGRAMA DE POSGRADO

MSc Edith Alicia de Torres

Jefe de Postgrado Facultad Química y
Farmacia

MSc Coralia de los Ángeles González

Coordinadora Maestría

Lic. Elena Patricia Barahona Avalos

Estudiante

Lic. Rosa Cándida Zuleta Chávez

Estudiante

DEDICATORIA

A DIOS: Por darme la fortaleza cada día para seguir adelante sin importar la dificultad y por guiar mi camino por el bien.

A mis Padres: Rafael Barahona Castillo y María Alicia Avalos por todo su amor, apoyo, sus consejos y por hacer cada día de mi vida la hija más feliz por tenerlos a mi lado.

A Mi Hermana y mis sobrinitas: Alicia Mercedes Barahona, Alejandra y Elizabeth por todo el apoyo amor y cariño que le dan a mi vida.

A Mi Novio Albertico Portillo Córdova: Por su apoyo en esta nueva etapa de mi vida de conocer algo diferente.

A Mi Compañera de Tesis: Rosy Zuleta por su amistad sincera e incondicional y por todo su apoyo brindado aun en los momentos difíciles.

A mi Docente Director: MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos por orientarnos y siempre impulsarnos a seguir para terminar el objetivo trazado; y brindarnos su conocimiento para el buen desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Miembro de Comité de Tesis MSc. ANDRES WILFREDO RIVAS, MSc CORALIA DE LOS ANGELES GONZALEZ DE DIAZ: Por todos los consejos y conocimientos proporcionados para el desarrollo de la investigación.

Licda. Elena Patricia Barahona Avalos

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones recibidas durante todos estos años.

A mi familia especialmente a mis padres, hermana, tías, primas y sobrinos por estar siempre presentes, acompañándome y dándome su apoyo incondicional y sobre todo por siempre cuidar de mí.

A mi Asesora de Tesis MSc. María Evelyn de Ramos por su apoyo académico y toda la orientación que nos brindó.

A mi compañera de Tesis Elena Barahona por todo su apoyo y amistad brindada para culminar con éxito nuestro proyecto

A mis Amigas y Compañeras de trabajo por su apoyo, comprensión y estima.

A nuestros miembros de Comité de Tesis MSc. Andrés Rivas y MSc. Coralia González de Díaz por brindarnos sus recomendaciones y apoyo para el buen desarrollo de nuestro proyecto.

Licda. Rosa Cándida Zuleta Chávez

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 introducción	xix
Capítulo II	
2.0 objetivos	22
Capítulo III	
3.0 Marco teórico	24
3.1 Definición de probióticos	25
3.2 Historia de los probióticos	26
3.3 Efecto de los probióticos sobre la salud	27
3.4 Bacterias ácido lácticas	28
3.5 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
3.6 Criterios para la definición de microorganismos probióticos	31
3.7 Yogurt como sustrato	31
3.8 Mecanismos de acción de las bacterias ácido lácticas	32
3.9 Interacción de los probióticos con la microflora intestinal	32
3.10 Caracterización de las cepas bacterianas	33
3.10.1 <i>Escherichia coli</i>	33
3.10.2 <i>Salmonella enterica</i>	34
3.10.3 <i>Vibrio cholerae</i>	35

Capitulo IV

4.0	Diseño Metodológico	37
4.1	Metodología de la investigación	37
4.2	Metodología de la preparación de yogurt natural	38
4.2.1	Calculo de la concentración del cultivo probiótico	39
4.2.2	Control de calidad	41
4.3	Aislamiento de patógenos	42
4.3.1	Estandarización de la concentración de patógenos	42
4.3.2	Proceso de estandarización	43
4.4	Definición de los procesos experimentales	43
4.5	Proceso de inoculación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en yogurt	44
4.5.1	Cuantificación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en yogurt	45
4.5.2	Aislamiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	45
4.6	Inoculación de bacterias patógenas en yogurt	46
4.7	Medición de la población de bacterias patógenas	47
4.7.1	Medición de la población de <i>E. coli</i> ATCC 25922	47
4.7.2	Medición de la población de <i>Salmonella enterica</i>	49
4.7.3	Medición de la población de <i>Vibrio cholerae</i>	50
4.8	Identificación de bacterias patógenas con pruebas bioquímicas	51

Capítulo V

5.0	Resultados y discusión de resultados	55
5.1	Preparación de yogurt natural	55

5.1.1	Yogurt y sus características sensoriales	55
5.1.2	Control de calidad al yogurt preparado	56
5.2	Inoculación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en el yogurt	57
5.2.1	calculo de la concentración del cultivo probiótico	57
5.2.2	Cuantificación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en yogurt	58
5.3	Identificación y aislamiento de patógenos	61
5.3.1	Identificación y aislamiento de <i>E. coli</i>	61
5.3.2	Identificación y aislamiento de <i>Salmonella enterica</i>	63
5.3.3	Identificación y aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>	64
5.4	Estandarización de las concentraciones de patógenos	66
5.4.1	Estandarización de la bacteria patógena <i>E. coli</i>	66
5.4.2	Estandarización de la bacteria patógena <i>Salmonella enterica</i>	68
5.4.3	Estandarización de la bacteria patógena <i>Vibrio Cholerae</i>	70
5.5	Inoculación de bacterias patógenas en el yogurt	72
5.5.1	Determinación de la sobrevivencia de <i>E. coli</i> ATCC 25922 al yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	72
5.5.2	Determinación de la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028 al yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	77

5.5.3	Determinación de la sobrevivencia de <i>Vibrio cholerae</i> al yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	81
5.6	Medición de pH en ambos tipos de yogurt con y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	87
5.7	Análisis estadístico	88
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	94
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	97
Bibliografía		
Glosario		
Anexos		

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág. N°
1. Procesos experimentales	44
2. Guía de Inoculación-Experimental	47
3. Evaluación sensorial y fisicoquímica de dos tipos de yogurt preparado	56
4. Conteos de <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los 30 días de estudio	60
5. Resultados de tinción al gram y pruebas bioquímicas para <i>E. coli</i> ATCC 25922	62
6. Resultados de tinción al gram y pruebas bioquímicas para <i>Salmonella enterica</i> ATCCA 14028	64
7. Resultados de tinción al gram y pruebas bioquímicas para <i>Vibrio cholerae</i>	65
8. Resultados de la estandarización de <i>E. coli</i> ATCC 25922	67
9. Resultados de la estandarización de <i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	69
10. Resultados de la estandarización de <i>Vibrio cholerae</i>	71
11. Resumen de los recuentos de <i>E. coli</i> durante el monitoreo de 30 días en yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	73

12. Resumen de los recuentos de *E. coli* durante el monitoreo de 30 días en yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* 73
13. Comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g 74
14. Comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g 75
15. Resumen de los recuentos de *Salmonella enterica* durante el monitoreo de 30 días en yogurt con *Lactobacillus acidophilus* 77
16. Resumen de los recuentos de *Salmonella enterica* durante el monitoreo de 30 días en yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* 78
17. Comparativo de recuentos observados de *Salmonella enterica* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g 78
18. Comparativo de recuentos observados de *Salmonella enterica* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g 80

19. Resumen de los recuentos de <i>Vibrio cholerae</i> durante el monitoreo de 30 días en yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	81
20. Resumen de los recuentos de <i>Vibrio cholerae</i> durante el monitoreo de 30 días en yogurt sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	82
21. Comparativo de recuentos observados de <i>Vibrio cholerae</i> en el yogurt con y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g	82
22. Comparativo de recuentos observados de <i>Vibrio cholerae</i> en el yogurt con y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g	84
23. Comparativo de los tres patógenos a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g en ambos tipos de yogurt	85
24. Comparativo de los tres patógenos a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g en ambos tipos de yogurt	86
25. pH de ambos tipos de yogurt con y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> y patógenos a concentración de 1.0×10^3 UFC/g	87
26. pH de ambos tipos de yogurt con y sin <i>Lactobacillus acidophilus</i> y patógenos a concentración de 1.0×10^6 UFC/g	88

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. Dilución de cultivo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	40
2. Yogurt almacenado en frascos	41
3. Colonias de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en agar MRS	59
4. Recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante los treinta días de monitoreo	60
5. Colonias de <i>E. coli</i> en agar EMB	61
6. Colonias de <i>Salmonella enterica</i> en agar <i>salmonella Shigella</i>	63
7. Colonias de <i>Vibrio cholerae</i> en agar TCBS	65
8. Curva de estandarización de la concentración de <i>E. coli</i>	67
9. Curva de estandarización de la concentración de <i>Salmonella enterica</i>	69
10. Curva de estandarización de la concentración de <i>Vibrio cholerae</i>	71
11. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de <i>E. coli</i> 1.0×10^3 UFC/g	75
12. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de <i>E. coli</i> 1.0×10^6 UFC/g	76
13. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de <i>Salmonella enterica</i> 1.0×10^3 UFC/g	79

14. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de ***Salmonella enterica*** 1.0×10^6 UFC/g 80
15. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de ***Vibrio cholerae*** 1.0×10^3 UFC/g 83
16. Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de ***Vibrio cholerae*** 1.0×10^6 UFC/g 84

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Figura N° 1 Diagrama de flujo para la elaboración de yogurt
2. Figura N° 2 Diagrama metodológico-elaboración de yogurt
3. Figura N° 3 Preparación de la concentración de ***Lactobacillus acidophilus***
4. Figura N° 4 Diagrama fase de la preparación previa al estudio de inhibición
5. Figura N° 5 Diagrama de estandarización de la concentración de patógenos
6. Figura N° 6 Diagrama aislamiento de ***E. coli*** ATCC 25922
7. Figura N° 7 Diagrama aislamiento de ***Salmonella enterica*** ATCC 14028
8. Figura N° 8 Diagrama aislamiento de ***Vibrio cholerae***
9. Figura N° 9 Diagrama inoculación de ***E. coli*** ATCC 25922 en yogurt
10. Figura N° 10 Diagrama inoculación de ***Salmonella enterica*** ATCC 14028
11. Figura N° 11 Diagrama inoculación de ***Vibrio cholerae*** en yogurt
12. Figura N° 12 Diagrama cuantificación de ***Lactobacillus acidophilus*** en yogurt
13. Figura N° 13 Diagrama medición de ***E. coli*** ATCC 25922
14. Figura N° 14 Diagrama medición de ***Salmonella enterica*** ATCC 14028

15. Figura N° 13 Diagrama medición de ***Vibrio cholerae***
16. Cálculos análisis estadístico
17. Norma Salvadoreña Oficial NSO 67.01.10:08 Productos lácteos. Yogurt, especificaciones (primera actualización)

RESUMEN

El trabajo de investigación se fundamentó en evaluar el efecto inhibitorio de la cepa de cultivo probiótico *Lactobacillus acidophilus* en yogurt sobre tres cepas patógenas *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*. El yogurt usado fue de dos tipos: sin probiótico adicionado y con probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Se inocularon concentraciones 10³ y 10⁶ UFC/g de cada bacteria patógena en los dos diferentes tipos de yogurt y se mantuvo en refrigeración durante 30 días, realizando los recuentos bacterianos cada 5 días.

El objetivo de la investigación fue el de Evaluar el efecto antagónico de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* sobre microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*.

Resultados: Los resultados del estudio confirmaron el efecto antagónico que poseen los cultivos probióticos sobre patógenos como *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*, bacterias potencialmente patógenas para el ser humano y que pueden estar contenidas en los alimentos. Se demostró además que en ambos tipos de yogurt con y sin probiótico se produce efecto inhibitorio de las tres cepas patógenas en estudio pero que en el yogurt con probiótico el efecto antagónico inhibitorio se logró en menor tiempo.

Conclusión: Se demostró la capacidad que tiene el yogurt con la cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* para inhibir y competir contra ciertos patógenos intestinales.

Recomendación

El consumidor debe asegurarse de las condiciones higiénicas y de las buenas prácticas de elaboración del producto ya que se evidencio que aun en condiciones de almacenamiento en refrigeración los patógenos en estudio sobreviven lo que representa un peligro potencial a la salud de consumidor

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de los cultivos probióticos posee gran relevancia en la industria de alimentos ya se han demostrado diversos efectos benéficos para el ser humano.

Cada año en diversos países como Costa Rica se han llevado a cabo investigaciones para evaluar el efecto de cultivos probióticos adicionados a Yogurt comercial sobre una población conocida de patógenos; con la finalidad de comprobar la actividad antagónica de los probióticos sobre bacterias patógenas.

La presente investigación tubo como interés desarrollar una formulación de yogurt con probiótico de manera artesanal de tal manera que se pueda incorporar el uso de ***Lactobacillus acidophilus*** como ingrediente funcional de yogurt y sobre todo comprobar In vitro la capacidad de esta cepa para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en diferentes concentraciones de ***Escherichia coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae***.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Se analizaron dos tipos de yogurt, uno que fue formulado con probiótico (***Lactobacillus acidophilus***) y uno que no contiene probiótico únicamente ***Streptococcus termophilus*** y ***Lactobacillus bulgaricus*** como cultivos iniciadores a los cuales se les inoculó concentraciones de 10^3 y 10^6 de bacterias patógenas de ***Escherichia coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae***, se analizaron con una frecuencia de medición de: día 0, 5, 10, 15, 20 y días 30 y se mantuvieron en condiciones de refrigeración entre 2 - 6°C durante la vida útil del yogurt de 30 días

El conteo microbiano se realizó en ambos tipos de yogurt: yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** (únicamente bacterias iniciadoras) y se realizó el recuento de las cepas patógenas ***Escherichia coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae*** a concentraciones de 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g.

Durante los recuentos de las bacterias patógenas ***Escherichia coli***, ***Salmonella entérica*** y ***Vibrio cholerae*** también se determinó el pH usando un potenciómetro, las lecturas fueron realizadas con las frecuencias de 0, 5, 10, 15, 20 y 30 días manteniendo el yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y sin ***Lactobacillus acidophilus*** en condiciones de refrigeración entre 2 – 6°C.

El objetivo de la investigación fue el de determinar si el yogurt formulado con el cultivo probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** presenta actividad antagónica sobre el crecimiento de las cepas patógenas (***Escherichia coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae***), así mismo determinar la capacidad inhibitoria del crecimiento de las cepas patógenas (***Escherichia coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae***) a dos concentraciones (1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g).

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antagónico de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* sobre microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Desarrollar una receta de yogurt natural adicionando una cepa de cultivo probiótico: *Lactobacillus acidophilus*.
- 2.2.2 Comparar la capacidad inhibitoria del crecimiento a diversas concentraciones de las cepas patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*) por acción del yogurt con probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) y sin probiótico (únicamente con cepas iniciadoras *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).
- 2.2.3 Analizar durante 30 días a condiciones de almacenamiento entre 2- 6 °C, el efecto inhibitorio del crecimiento de los patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*) en estudio.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

En la actualidad el uso de los cultivos probióticos tienen más notoriedad en la industria de alimentos, ya se han demostrado diversos efectos benéficos para el ser humano y también se ha encontrado que tienen un número de propiedades para implementar su uso en salud y en investigaciones clínicas ⁽³⁾. Algunos de los efectos benéficos atribuidos son el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal, estimulación del sistema inmune, competencia contra patógenos ⁽³⁰⁾

En los últimos años se han realizado investigaciones enfocadas en introducir especies bacterianas beneficiosas para restablecer el equilibrio de la flora intestinal y prevenir enfermedades ⁽³⁰⁾, basado en ello surge así el interés de incorporar microorganismos probióticos como ingrediente funcional a diversos alimentos.

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El concepto de alimentos funcionales tiene su origen en la relación existente entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades. Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos ⁽³⁵⁾.

La cepa probiótica en el alimento debe encontrarse en altas cantidades y deben estar activos al momento de ser ingeridos para que produzca el efecto

beneficioso ⁽³⁾, Es así que se atribuye que el mecanismo para actuar dentro del organismo humano se debe a su capacidad para instalarse en la mucosa intestinal y producir sustancias inhibitorias que combaten a patógenos potenciales ⁽³⁰⁾.

El ***Lactobacillus acidophilus*** se considera una bacteria probiótica beneficiosa para el humano. Estas bacterias habitan en los intestinos protegiendo al huésped del efecto nocivo de otros microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos. Este microorganismo producto de su metabolismo produce ácido láctico, peróxido de hidrógeno y otros subproductos que crean un medio incompatible para microorganismos patógenos ⁽³⁹⁾.

3.1 DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos vivos que se adicionan a un alimento, permaneciendo activos en el intestino y ejerciendo importantes efectos fisiológicos ⁽²⁸⁾

Los probióticos al ser ingeridos en cantidades suficientes y estar viables en el organismo tienen el efecto de contribuir al equilibrio de la flora bacteriana intestinal y favorecer el sistema inmunitario del huésped ⁽¹⁴⁾.

La viabilidad y estabilidad de los organismos probioticos son características que se deben mantener durante el proceso de fabricación y hasta la vida de anaquel, para asegurar que se encuentren en dosis y concentraciones suficientes y de esta manera asegurar que al ser consumidos se mantengan vivos a través del tracto gastrointestinal y puedan colonizar el intestino delgado y por consecuencia puedan ejercer su función biológica en el huésped

Los probióticos no son microorganismos patógenos. De acuerdo con la Organización Mundial para la Salud (OMS) la definición de probiótico es

"Microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped". (12).

Según la Norma salvadoreña NSO 67.01.10:08 Yogurt Especificaciones, los probióticos "Son microorganismos que se adicionan a un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen efectos fisiológicos. Contribuyen al equilibrio de la flora del huésped". (28).

3.2 HISTORIA DE LOS PROBIÓTICOS

El término probiótico es una palabra que significa "a favor de la vida" y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, un científico Ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado (1907) afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (12).

Para entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias "bífidas" eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (12)

Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no se usó hasta 1960, para designar las sustancias

producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos.⁽¹²⁾

3.3 EFECTO DE LOS PROBIOTICOS SOBRE LA SALUD

Los probióticos ejercen acciones diversas sobre la salud mediante distintos mecanismos de acción: Mejoran el equilibrio de la flora intestinal ya que se unen competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen el equilibrio de la flora intestinal, actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos por medio de la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas, entre otros⁽³¹⁾ , compitiendo por nutrientes y por sitios de unión epiteliales en el intestino ⁽¹¹⁾

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL) y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como ***estafilococos y listerias***, respectivamente. ⁽³⁷⁾

Los efectos de los probióticos son varios incluyendo la modificación de la flora bacteriana 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. (37)

Los probióticos al ser consumidos tanto por humanos como por animales, sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y se implantan en el intestino delgado favoreciendo la salud del huésped. (39).

Los probióticos se instalan en la mucosa del intestino y ahí producen las sustancias inhibitorias que combaten la acción de bacterias toxigenicas, por lo tanto esta población microbiana, representa un potencial metabólico importante que no solo mantiene los procesos de digestión sino que también actúa sobre los procesos de detoxificación, llevados a cabo en el intestino, además de la estimulación del sistema inmunológico (17)

Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. (26)

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que producen un efecto saludable sobre el huésped al ser consumidos en cantidades adecuadas (26).

En cuanto a la bioseguridad en el uso de probióticos todos los que se encuentran en el mercado deben contar con estudios que avalen su inocuidad y sus propiedades funcionales. Así como no deben ser capaces de producir sustancias tóxicas o metabolitos que dañen la salud del consumidor (20)

3.4 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las BAL han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos de leches fermentadas. Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los

alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos. ⁽⁶⁾

Las bacterias de ácido láctico (BAL), entre las que se encuentra la especie ***Lactobacillus***, han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años; pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos beneficiosos a la salud. La fermentación de alimentos brinda perfiles de sabor característicos y reduce el pH ⁽¹⁶⁾

Las Bacterias productoras de ácido láctico (BAL) son bacterias fermentadoras no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para la fermentación de alimentos. En este grupo se incluyen las especies de ***Lactobacillus***, ***Lactococcus***, y ***Streptococcus thermophilus***. ⁽¹⁶⁾

En el proceso de fermentación láctica los microorganismos transforman alimentos en otros productos, habitualmente a través de la producción de ácido láctico, etanol, y otros productos finales metabólicos. ⁽¹⁶⁾

3.5 *Lactobacillus acidophilus*

Es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa, esta especie convierte la lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico, crece de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. ⁽³⁹⁾

Lactobacillus acidophilus es un microorganismo no patógeno, que ha sido ampliamente reconocida por las propiedades que posee de ser beneficioso para el cuerpo humano. (32)

Para que la cepa probiótica pueda realizar los efectos benéficos para el organismo debe disponer de una concentración mínima de 1×10^6 UFC/g o ml de células viables al momento de ser consumido. (30)

- **Condiciones de crecimiento**

- **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 (4)

- **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. (35)

– Temperatura de crecimiento

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C ⁽³⁵⁾

3.6 CRITERIOS PARA LA DEFINICIÓN DE MICROORGANISMOS QUE PUEDEN SER CONSIDERADOS COMO PROBIÓTICOS

- Ser de naturaleza no patógena.
- Ser resistente a la destrucción por procesamiento
- Ser resistente a la destrucción por ácido gástrico o biliar.
- Capacidad de adhesión a las superficies epiteliales
- Sobrevivir en ecosistema intestinal
- Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, incluso por un corto tiempo.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Modular respuestas inmunes.
- Permanecer vivas y estables durante su empleo
- Influir actividades metabólicas humanas ⁽¹²⁾

3.7 YOGURT COMO SUSTRATO

El yogur es un producto lácteo obtenido mediante la fermentación de la leche. Según la norma Salvadoreña NSO 67.01.10:08 Productos láctico, Yogurt Especificaciones, el yogurt se define como:

Es el producto lácteo obtenido por fermentación láctica mediante la acción de ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus thermophilus*** a partir de leche pasteurizada entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Los microorganismos vivos presentes en el producto final deben ser de los tipos antes mencionados y su contenido abundante.

La fermentación de la lactosa (el azúcar de la leche) en ácido láctico es lo que da al yogur su textura y sabor característico.

3.8 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La actividad de las bacterias ácido lácticas sobre microorganismos patógenos ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etc. o a la producción de bacteriocinas ⁽³⁴⁾. Los nutrientes disponibles pueden ser el resultado de esta actividad antagónica ya que hay competencia por estos nutrientes entre los patógenos y las bacterias ácido lácticas. Los nutrientes están en cantidades limitadas en el intestino, si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo del agente patógeno, limitan así su reproducción.

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes, sino por la fijación en el tracto gastrointestinal

Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de bloqueo específico del receptor por lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión. ⁽¹⁴⁾

3.9 INTERACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS CON LA MICROFLORA INTESTINAL

La microflora del intestino humano es un ecosistema complejo en cuanto a la cantidad y variedad de microorganismos, así como en su gran capacidad para influir en el estado de salud del individuo. Entre las funciones de la microbiota intestinal cabe destacar: Capacidades metabólicas, que incluyen degradación de material no digerible de la dieta y regulación del almacenamiento de energía,

síntesis de vitaminas esenciales y aumento de absorción de minerales, protección frente a agentes infecciosos y a la proliferación de especies microbianas con potencial patógeno y diferenciación del epitelio intestinal y modulación del sistema inmune. Los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud modulando la composición de la microbiota intestinal, mediante inhibición de patógenos (producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas, competición por sitios de unión epiteliales y por nutrientes) o favoreciendo la presencia y diversidad de los grupos microbianos considerados como beneficiosos dentro del ecosistema intestinal. (7)

3.10 CARACTERIZACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

3.10.1 *Escherichia coli*

E. coli es un bacteria Gram negativa típica de la familia *Enterobacteriaceae* es anaerobio facultativo, móvil por flagelos periticos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa .(25)

Es un indicador de contaminación fecal en aguas y alimentos. Como factores de virulencia posee Fimbrias que facilitan la adhesión al epitelio intestinal.

El grupo de riesgo comprende prácticamente a todas las personas. Los niños menores de 5 años de edad con problemas de alimentación, así como los ancianos son los más susceptibles de sufrir complicaciones graves. (27)

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía (19).

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena, también se les puede llamar virotipos: *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP), enterotoxigénica

(ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD). (29)

La dosis infecciosa de *E. coli* es lo suficientemente baja como para pasar de persona a persona puede ser de 50 UFC/g, eso explica porque un brote puede originarse a partir de contactos ocasionales con animales, personas o alimentos contaminados. (29)

3.10.2 *Salmonella enterica*

Salmonella enterica son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos de la familia *Enterobacteriaceae*. El hábitat natural de esta especie normalmente son en los intestinos de los animales y los seres humanos por ello son asociados a aguas y alimentos que hayan contactado con material fecal. Esta bacteria produce grandes cantidades de gas durante la fermentación de azúcares, y llevan a cabo una fermentación ácido mixta, produciendo gran cantidad de productos ácidos y gases. El principal reservorio de la *Salmonella* es el tracto intestinal de aves domésticas y silvestres. (19)

Salmonella puede producir Infecciones localizadas como síndromes gastrointestinales e Infecciones generalizadas, que se caracterizan por fiebre continua. Su patogenia comienza con la ingestión del inóculo, que puede variar de 10^3 a 10^6 células Si el inóculo es suficientemente grande, superará la barrera gástrica que supone el pH ácido. (18)

Una persona infectada con la bacteria *Salmonella* suele tener fiebre, calambres abdominales y diarrea a partir del 12 a 72 horas después de consumir una comida o bebidas contaminadas. Sin embargo, la diarrea puede ser severa, y la persona puede estar lo suficientemente enfermo como para requerir hospitalización (18). Los ancianos, niños y personas con problemas del sistema inmunológico pueden tener una enfermedad más severa. (36)

3.10.3 *Vibrio cholerae*

Los ***Vibrios*** se encuentran entre las bacterias más comunes en aguas marinas superficiales en todo el mundo; son bastoncillos curvos, aerobios, gram negativos, que tienen movilidad y poseen un flagelo polar; no forman esporas. ***Vibrio cholerae*** serogrupo O1 y los ***vibrios*** relacionados con éste, producen cólera en el hombre, en tanto que otros vibriones pueden producir sepsis o enteritis. El ***Vibrio cholerae*** produce una entero toxina que causa cólera, una diarrea acuosa profusa que provoca una rápida deshidratación y muerte ⁽¹⁹⁾

Vibrio cholerae es patógena sólo para el hombre. Una persona puede desarrollar la enfermedad con una dosis infectiva de 10^8 a 10^{10} UFC/g.

El cólera no es una infección invasora. Los microorganismos no llegan a la sangre, sino que quedan dentro del tubo intestinal. Los microorganismos virulentos de ***Vibrio cholerae*** se adhieren a las micro vellosidades del borde en cepillo de las células epiteliales; allí se multiplican y secretan la toxina del cólera. ⁽¹⁹⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO^(4,5, 9)

4.1 Metodología de la investigación

La investigación fue realizada experimentalmente en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Materiales

Los materiales usados en el desarrollo del proceso se detallan a continuación:

- Cepas patógenas a utilizar: ***Salmonella enterica***, ***Escherichia coli***, ***Vibrio cholerae***

Para el caso de ***Vibrio cholerae*** se aislara a partir de bivalvos marinos (concha de mar)

- **Materia prima:**

Se utilizó yogurt natural sin cultivo probiótico (yogurt X), y yogurt con cultivo probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** (yogurt Y).

Los dos tipos de yogurt (X y Y) fueron pasteurizados y tuvieron como cultivo láctico iniciador una mezcla de ***Streptococcus thermophilus*** y ***Lactobacillus bulgaricus***.

- **Cepas microbiológicas.**

Cultivo comercial puro de ***Lactobacillus acidophilus*** fue obtenido en forma de "polvo liofilizado" y fue agregado al yogurt en una concentración conocida de 1×10^6 UFC/g

- **Medios de cultivo:** Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe), peptona bacteriológica (peptone protease), Agar ***Salmonella-Shigella***, Agar EMB, Agar TCBS.
- **Instrumentos y utensilios.** Se utilizaron todos los materiales para uso en microbiología: Balanza, termómetro, pHmetro, refractómetro, campana de flujo laminar, estufa, Incubadora, autoclave, baño termostático, matraz Erlenmeyer, bureta, frascos de vidrio, pipetas total y parcial, placas Petri, tubos de ensayos con tapa rosca, botellas de vidrio.

4.2 METODOLOGÍA DE LA PREPARACION DE YOGURT NATURAL

La receta corresponde a yogurt tradicional elaborado artesanalmente y adicionándole cultivo probiótico ***Lactobacillus acidophilus***. Los ingredientes requeridos para el yogurt con probiótico fueron: Leche fluida cruda, azúcar, leche en polvo, cultivo liofilizado de ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus termophilus*** y cultivo liofilizado de ***Lactobacillus acidophilus***

Cultivo de yogurt: 0.5 gramos cultivo liofilizado de las cepas de ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus termophilus***)

Ingredientes:

1. 1 litro de leche fluida cruda
2. 50g de Azúcar
3. 50g de Leche en polvo
4. 0.5g de cultivo liofilizado de ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus termophilus***
5. 1g de Cultivo liofilizado de ***Lactobacillus acidophilus***

Tiempo Total de preparación: de 6 a 7 horas aproximadamente. Ver anexo N° 1 Diagrama Metodológico elaboración de yogurt.

Preparación

1. Colocar la leche cruda en un recipiente, disolver la leche en polvo y agregar el azúcar.
2. Continuar calentando hasta alcanzar los 72°C - 75°C y se mantiene en esta temperatura durante 10 minutos evitando que llegue a hervir.
3. Enfriar hasta que alcance los 40-45 grados. Es importante realizar todo este proceso para asegurarse que la leche esta pasteurizada, libre de microorganismos patógenos.
4. Cuando la leche está tibia se pone en otro recipiente y se le agrega 0.5gramos de cultivo iniciador formado por ***Lactobacillus bulgaricos*** y ***Streptococcus termophilus***, y se mezcla bien para que se disuelva. Adicionar en este punto también el cultivo probiótico ***Lactobacillus acidophilus***. En la figura N°1 se muestra la dilución del cultivo probiótico para lograr la concentración 1×10^6 UFC/ml.
5. Tapar el recipiente y dejar reposar durante 7 horas manteniendo la misma temperatura entre 42 – 45°Cy evitando que se enfríe.
6. Pasado este tiempo la leche debe haber coagulado de forma homogénea y su sabor es ligeramente ácido el cual tiene un pH entre 4.50 y 4.40
7. Cuando el yogurt está listo desprende un suave aroma láctico típico del yogurt. Entonces se mezcla suavemente con movimientos envolventes y se coloca en el refrigerador para que enfríe y se frene la acidificación.
8. Es opcional agregar fruta o jalea al yogurt previamente preparado.

4.2.1 CALCULO DE LA CONCENTRACION DEL CULTIVO PROBIOTICO

El sobre de cultivo probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** liofilizado rotula una concentración de: 2.9×10^{11} UFC/g para lograr esta concentración se debe realizar una dilución previa.

Pesar 1g del cultivo liofilizado y disolverlo en 99ml de leche pasteurizada y enfriada a 42° - 43°C, luego tomar una alícuota de 1.38g para inocular en 1 litro de leche preparada para yogurt.

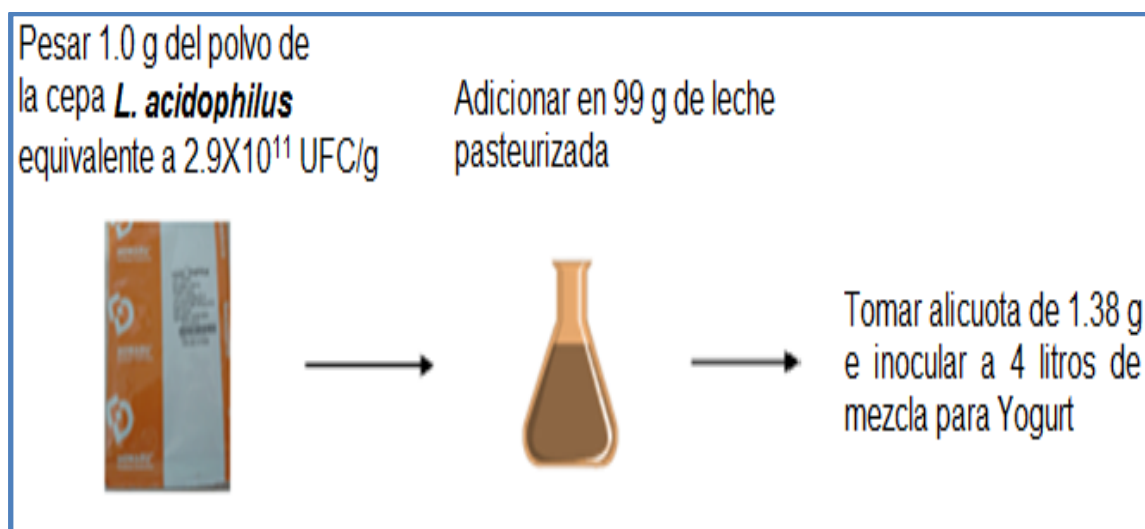


Figura No.1 Dilución cultivo probiótico *Lactobacillus acidophilus*

Para el seguimiento de los recuentos bacterianos de *Lactobacillus acidophilus* y las cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae* se almacenaron las muestras de yogurt elaborado en frascos de vidrio estériles y se mantuvieron en condiciones de refrigeración a temperaturas entre 2 a 6°C, se realizó de esta manera ya que se desea disponer de muestras integras inoculadas con los patógenos cada vez que se realice los recuentos microbianos en el periodo de estudio comprendido entre los días 0,5,10,15,20 y 30 días de vida útil del yogurt. El total de frascos almacenados fueron de 72. Para cada tipo de yogurt y concentración de patógeno se dividirán en 6 frascos, luego se almacenaran en refrigeración.



Figura No.2 Yogurt almacenado en frascos

4.2.2. CONTROL DE CALIDAD

Materia Prima

Debe usarse leche cruda con la acidez adecuada el cual no debe sobrepasar los 0.18%.

Proceso

Mantener muy buenos hábitos de higiene personal y de utensilios. Dar los tiempos y temperaturas recomendadas durante la preparación.

Producto Final

El producto debe tener un color uniforme, no debe tener mal sabor u olor y debe presentar una textura homogénea. El no realizar un proceso adecuado puede provocar un yogurt con separación de suero.

Para fines de la investigación a realizar una vez frio proceder según la metodología para demostrar el efecto inhibitorio de las cepas contenidas en el yogurt sobre poblaciones conocidas de bacterias patógenas como ***E. coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae***.

4.3 AISLAMIENTO DE PATOGENOS

1. Para *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* se realizó el aislamiento a partir de cepas patrón en medios de cultivo selectivo, Agar EMB para *Escherichia coli* y agar SS para *Salmonella enterica*. Incubar A 37°C y posteriormente purificar la cepa de ser necesario realizando resiembras en el agar selectivo respectivo.
2. Realizar pruebas bioquímicas para verificación de las cepas
3. Para el aislamiento de *Vibrio cholerae* se realizó a partir de conchas marinas, para ello pesar 10g de las conchas y suspender con 90ml de Agua peptonada, Incubar 24 horas a 37°C
4. Luego de la incubación tomar una alícuota de 1ml y sembrar en Agar TCBS para el aislamiento, Incubar 37°C.
5. Purificar de ser necesario haciendo resiembras de Agar TCBS y realiza pruebas bioquímicas.⁽⁵⁾

4.3.1 ESTANDARIZACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PATOGENOS

Una vez aisladas y verificadas por medio de pruebas bioquímicas la presencia de los 3 patógenos en estudio, se procedió a la estandarización de las concentraciones de prueba: 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g concentraciones de los patógenos a los cuales se realizaron el estudio.

Para ello se realizó aislamiento de cada una de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae* en agar TSA e incubar a 37°C. Las colonias resultantes de esta incubación fueron las utilizadas para la estandarización en espectrofotómetro, esto es debido a que se requieren colonias sin color que interfiera la lectura el espectrofotómetro.

4.3.2 PROCESO DE ESTANDARIZACION

La base de este método de estandarización es la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano, esto se realizó en un espectrofotómetro que mide la densidad óptica y luego la absorbancia-tramitancia.

1. Hacer una suspensión bacteriana de cada una de los patógenos con solución salina. Esto permite hacer curvas estándar para relacionar los valores de absorbancia con la masa bacteriana.
2. Iniciar el equipo espectrofotómetro para leer tramitancia a 580nm y realizar lectura de blanco con solución salina
3. Hacer diluciones hasta llegar a la concentración de % tramitancia de 81.7% para *Vibrio cholerae*, 81.8% para *Escherichia coli* y 87.8% para *Salmonella enterica* y así lograr las concentraciones de 1×10^6 UFC/g. Para las concentraciones de 1×10^3 UFC/g hacer una dilución al doble de volumen con solución salina de la estandarizada de 1×10^6 UFC/g.
4. Verificar los recuentos bacterianos de 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g haciendo diluciones en agar recuento en placa e incubando a 37°C por 24 horas. Esto se realizó para verificar si el % de tramitancia fue el correcto para lograr el ajuste de las concentraciones en estudio. .

4.4 DEFINICIÓN DE LOS PROCESOS EXPERIMENTALES

En la investigación se utilizó una concentración de 1×10^6 UFC/g de la bacteria probiótica *Lactobacillus acidophilus*.

Se conformaron 12 procesos para analizar la información el cual se resumen:

Cuadro No.1 Procesos Experimentales

Tipo de Yogurt	Proceso	Código de Yogurt	Concentración de probiótico	Microorganismo Patógeno	Concentración de Patógeno
Sin <i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	X	No tiene	<i>Escherichia coli</i>	1×10^3
	2	X	No tiene	<i>Salmonella enterica</i>	1×10^3
	3	X	No tiene	<i>Vibrio cholerae</i>	1×10^3
	4	X	No tiene	<i>Escherichia coli</i>	1×10^6
	5	X	No tiene	<i>Salmonella enterica</i>	1×10^6
	6	X	No tiene	<i>Vibrio cholerae</i>	1×10^6
Con <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7	Y	1×10^6	<i>Escherichia coli</i>	1×10^3
	8	Y	1×10^6	<i>Salmonella enterica</i>	1×10^3
	9	Y	1×10^6	<i>Vibrio cholerae</i>	1×10^3
	10	Y	1×10^6	<i>Escherichia coli</i>	1×10^6
	11	Y	1×10^6	<i>Salmonella enterica</i>	1×10^6
	12	Y	1×10^6	<i>Vibrio cholerae</i>	1×10^6

4.5 Proceso de inoculación de *L. acidophilus* en el yogurt

Las bacterias lácticas fueron añadidas el yogurt antes de la fermentación
Frecuencia de las mediciones: día 0, día 5, día 10, día 15, día 20 y día 30 manteniendo las muestras en condiciones de refrigeración de producto de 2°C – 6°C.

El conteo microbiano se realizó en ambos tipos de yogurt: yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* y se realizó el recuento de las cepas patógenas *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae* a concentraciones de 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g.

Determinación de pH. Se determinó mediante un potenciómetro durante 30 días del yogurt con probiótico (Yogurt X) y Yogurt sin probiótico (Yogurt Y).

4.5.1 Cuantificación de *Lactobacillus acidophilus* en Yogurt

Reactivos

-Agua de peptona tamponada

-Agar MRS

Procedimiento general para preparar las muestras:

1. Pesar asépticamente 10g de la muestra en bolsa estéril para trabajar stomacher.
2. Adicionar 90 ml del agua peptonada y mezclar durante un min a 260rpm.
3. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca.
4. Tomar una alícuota de 10 ml de la mezcla a un frasco que contenga 90ml de agua peptonada, posteriormente hacer otra dilución igual 10ml/90ml (diluciones seriadas).

4.5.2 Aislamiento de *Lactobacillus acidophilus*

De la cuarta dilución tomar 1ml y colocarlo en placa petri, transferir 20ml de agar MRS, mezclar en forma de ocho e incubar por 72 horas a 37 ± 1 °C en jarra de anaerobiosis. Se trabajó por duplicado.

Se examinó las placas a investigar la presencia de colonias típicas de *Lactobacillus*: Colonias blancas. Diluciones: 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4}

Preparación de agar MRS. De acuerdo a las instrucciones del envase 70,3 g de agar MRS disolver con agua destilada y se aforara a un litro, se homogeniza

la mezcla calentándola y luego se pasaron a matraces Erlenmeyer, los matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min.

Mantener en un baño María a 45°C, en una campana de flujo laminar hasta la preparación de las siembras en placas Petri, el cual se adicionaron 20 ml aproximadamente de agar MRS. ⁽⁵⁾

4.6 INOCULACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN YOGURT

Durante tres repeticiones y usando la concentración de probiótico (1×10^6 UFC/g) se inoculo una suspensión (1×10^3 y 1×10^6 UFC/g) de cada bacteria patógena en estudio en el yogurt X y Y. Cada uno de estos procesos se almaceno en refrigeración a temperaturas entre 2 - 6°C durante los 30 días de vida útil del yogurt. Inicialmente se realizó el recuento de las bacterias probióticas en el yogurt para verificar si tenemos concentraciones de 1×10^6 en la etapa inicial del estudio, así como a lo largo de la vida útil del producto. Una vez elaborado el yogurt se debe hacer el envasado en 72 frascos de vidrio o plástico con capacidad para 100g; Las suspensiones bacterianas fueron preparadas y estandarizadas a concentración de 1×10^3 y 1×10^6 UFC/g. Una vez preparada la suspensión inocular 1ml de esta en cada frasco que contiene el yogurt. Agitar para lograr una correcta mezcla. La inoculación de las bacterias patógenas debe realizarse según como se indica:

Cuadro No 2 Guía de Inoculación – experimental

Tipo de Yogurt	Concentración del probiótico	Numero de frascos a inocular con el patógeno	Patógeno a inocular	Concentración del patógeno
Yogurt X sin probiótico	No tiene	6	<i>Escherichia coli</i>	1.0X10 ³
		6	<i>Salmonella enterica</i>	
		6	<i>Vibrio cholerae</i>	
Yogurt X sin probiótico	No tiene	6	<i>Escherichia coli</i>	1.0X10 ⁶
		6	<i>Salmonella enterica</i>	
		6	<i>Vibrio cholerae</i>	
Yogurt X con probiótico	1.0x10 ⁶	6	<i>Escherichia coli</i>	1.0X10 ³
		6	<i>Salmonella enterica</i>	
		6	<i>Vibrio cholerae</i>	
Yogurt X con probiótico	1.0x10 ⁶	6	<i>Escherichia coli</i>	1.0X10 ⁶
		6	<i>Salmonella enterica</i>	
		6	<i>Vibrio cholerae</i>	
Total de frascos		72		

4.7 MEDICIÓN DE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS PATÓGENAS

4.7.1 MEDICION DE LA POBLACION DE *E.COLI* ATCC 25922 ⁽⁵⁾

Medios de cultivo

Para *Escherichia coli* Agar EMB

De cada uno de los sistemas, se realizó diluciones decimales en agua peptonada estéril. Luego cada una de éstas se inoculó por esparcimiento en Agar EMB, se incubó a 37 °C, en atmósfera normal durante 2 días. Luego de la Incubación, las poblaciones se monitorearon según frecuencia de mediciones establecidas durante la vida útil del yogurt.

Técnica de Recuento de *E. coli* ATCC 25922

Materiales

- Homogeneizador stomacher
- espátulas, mezcladores
- Incubadora
- Tubos de ensayo
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas bacteriológicas de 10.0 y 5.0 ml
- Placas petri

Reactivos

- Agua de peptona tamponada
- Agar EMB

Procedimiento general para la preparación de muestras

1. Pesar asépticamente 10 g de la muestra en bolsa estéril para trabajar.
2. Adicionar 90 ml del agua peptonada y mezclar durante un 1 min a 260rpm en stomacher.
3. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca.

4. Luego transferir respectivamente 10 ml de la mezcla a un frasco que contenga 90ml de agua peptonada, posteriormente hacer otra dilución igual 10ml/90ml. Diluciones: 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4}
5. De la tercera dilución tomar 1ml y distribuir sobre Agar EMB, luego incubar durante 24horas a 37°C

Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de ***E. Coli***.
Agar EMB: colonias verdosas con brillo metálico ⁽⁵⁾

4.7.2 MEDICION DE LA POBLACION DE *Salmonella enterica*

Técnica de Recuento de ***Salmonella enterica***

Medios de cultivo

- Caldo lactosado y agua de peptona tamponada

Materiales

- Homogeneizador stomacher
- Espátulas, mezcladores
- Incubadora
- Tubos de ensayo
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml
- Placas petri

Procedimiento general para la preparación de muestras

1. Pesar asépticamente 25 g de la muestra en bolsa estéril para trabajar.
2. Adicionar 225ml del medio de pre-enriquecimiento estéril caldo lactosado y mezclar durante un 1 min a 260rpm en stomacher.

3. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar incubando a 37°C durante 24 horas.
4. Pasadas las 24 horas de incubación de los frascos de pre enriquecimiento, agitar suavemente, transferir respectivamente 10 ml de la mezcla a un frasco que contenga 90ml de agua peptonada, posteriormente hacer otra dilución igual 10ml/90ml.
5. Distribuir 1 ml sobre placas petri con agar **Salmonella Shigella**. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Examinar las placas y hacer recuento de colonias típicas de **Salmonella enterica**, de acuerdo con las siguientes características:

Agar **salmonella shigella**: las colonias típicas de **Salmonella** color rojo⁽⁵⁾

4.7.3 MEDICION DE LA POBLACION DE **Vibrio cholerae**

Recuento de **Vibrio cholerae**

1. Pesar 10 g de Muestra y Adicionar 90 mL de Agua Peptonada Buferada (APB)
2. Homogenizar en STOMACHER 2 minutos a 260 rpm.
3. Pipetear 10 mL de la solución a un frasco de dilución que contiene 90 ml de APB.
4. Preparar una dilución más consecutiva de 10ml/90ml.
5. Distribuir 1ml en Agar TCBS de cada dilución.
6. Incubar a 35-37 °C por 24 horas.

Examinar las placas con Agar TCBS y realizar los recuentos de colonias típicas de **Vibrio** Colonias largas color amarillo y ligeramente planas con centros opacos y periferias translúcidas.⁽⁵⁾

4.8 Identificación de bacterias patógenas con Pruebas Bioquímicas

Realizar pruebas Bioquímicas para la identificación de los tres patógenos aislados previamente: *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*

- **Reacción de Indol**

1. Sobre 1ml de medio de caldo triptófano inocular las colonias del microorganismo patógeno de prueba.
2. Incubar a 37°C ±1, durante 24 horas. Luego de la inoculación añadir 5 gotas de reactivo de Erlich por la pared interior del tubo.
3. El desarrollo de un anillo color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de Indol y una prueba positiva, si el anillo formado es amarillo o del mismo color que el reactivo la prueba es negativa.

- **Voger Proskauer**

1. Inocular el caldo RMVP con las colonias del microorganismo patógeno de prueba
2. Incubar a 37°C ±1, durante 24 horas.
3. Luego de finalizado el tiempo de incubación adicionar al tubo de ensayo 3 gotas de Alfa-naftol + 2 gotas de hidróxido de potasio, luego agitar cuidadosamente el tubo.
4. Dejar reposar el tubo durante 10 a 15 minutos. El desarrollo de un color rojo luego de 15 minutos indica la presencia de diacetilo y la prueba es positiva.

- **Rojo de Metilo**

1. Inocular el caldo Rojo Metilo (MRVP) con las colonias del microorganismo patógeno en estudio.
2. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 48 horas
3. Luego de finalizado el tiempo de incubación agregar unas 1 o 2 gotas del reactivo de Rojo de metilo.
4. La prueba es positiva si se desarrolla de un color rojo en el tubo. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el microorganismo fermentó la glucosa.

- **Prueba de Movilidad**

1. Inocular la colonia del microorganismo patógeno de prueba por punzada por el agar MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)
2. Incubar 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$
3. Luego de la incubación observar la movilidad de la bacteria en el medio de cultivo inclusive más allá de la punzada de siembra.

- **TSI**

1. Inocular los tubos de TSI con aza de punta, hacer punzada introduciendo la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo, luego de retirar el alambre del fondo estriar sobre la superficie.
2. Incubar 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.
Observar el crecimiento en el medio de cultivo y la coloración, además si hay formación de gas SH_2 .

- **Citrato**

1. Inocular por estría el microorganismo patógeno de prueba sobre el agar inclinado de Citrato.
2. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 4 días.
3. La prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador color azul.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 PREPARACIÓN DE YOGURT NATURAL

Para realizar la investigación se preparó yogurt natural por medio de una receta tradicional, que consiste en usar ingredientes accesibles y materiales prácticos para su preparación. Se realizaron dos tipos de yogurt, uno que contenía ***Lactobacillus acidophilus*** como cepa de cultivo probiótico y el segundo yogurt sin el cultivo probiótico. Ambos productos fueron preparados con leche pasteurizada y se utilizaron cultivos iniciadores de ***Streptococcus thermophilus*** y ***Lactobacillus bulgaricus*** en ambos tipos de yogurt ya que según Normativa NSO 67.01.10:08 Productos Lácteos, Yogurt Especificaciones los probióticos debe contener estas dos cepas para ser denominado Yogurt. La preparación del yogurt marca el punto de partida para hacer posible el inicio de la investigación.

5.1.1 Yogurt y sus características sensoriales

Ambos tipos de yogurt preparados para la investigación se obtuvieron con características propias de este producto, es decir textura cremosa, suave, uniforme, sin grumos, sin liberación de suero y sabor levemente ácido característico.

La preparación del yogurt (ambos tipos con y sin probiótico) se realizó según la metodología descrita en el numeral 4.2 (pag. 37)

En la primera etapa de la preparación de yogurt se realizó la pasteurización la cual consistió en someter leche cruda, azúcar y sólidos de leche usados como materia prima a calentamiento en un baño maría a una temperatura de 75°C.

En la etapa de inoculación se adicionaron 0.5 g de cultivo liofilizado de cepas iniciadoras ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus thermophilus*** y para el caso de yogurt con probiótico se adiciono el cultivo de ***Lactobacillus acidophilus*** el cual fue preparado según diluciones

y cálculos mostrados en la sección 5.2.1 realizando diluciones con leche previamente pasteurizada y enfriada a 43°C.

Para la fermentación o Incubación se dejó reposando la leche preparada con cultivos durante 7 horas a una temperatura constante en Baño maría entre 42 °C – 45°C.

Completado el tiempo de fermentación se rompió el coagulo con movimientos y agitación suave y se somete a refrigeración que detiene el proceso de acidificación de yogurt.

Se evaluaron las características sensoriales del yogurt y se procedió al envasado en frascos estériles

5.1.2 CONTROL DE CALIDAD AL YOGURT PREPARADO

Para la preparación del yogurt se utilizaron ingredientes libres de impurezas, durante el proceso de elaboración se mantuvieron buenas prácticas de preparación de materiales y utensilios así como higiene y cuidados personales para evitar contaminación del yogurt. Durante la etapa de preparación se mantuvo control de los tiempos y temperaturas de proceso.

En la cuadro N°3 se presentan los resultados de la evaluación sensorial y fisicoquímica realizada a los dos tipos de yogurt con y sin probiótico.

Cuadro N° 3 Evaluación sensorial y fisicoquímica de los dos tipos de yogurt preparado

PARÁMETRO EVALUADO	TIPO DE YOGURT	
	CON PROBIOTICO	SIN PROBIOTICO
Textura	Cremosa, homogénea	Cremosa homogénea
Presencia de Grumos	No	No
Sabor y Aroma	Acido característico	Acido característico
Liberación de suero	No	No
pH	4.38	4.35
Grados Brix	12°	12°

En el cuadro N° 3 se muestra que ambos tipos de yogurt con y sin probiótico presentaron características sensoriales y fisicoquímicas similares que no son significativas, la diferencia entre ellos únicamente se basa en la composición de Bacterias lácticas añadidas previo al proceso de fermentación.

5.2 INOCULACION DE *Lactobacillus acidophilus* EN EL YOGURT

Previo a la etapa de fermentación se adiciono a la mezcla de leche 0.5g de cultivos iniciadores en forma de polvo liofilizado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y para el caso de yogurt con probiótico se adiciono 1.38g para lograr una concentración de 1×10^6 UFC/g (ver cálculos en la sección 5.2.1)

Para lograr una concentración de 10^6 ufc/g de *Lactobacillus acidophilus* en el yogurt con probiótico se pesó 1.0g y se diluyo en 99.0ml de leche previamente pasteurizada y enfriada a 43°C , posteriormente se tomó una alícuota de 1.38g de *L. acidophilus* y se adiciono a la mezcla de leche a una temperatura de 43°C , se agito para incorporar el cultivo en toda la leche.

La mezcla Inoculada fue sometida a fermentación o incubación a temperatura de 43°C durante un tiempo aproximado de 7 horas.

5.2.1. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL CULTIVO PROBIÓTICO

La cantidad preparada de cada yogurt fue de 4 litros. Para el Yogurt con probiótico se usó *Lactobacillus acidophilus* a una concentración inicial de 2.9×10^{11} UFC/g.

La concentración requerida en el yogurt es de 1.0×10^6 UFC/g, para lograr esta concentración en 4 litros de yogurt se requiere 4×10^9 UFC/g*.

Calculo:

Formula concentración necesaria para 4 litros= (4). $(1.0 \times 10^6) = 4 \times 10^9 \text{UFC/g}$
 Concentración inicial de ***Lactobacillus acidophilus*** en 1gramo = $2.9 \times 10^{11} \text{UFC}$,
 se requiere diluir esta concentración, para ello se realizó dilución de 1gramo de cultivo puro en 99g de leche.

Teniendo una concentración en la dilución de $2.9 \times 10^9 \text{UFC/g}$

La cantidad a adicionar del cultivo diluido se calcula relacionando la cantidad necesaria de la concentración de $2.9 \times 10^9 \text{UFC/g}$ para obtener $4 \times 10^9 \text{UFC/g}$

Calculo: Tenemos $2.9 \times 10^9 \text{UFC}$ en \rightarrow 1 gramo

Para obtener $4 \times 10^9 \text{UFC}$ se requiere \rightarrow X gramos

$$\text{Cantidad a Inocular a 4 litros} = \frac{(4 \times 10^9 \text{UFC}) \times 1 \text{gramo}}{2.9 \times 10^9 \text{UFC}} = 1.38 \text{ gramos}$$

Cantidad agregada de cultivo ***Lactobacillus acidophilus*** para inocular 4 litros de yogurt fue de 1.38gramos.

Este volumen fue pesado en balanza semi-analítica y adicionado a la mezcla de yogurt previo a la fermentación.

5.2.2 Cuantificación de ***Lactobacillus acidophilus*** en Yogurt

El conteo inicial y durante la vida útil del yogurt (30días) se realizó por medio del método de Recuento en placa con Agar MRS, las frecuencias de las mediciones de las bacterias ácido lácticas se realizó el día 0, 5, 10, 15, 20 y 30.

Las muestras de yogurt se mantuvieron durante ese tiempo en condiciones de refrigeración entre 2 – 6°C.

El conteo se realizó pesando 10g de yogurt y se diluyó en 90ml de agua peptonada estéril, se mezcló en stomacher durante dos minutos de 260RPM y posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} tomando alícuotas de 1ml. Se sembró 1ml de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} en placas estériles y se les adicionó 20.0 ml de agar MRS, luego se incubaron las placas en condiciones de anaerobiosis 5% de CO_2 a una temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$ por 48-72 horas. Posterior a la incubación se realizaron los conteos del *Lactobacillus acidophilus* observando colonias de color blanco – amarillo.

Las siembras y conteos se realizaron por duplicado.

En la Figura N° 3 se observan crecimiento de colonias de *Lactobacillus acidophilus* en agar MRS



Figura N°3 Colonias de *Lactobacillus acidophilus* en agar MRS

En el cuadro N° 4 se muestran los resultados obtenidos del conteo del yogurt con *Lactobacillus acidophilus*.

Cuadro No.4 Conteos de *Lactobacillus acidophilus* durante los 30 días de estudio

Días	RECUEENTOS DE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Expresado en Logaritmo
0	1.13X10 ⁶ UFC/g	1.13E+06
5	1.13X10 ⁶ UFC/g	1.13E+06
10	1.13X10 ⁶ UFC/g	1.13E+06
15	1.10X10 ⁶ UFC/g	1.10E+06
20	1.05X10 ⁶ UFC/g	1.05E+06
30	8.40X10 ⁵ UFC/g	8.40E+05

En el cuadro N° 4 se observó que durante la vida útil del yogurt el número de células viables de *Lactobacillus acidophilus* mantuvo un factor casi constante de 1×10^6 UFC/g disminuyendo al día 30 a 8.40×10^5 UFC/g.

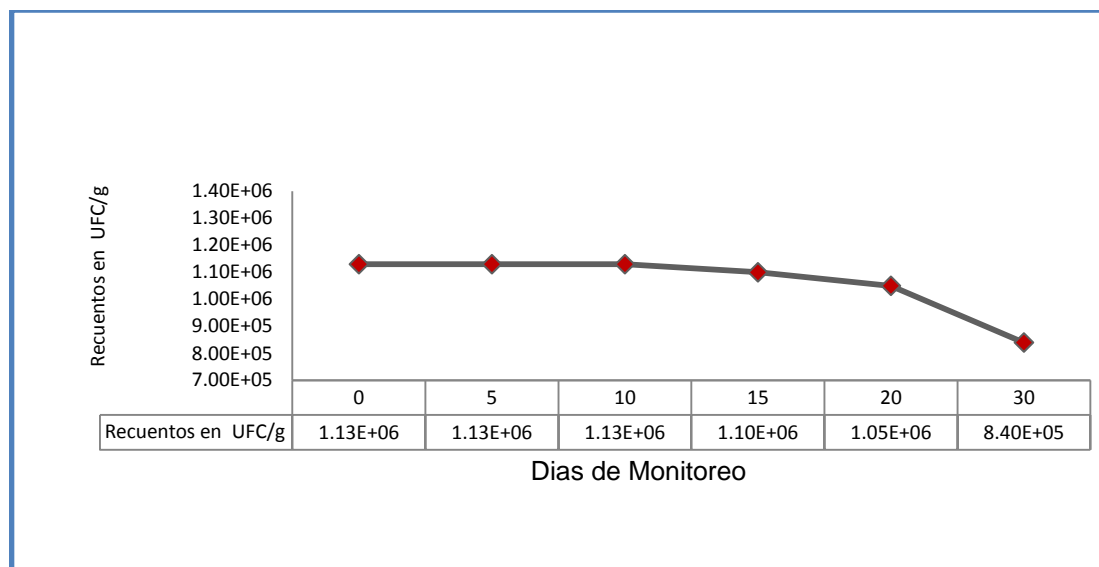


Figura N°4 Recuentos de *Lactobacillus acidophilus* durante los 30 días de monitoreo

En la Figura N° 4 se observan en forma gráfica los recuentos *Lactobacillus acidophilus* durante los días de monitoreo; Los primeros 20 días se manifestó un recuento casi constante 1×10^6 UFC/g disminuyendo el número de bacterias lácticas para el día 30 hasta recuentos de 8.4×10^5 UFC/g

Estos recuentos demuestran que manteniendo el yogurt en condiciones de refrigeración el número de bacterias lácticas se mantienen viables y en número casi constante hasta el día 20 y disminuyendo en un 20% el número de bacterias lácticas al termino del día 30.

5.3 IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE PATOGENOS

5.3.1 Identificación y Aislamiento de *E. coli* ATCC 25922

El aislamiento de la cepa patógena *E. coli* ATCC 25922 se inició a partir de la bacteria en estado de polvo liofilizado. Inicialmente se reconstituyo en agua peptonada y se incubo a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas, luego se sembró en agar EMB, como resultado se obtuvieron colonias color negro con el característico brillo verde metálico debido a la rápida fermentación de la lactosa; para la identificación inicialmente se realizó tinción al gram observando resultado de una bacteria Gram negativa y luego se realizaron pruebas Bioquímicas para verificación de la cepa.

En la Figura N° 5 se observa crecimiento de *E. coli* en agar EMB previo a la identificación y aislamiento.

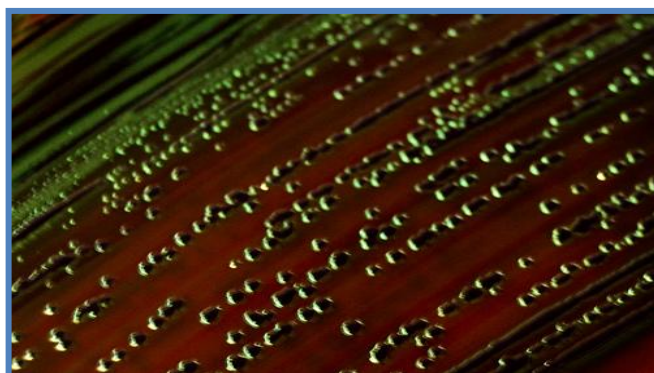


Figura No.5 Colonias de *E. coli* en agar EMB

En la figura N° 5 se muestra imagen de las colonias verdosas con brillo metálico características de *E. coli* en Agar EMB.

En el cuadro N° 5 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas Bioquímicas realizadas a *E. coli*

Cuadro N° 5 Resultados de tinción al Gram y pruebas bioquímicas para *E. coli* ATCC 25922

Prueba	Resultado Obtenido	Interpretación de resultado y observaciones
Tinción al Gram	Gram (-)	Bacteria Gram (-), Bacilos cortos, se tiñó de rosado en tinción al Gram
TSI	Producción de gas (+)	Resultado Positivo, se observó producción de gas
Citrato	(-)	Prueba Negativa no se observó crecimiento ni cambio de coloración
Movilidad	(+)	Prueba Positiva, hubo crecimiento móvil en el tubo de prueba
Rojo de Metilo	(+)	Prueba Positiva hubo formación de anillo rojo
Voges Proskauer	(-)	No hubo viraje de coloración en el medio, se mantuvo con coloración amarillo- naranja
Indol	(+)	Prueba positiva hubo formación de anillo color rojo en la superficie del tubo

Los resultados presentados en el cuadro N° 5 comprueban que efectivamente se aisló *E. coli*, la morfología observada al microscopio luego de la tinción al Gram coincide con la descrita para esta bacteria así como los resultados de las pruebas bioquímicas. En la Figura N°5 se observa el crecimiento que *E. coli* presentó al sembrarla en agar EMB en donde se observó crecimiento de colonias color negro con el característico brillo verde metálico. La cepa identificada como *E. coli* ATCC 25922 se sembró en Agar TSA para proceder a la estandarización de la concentración obteniendo crecimiento de colonias incoloras.

5.3.2 Identificación y Aislamiento de *Salmonella enterica*

El aislamiento de la cepa patógena *Salmonella enterica* ATCC 14028 inicia a partir de la bacteria en estado liofilizado. Inicialmente se reconstituyó en caldo Lactosado y se incubó a temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$ por 24 horas, luego se sembró en agar Salmonella Shigella. Como resultado se obtuvieron colonias transparentes con centro color negro; para la identificación inicialmente se realizó tinción al gram observando resultado de una bacteria Gram negativa y luego se realizaron pruebas Bioquímicas para verificación de la cepa.

En la Figura N° 6 se observa crecimiento de *Salmonella enterica* en agar *Salmonella Shigella* previo a la identificación y aislamiento.

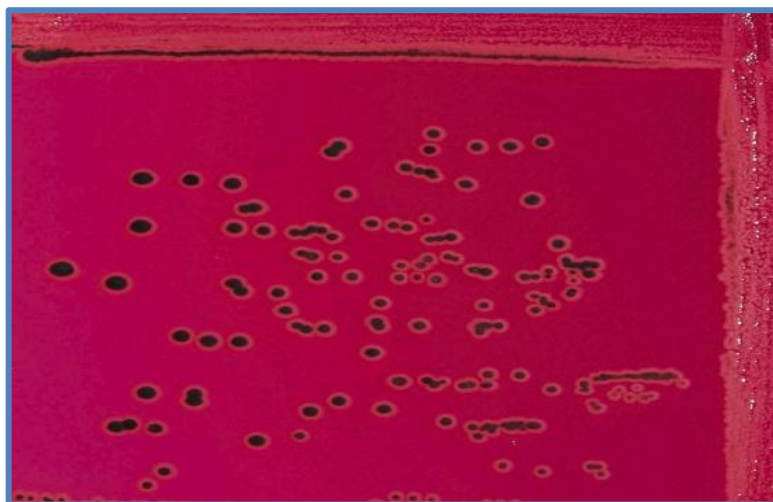


Figura N°6 Colonias de *Salmonella enterica* en agar *Salmonella Shigella*

En la Figura N° 6 se muestra imagen de colonias transparentes con centro negro características de *Salmonella* en Agar *Salmonella-Shigella*.

En el cuadro N° 6 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas a ***Salmonella enterica***

Cuadro N° 6 Resultados de tinción al Gram y pruebas bioquímicas para ***Salmonella enterica***

Prueba	Resultado Obtenido	Interpretación de resultado y observaciones
Tinción al Gram	Gram (-)	Bacteria Gram (-), Bacilos cortos y ovalados de color rosado
TSI	Producción de gas (+)	Resultado Positivo, se observó coloración negra con producción de gas
Citrato	(+)	Prueba positiva se observó cambio de coloración azul
Movilidad	(+)	Prueba Positiva, hubo crecimiento móvil en todo el tubo de prueba
Rojo de Metilo	(+)	Prueba Positiva hubo formación de anillo rojo
Voges Proskauer	(-)	No hubo viraje de coloración en el medio, se mantuvo con coloración amarillo
Indol	(-)	Prueba Negativa, coloración amarilla no hubo formación de anillo color rojo en la superficie del tubo.

Los resultados presentados en el cuadro N° 6 demuestran que efectivamente se aisló ***Salmonella enterica***, la morfología observada al microscopio luego de la tinción al Gram coincide con la descrita para esta bacteria así como los resultados de las pruebas bioquímicas.

La cepa identificada como ***Salmonella*** ATCC 14028 se sembró en Agar TSA para proceder a la estandarización de la concentración obteniendo crecimiento de colonias incoloras.

5.3.3 Identificación y Aislamiento de ***Vibrio cholerae***

El aislamiento de la cepa patógena de ***Vibrio cholerae*** se inició a partir de conchas de mar, se enriquecieron en agua peptonada durante 24 horas a 37°C ±1, luego se sembró en agar TCBS, como resultado se obtuvieron colonias amarillas; para la identificación inicialmente se realizó tinción al gram observando resultado de una bacteria Gram negativa y luego se realizaron pruebas Bioquímicas para verificación de la cepa.

En la Figura N° 7 se observa crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar TCBS previo a la identificación y aislamiento.



Figura N°7. Colonias de *Vibrio cholerae* en agar TBSC

En la Figura N° 7 se muestra la imagen del crecimiento de *Vibrio cholerae* al sembrarla en agar TCBS en donde se observó crecimiento de colonias color amarillo.

En el cuadro N° 7 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas a *Vibrio cholerae*

Cuadro N° 7 Resultados de tinción al Gram y pruebas bioquímicas para *Vibrio cholerae*

Prueba	Resultado Obtenido	Interpretación de resultado y observaciones
Tinción al Gram	Gram (-)	Bacteria Gram (-), bacteria con forma de bastón curvo
TSI	(-)	Resultado Negativo no se observó producción de gas
Citrato	(+)	Prueba Positiva se observó cambio de coloración
Movilidad	(+)	Prueba Positiva, hubo crecimiento móvil en el tubo de prueba
Rojo de Metilo	(+)	Prueba Positiva hubo formación de anillo rojo
Voges Proskauer	(+)	Prueba Positiva
Indol	(+)	Prueba positiva hubo formación de anillo color rojo en la superficie del tubo

Los resultados presentados en el cuadro N° 7 comprueban que efectivamente se aisló *Vibrio cholerae*, la morfología observada al microscopio luego de la tinción al Gram coincide con la descrita para esta bacteria así como los resultados de las pruebas bioquímicas.

La cepa identificada como *Vibrio cholerae* se sembró en Agar TSA para proceder a la estandarización de la concentración obteniendo crecimiento de colonias incoloras.

5.4 ESTANDARIZACION DE LAS CONCENTRACIONES DE PATOGENOS

5.4.1 Estandarización de la bacteria patógena *E. coli*

La estandarización de *E. coli* se realizó por el método espectrofotométrico, en donde la turbidez de la suspensión bacteriana fue medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm. Las diluciones fueron realizadas con solución salina estéril luego se midió el % de transmitancia.

Se partió de las colonias de *E. coli* aisladas de Agar TSA después de incubarlas durante 24 horas a 37°C, inicialmente se preparó una solución madre suspendiendo las colonias recuperadas de Agar TSA y suspendidas en tubos de ensayo con solución salina estéril. Se realizaron 5 diferentes diluciones a partir de la suspensión madre y se tomó el % de transmitancia de cada una, como blanco entre cada lectura se usó solución salina estéril. Las lecturas obtenidas de las suspensiones fueron de 71.9%, 78.4%, 80.9%, 81.8%, 83.2%, estas lecturas de % de transmitancia se tomaron como un parámetro patrón para conocer la concentración de *E. coli* a la que se encontraba cada una de las 5 soluciones.

Con el objetivo de conocer el número de colonias viables a los diferentes % de transmitancia se realizaron diluciones seriadas de estas 5 soluciones en agua

peptonada salina y se sembraron en agar Recuento en Placa, se incubaron durante 24 horas a 37°C y realizaron los conteos de las bacterias. Los resultados obtenidos demostraron que únicamente la solución con 81.8% de tramitancia presento recuentos equivalentes a 10^6 ufc/g de *E. coli*

Para el día de la inoculación de yogurt con el patógeno se estandarizó nuevamente la bacteria patógena de *E. coli* pero se realizó únicamente una solución al 81.8% de tramitancia ya que los recuentos previos demostraron la concentración equivalente de 1×10^6 UFC/g de *E. coli*.

Cuadro Nº 8 Resultados de la estandarización de *E. Coli*

% Tramitancia detectado en suspensión	Recuentos en UFC/g obtenidos Agar Recuento en placa
71.9%	Muy numerosos para contar
78.4%	3.4×10^7
80.9%	1.8×10^7
81.8%	1.13×10^6
83.2%	3.7×10^5

En la Figura Nº 8 se observa la curva de estandarización de la concentración de *E. coli*

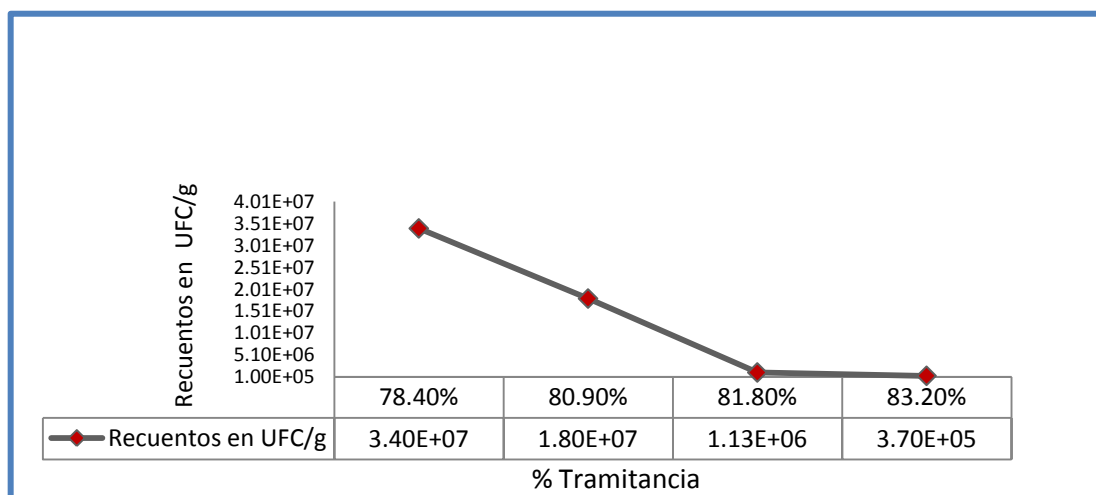


Figura Nº8 Curva de estandarización de la concentración de *E. coli*

De forma gráfica se muestra en la figura N° 8 que para obtener una concentración equivalente a 1×10^6 UFC/g se debe preparar una suspensión bacteriana de *E. coli* a un % de transmitancia de 81.8% a 580nm.

5.4.2 Estandarización de la bacteria patógena *Salmonella enterica*

La estandarización de *Salmonella* se realizó por el método espectrofotométrico, en donde la turbidez de la suspensión bacteriana fue medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm. Las diluciones fueron realizadas con solución salina estéril luego se midió el % de transmitancia.

Se partió de las colonias de *Salmonella enterica* aisladas de Agar TSA después de incubarlas durante 24 horas a 37°C, inicialmente se preparó una solución madre suspendiendo las colonias recuperadas de Agar TSA y suspendidas en tubos de ensayo con solución salina estéril. Se realizaron 5 diferentes diluciones a partir de la suspensión madre y se tomó el % de transmitancia de cada una, como blanco entre cada lectura se usó solución salina estéril. Las lecturas obtenidas de las suspensiones fueron de 81.9%, 82.5%, 85.3%, 85.9%, 87.8% , estas lecturas de % de transmitancia se tomaron como un parámetro patrón para conocer la concentración de *Salmonella enterica* a la que se encontraba cada una de las 5 soluciones.

Con el objetivo de conocer el número de colonias viables a los diferentes % de transmitancia se realizaron diluciones seriadas de estas 5 soluciones en agua peptonada salina y se sembraron en agar Recuento en Placa, se incubaron durante 24 horas a 37°C y realizaron los conteos de las bacterias. Los resultados obtenidos demostraron que únicamente la solución con 85.3% de transmitancia presentó recuentos equivalentes a 10^6 ufc/g de *Salmonella enterica*

Para el día de la inoculación de yogurt con el patógeno se estandarizó nuevamente la bacteria patógena de ***Salmonella enterica*** pero se realizó únicamente una solución al 85.3% de tramitancia ya que los recuentos previos demostraron la concentración equivalente de 1×10^6 UFC/g de ***Salmonella enterica***

Cuadro N° 9 Resultados de la estandarización de ***Salmonella enterica***

% Tramitancia detectado en suspensión	Recuentos en UFC/g obtenidos Agar Recuento en placa
81.9%	1.2×10^7
82.5%	1.5×10^6
85.3%	1.0×10^6
85.9%	9.8×10^5
87.8%	7.1×10^5

En la Figura N° 9 se observa la curva de estandarización de la concentración de ***Salmonella entérica***

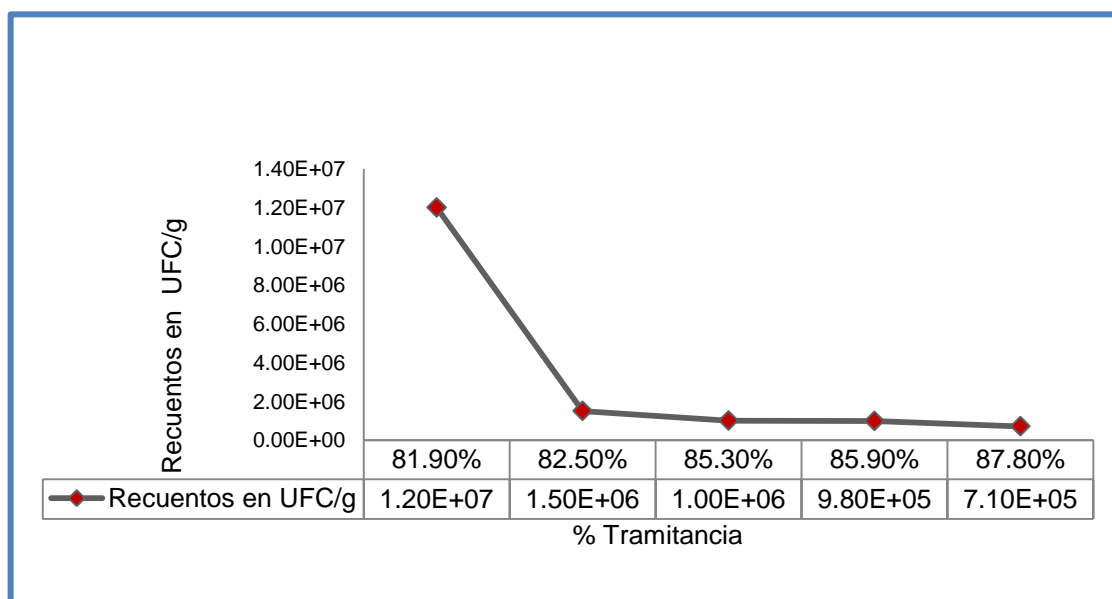


Figura N° 9 Curva de estandarización de la concentración de ***Salmonella enterica***

Figura N° 9 se muestra la Curva de estandarización de la concentración de ***Salmonella enterica***. Los resultados obtenidos demuestran que para obtener una concentración equivalente a 1×10^6 UFC/g se debe preparar una suspensión bacteriana de ***Salmonella enterica*** a un % de transmitancia de 85.3% a 580nm.

5.4.3 Estandarización de la bacteria patógena ***Vibrio cholerae***

La estandarización de ***Vibrio cholerae*** se realizó por el método espectrofotométrico, en donde la turbidez de la suspensión bacteriana fue medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm. Las diluciones fueron realizadas con solución salina estéril luego se midió el % de transmitancia.

Se partió de las colonias aisladas de ***Vibrio cholerae*** aisladas de Agar TSA después de incubarlas durante 24 horas a 37°C, inicialmente se preparó una solución madre suspendiendo las colonias recuperadas de Agar TSA y suspendidas en tubos de ensayo con solución salina estéril. Se realizaron 5 diferentes diluciones a partir de la suspensión madre y se tomó el % de transmitancia de cada una, como blanco entre cada lectura se usó solución salina estéril. Las lecturas obtenidas de las suspensiones fueron de 74.8%, 77.3%, 81.8%, 82.7%, 83.1%, estas lecturas de % de transmitancia se tomaron como un parámetro patrón para conocer la concentración de ***E. Coli*** a la que se encontraba cada una de las 5 soluciones.

Con el objetivo de conocer el número de colonias viables a los diferentes % de transmitancia se realizaron diluciones seriadas de estas 5 soluciones en agua peptonada salina y se sembraron en agar Recuento en Placa, se incubaron durante 24 horas a 37°C y realizaron los conteos de las bacterias. Los resultados obtenidos demostraron que únicamente la solución con 81.8% de transmitancia presentó recuentos equivalentes a 10^6 UFC/g de ***Vibrio cholerae***

Para el día de la inoculación de yogurt con el patógeno se estandarizó nuevamente la bacteria patógena de *Vibrio cholerae* pero se realizó únicamente una solución al 81.8% de tramitancia ya que los recuentos previos demostraron la concentración equivalente de 1×10^6 UFC/g de *Vibrio cholerae*

Cuadro Nº 10 Resultados de la estandarización de *Vibrio cholerae*

% Tramitancia detectado en suspensión	Recuentos en UFC/g obtenidos Agar Recuento en placa
74.8%	4.2×10^7
77.3%	1.7×10^6
81.8%	1.03×10^6
82.7%	1.7×10^5
83.1%	1.4×10^5

En la Figura Nº 10 se observa la curva de estandarización de la concentración de *Vibrio cholerae*

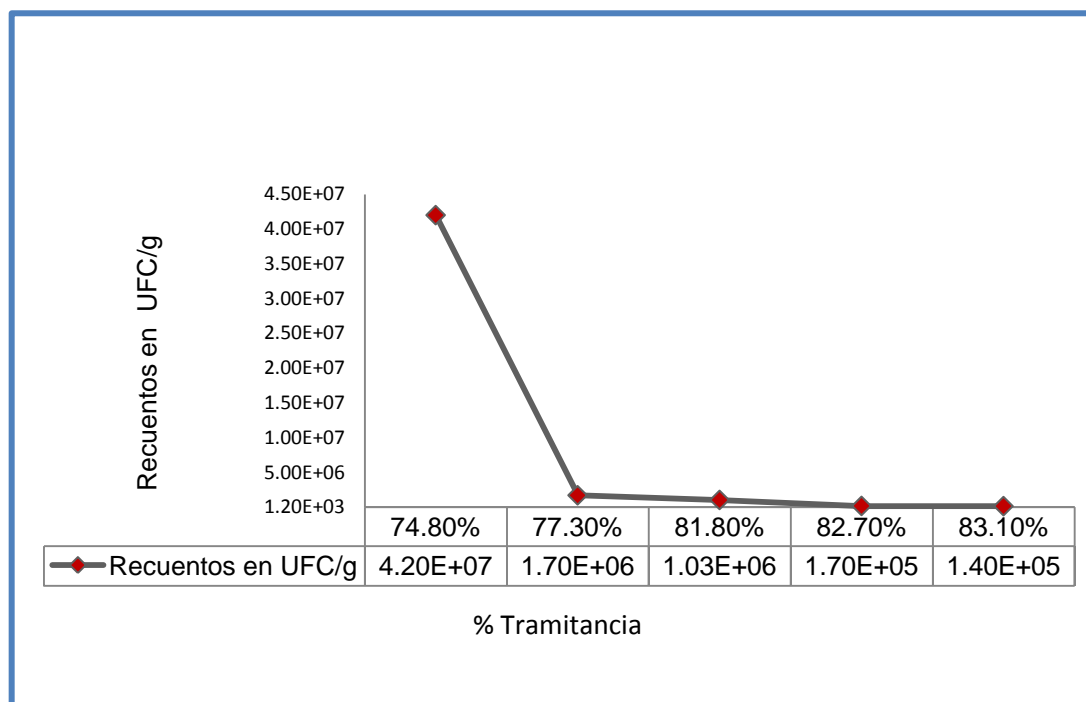


Figura Nº 10 Curva de estandarización de la concentración de *Vibrio cholerae*

Figura N° 10 se muestra la Curva de estandarización de la concentración de ***Vibrio cholerae***. Los resultados obtenidos demostraron que para obtener una concentración equivalente a 1×10^6 UFC/g se debe preparar una suspensión bacteriana de ***Vibrio cholerae*** a un % de transmitancia de 81.8% a 580nm.

5.5 INOCULACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN YOGURT

De las soluciones estandarizadas a concentraciones de 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g de los 3 patógenos se inoculó 1ml en cada frasco de yogurt preparado con ***Lactobacillus acidophilus*** y sin ***Lactobacillus acidophilus*** (únicamente bacterias iniciadoras)

Los frascos de yogurt contaminados con los patógenos se almacenaron en condiciones de refrigeración a temperaturas entre 2 - 6°C durante los 30 días de vida útil del yogurt. Durante los días 0, 5, 10, 15, 20, y 30 se realizaron los recuentos de bacterias patógenas en ambos tipos de yogurt con y sin ***Lactobacillus acidophilus***.

5.5.1 Determinación de la sobrevivencia de ***E. coli*** ATCC 25922 al yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y sin ***Lactobacillus acidophilus***

Inoculado los frascos de yogurt con ***E. coli*** ATCC 25922 se procedió según metodología descrita en la sección 4.7.1. Para ello se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada estéril. Luego cada una de éstas se inoculó por esparcimiento en Agar EMB, se incubaron a 37 °C, en atmósfera normal durante 2 días. Luego de la incubación, se realizaron los recuentos **de *E. coli***. Los recuentos fueron realizados al primer día de inoculación, al día 5, 10, 15, 20 y día 30.

En el cuadro N° 11 y cuadro N° 12 se muestra el resumen de los recuentos obtenidos de *E. coli* durante el monitoreo de 30 días ante la presencia de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* respectivamente.

Cuadro N° 11 Resumen de los recuentos de *E. coli* ATCC 25922 durante monitoreo de 30 días en yogurt con *Lactobacillus acidophilus*

Yogurt con Probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Conteos de <i>E. coli</i> a diferente concentración en Agar EMB		
Tiempo/Días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	1.7×10^2	1.0×10^6
10	0.0×10^0	6.9×10^4
15	0.0×10^0	1.2×10^3
20	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N°11 se observó que para el caso de yogurt con probiótico *Lactobacillus acidophilus* se necesitaron 10 días para no detectar la Presencia de *E. coli* a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, y que usando una concentración de 1.0×10^6 UFC/g se requirieron 20 días para no detectar crecimiento de este patógeno en el yogurt.

Cuadro N°12 Resumen de los recuentos de *E. coli* ATCC 25922 durante monitoreo de 30 días en yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*

Yogurt sin Probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Conteos de <i>E. coli</i> a diferente concentración en Agar EMB		
Tiempo/Días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	1.0×10^3	3.9×10^5
10	1.9×10^2	1.1×10^4
15	1.6×10^2	2.6×10^3
20	$0. \times 10^0$	1.6×10^2
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N°.12 se observó que para el caso de yogurt sin el probiótico *Lactobacillus acidophilus* se necesitaron 20 días para no detectar la presencia de *E. coli* a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, y usando una concentración de 1.0×10^6 UFC/g se observó que a partir del día 20 días ya no se detecta presencia de *E. coli*.

En el cuadro No.13 se demuestra el comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g

Cuadro N° 13 Comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g

Crecimiento de <i>E. coli</i> a concentración de 1.0×10^3 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^3	1.0×10^3
5	1.7×10^2	1.0×10^3
10	0.0×10^0	1.9×10^2
15	0.0×10^0	1.6×10^2
20	0.0×10^0	$0. \times 10^0$
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.13 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *E. coli*, no detectando a este patógeno en 10 días para el caso de yogurt con probiótico y 20 días para el yogurt sin probiótico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel del yogurt, se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiótico adicionado cuando tiene una carga bacteriana de *E. coli* de 1.0×10^3 UFC/g

En la figura N°.11 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *E. coli* 1.0×10^3 UFC/g

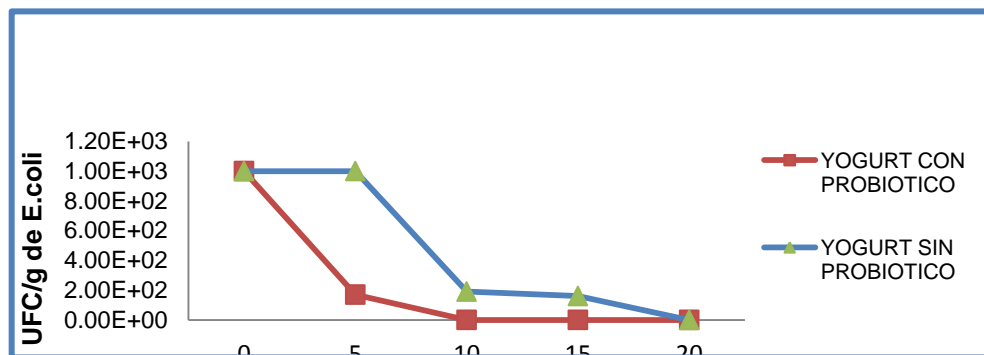


Figura N° 11 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración de *E. coli* 1.0×10^3 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^3 UFC/g de *E. coli* en el yogurt con probiótico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 10 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiótico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 20 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre la *E. coli*.

En el cuadro No.14 se presenta el comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

Cuadro N° 14 Comparativo de recuentos observados de *E. coli* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

Crecimiento de <i>E. coli</i> a concentración de 1.0×10^6 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^6	1.0×10^6
5	1.0×10^6	3.9×10^5
10	6.9×10^4	1.1×10^4
15	1.2×10^3	2.6×10^3
20	0.0×10^0	1.6×10^2
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.14 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *E. coli*, no detectando a este patógeno en 20 días para el caso de yogurt con probiótico y 30 días para el yogurt sin probiótico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel del yogurt, se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiotico adicionado cuando tiene una carga bacteriana de *E. coli* de 1.0×10^6 UFC/g

En la figura N.12 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *E. coli* 1.0×10^6 UFC/g

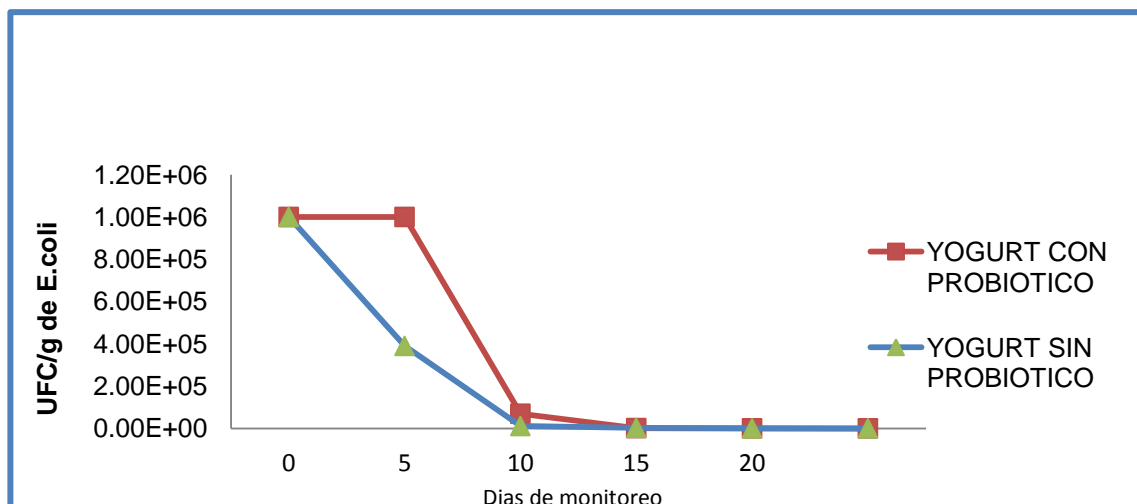


Figura N° 12 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración de *E. coli* 1.0×10^6 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^6 UFC/g de *E. coli* en el yogurt con probiótico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 20 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiótico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 30 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre la *E. coli*.

5.5.2 Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* ATCC 14028 al yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y sin *Lactobacillus acidophilus*

Inoculado los frascos de yogurt con *Salmonella enterica* ATCC 14028 se procedió según metodología descrita en la sección 4.7.2 un enriquecimiento previo con caldo lactosado, luego se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada estéril, cada una de éstas se inoculo por esparcimiento en Agar *Salmonella Shigella*, se incubaron a 37 °C, en atmósfera normal durante 2 días. Luego de la incubación, se realizaron los recuentos de *Salmonella*. Los recuentos fueron realizados al primer día de inoculación, al día 5, 10, 15, 20 y día 30.

En el cuadro N° 15 y cuadro N° 16 se muestra el resumen de los recuentos obtenidos de *Salmonella enterica* durante el monitoreo de 30 días ante la presencia de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y yogurt sin *Lactobacillus acidophilus* respectivamente.

Cuadro N° 15 Resumen de los recuentos de *Salmonella enterica* ATCC 14028 durante monitoreo de 30 días en yogurt con *Lactobacillus acidophilus*

Yogurt con Probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Conteos de <i>Salmonella enterica</i> a diferente concentración en Agar Salmonella Shigella		
Tiempo/días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	1.8×10^2	2.7×10^5
10	0.0×10^0	2.2×10^3
15	0.0×10^0	0.0×10^0
20	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.15 se observó que en el yogurt con probiotico **Lactobacillus acidophilus** se necesitaron 10 días para no detectar la presencia de **Salmonella enterica** a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, y que usando una concentración de 1.0×10^6 UFC/g se requirieron 15 días para no detectar crecimiento de este patógeno en el yogurt

Cuadro N° 16 Resumen de los recuentos de **Salmonella enterica** ATCC 14028 durante monitoreo de 30 días en yogurt sin **Lactobacillus acidophilus**

Yogurt sin Probiótico Lactobacillus acidophilus		
Conteos de Salmonella enterica a diferente concentración en Agar Salmonella Shigella		
Tiempo/Días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	1.0×10^3	4.1×10^5
10	1.1×10^2	3.8×10^5
15	0.0×10^0	1.9×10^4
20	0.0×10^0	1.0×10^2
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.16 se observó que para el caso de yogurt sin el probiotico **Lactobacillus acidophilus** se necesitaron 15 días para no detectar la presencia de **Salmonella** a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, y usando una concentración de 1.0×10^6 UFC/g se observó que a partir del día 30 días ya no se detecta presencia de **Salmonella**

Cuadro N° 17 Comparativo de recuentos observados de **Salmonella enterica** en el yogurt con y sin **Lactobacillus acidophilus** a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g

Crecimiento de Salmonella enterica a concentración de 1.0×10^3 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^3	1.0×10^3
5	1.8×10^2	1.0×10^3
10	0.0×10^0	1.1×10^2
15	0.0×10^0	0.0×10^0
20	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.17 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *Salmonella entérica*, no detectando a este patógeno en 10 días para el caso de yogurt con probiotico y 15 días para el yogurt sin probiotico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel el yogurt se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiotico adicionado.

En la figura No.13 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Salmonella* 1.0×10^3 UFC/g

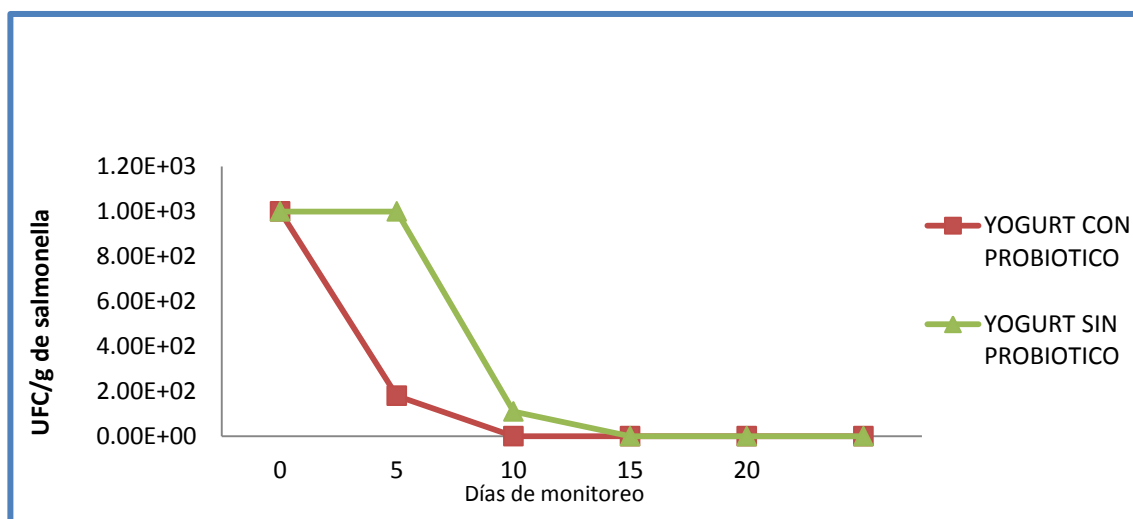


Figura N° 13 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración de *Salmonella enterica* 1.0×10^3 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^3 UFC/g de *Salmonella entérica* en el yogurt con probiotico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 10 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiotico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 15 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre *Salmonella*.

Cuadro N° 18 Comparativo de recuentos de *Salmonella enterica* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g

Crecimiento de <i>Salmonella</i> a concentración de 1.0×10^6 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^6	1.0×10^6
5	2.7×10^5	4.1×10^5
10	2.2×10^3	3.8×10^5
15	0.0×10^0	1.9×10^4
20	0.0×10^0	1.0×10^2
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N° 18 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *Salmonella entérica*, no detectando a este patógeno en 15 días para el caso de yogurt con probiótico y 30 días para el yogurt sin probiótico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel del yogurt, se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiótico adicionado cuando tiene una carga bacteriana de *Salmonella entérica* de 1.0×10^6 UFC/g

En la figura N° 14 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Salmonella* 1.0×10^6 UFC/g

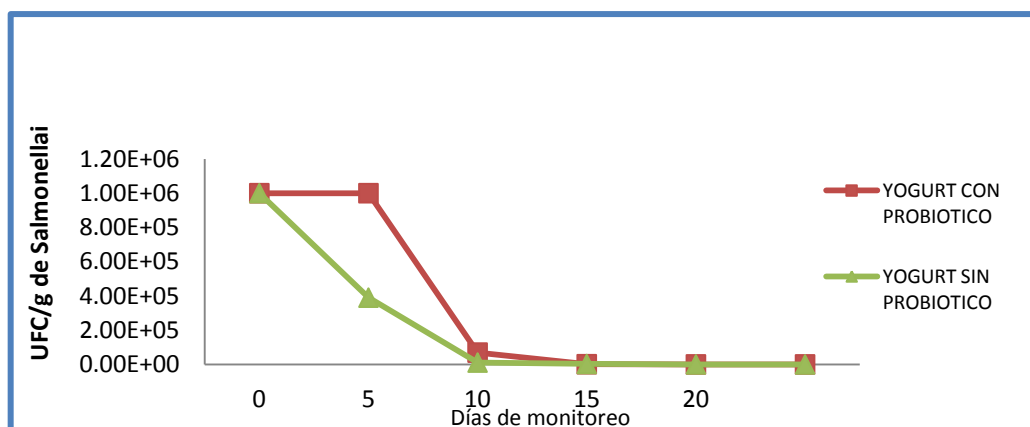


Figura N° 14 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración de *Salmonella enterica* 1.0×10^6 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^6 UFC/g de ***Salmonella enterica*** en el yogurt con probiotico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 15 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiotico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 30 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre la ***Salmonella enterica***

5.5.3 Determinación de la sobrevivencia de ***Vibrio cholerae*** al yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y sin ***Lactobacillus acidophilus***

Inoculado los frascos de yogurt con ***Vibrio cholerae*** se procedió según metodología descrita en la sección 4.7.3 para ello se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada estéril Luego cada una de éstas se inoculo por esparcimiento en Agar TCBS, se incubaron a 37 °C, en atmósfera normal durante 2 días. Luego de la incubación, las poblaciones se realizaron los recuentos de ***Vibrio cholerae***. Los recuentos fueron realizados al primer día de inoculación, al día 5, 10, 15, 20 y día 30

En el cuadro N° 19 y cuadro N° 20 se muestra el resumen de los recuentos obtenidos de ***Vibrio cholerae*** durante el monitoreo de 30 días ante la presencia de yogurt con ***Lactobacillus acidophilus*** y yogurt sin ***Lactobacillus acidophilus*** respectivamente.

Cuadro N° 19 Resumen de los recuentos de ***Vibrio cholerae*** durante monitoreo de 30 días en yogurt con ***Lactobacillus acidophilus***

Yogurt con Probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Conteos de <i>Vibrio cholerae</i> a diferente concentración en Agar TCBS		
Tiempo/Días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	2.0×10^2	4.2×10^5
10	1.6×10^2	1.8×10^3
15	0.0×10^0	0.0×10^0
20	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N° 19 se observó que en el yogurt con probiótico *Lactobacillus acidophilus* se requirieron 15 días para no detectar la presencia de *Vibrio cholerae* a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, así como para una concentración de 1.0×10^6 UFC/g también se requirieron 15 días para no detectar crecimiento de este patógeno en el yogurt.

Cuadro N° 20 Resumen de los recuentos de *Vibrio cholerae* durante monitoreo de 30 días en yogurt sin *Lactobacillus acidophilus*

Yogurt sin Probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Conteos de <i>Vibrio cholerae</i> a diferente concentración en Agar TCBS		
Tiempo/Días	1.0×10^3 UFC/g	1.0×10^6 UFC/g
0	1.0×10^3	1.0×10^6
5	2.7×10^2	1.7×10^5
10	1.4×10^2	1.2×10^5
15	1.0×10^2	1.4×10^3
20	0.0×10^0	1.0×10^3
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N° 20 se observó que para el caso de yogurt sin el probiótico *Lactobacillus acidophilus* se necesitaron 20 días para no detectar la presencia de *Vibrio cholerae* a una concentración de 1.0×10^3 UFC/g, y 30 días para inhibir una concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

Cuadro N° 21 Comparativo de recuentos observados de *Vibrio cholerae* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g

Crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> a concentración de 1.0×10^3 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^3	1.0×10^3
5	2.0×10^2	2.7×10^2
10	1.6×10^2	1.4×10^2
15	0.0×10^0	1.0×10^2
20	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.21 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *Vibrio cholerae*, no detectando a este patógeno en 15 días para el caso de yogurt con probiotico y 20 días para el yogurt sin probiotico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel del yogurt, se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiotico adicionado cuando tiene una carga bacteriana de *Vibrio cholerae* de 1.0×10^3 UFC/g

En la figura No.15 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Vibrio cholerae* de 1.0×10^3 UFC/g

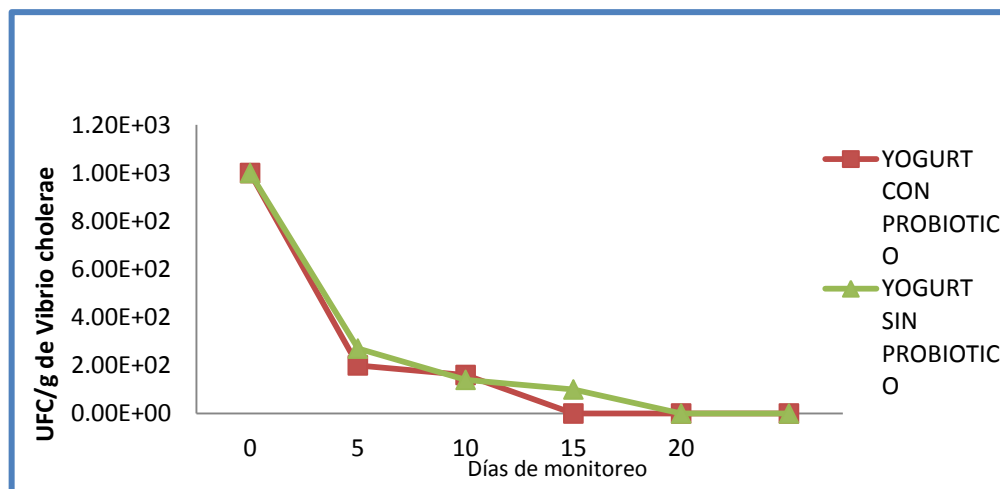


Figura N° 15 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Vibrio cholerae* 1.0×10^3 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^3 UFC/g de *Vibrio cholerae* en el yogurt con probiotico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 15 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiotico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 20 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre *Vibrio cholerae*.

Cuadro N° 22 Comparativo de recuentos observados de *Vibrio cholerae* en el yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g

Crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> a concentración de 1.0×10^6 UFC/g		
Tiempo/Días	YOGURT CON PROBIOTICO	YOGURT SIN PROBIOTICO
0	1.0×10^6	1.0×10^6
5	4.2×10^5	1.7×10^5
10	1.8×10^3	1.2×10^5
15	0.0×10^0	1.4×10^3
20	0.0×10^0	1.0×10^3
30	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No.22 se observó que en ambos tipos de yogurt se inhibe el crecimiento de *Vibrio cholerae*, no detectando a este patógeno en 15 días para el caso de yogurt con probiotico y 30 días para el yogurt sin probiotico. Observando que a lo largo de los 30 días de vida de anaquel del yogurt, se produce un mayor efecto antagónico para el yogurt con probiotico adicionado cuando tiene una carga bacteriana de *Vibrio cholerae* de 1.0×10^6 UFC/g

En la figura No.16 se muestra el comparativo de ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Vibrio cholerae* 1.0×10^6 UFC/g

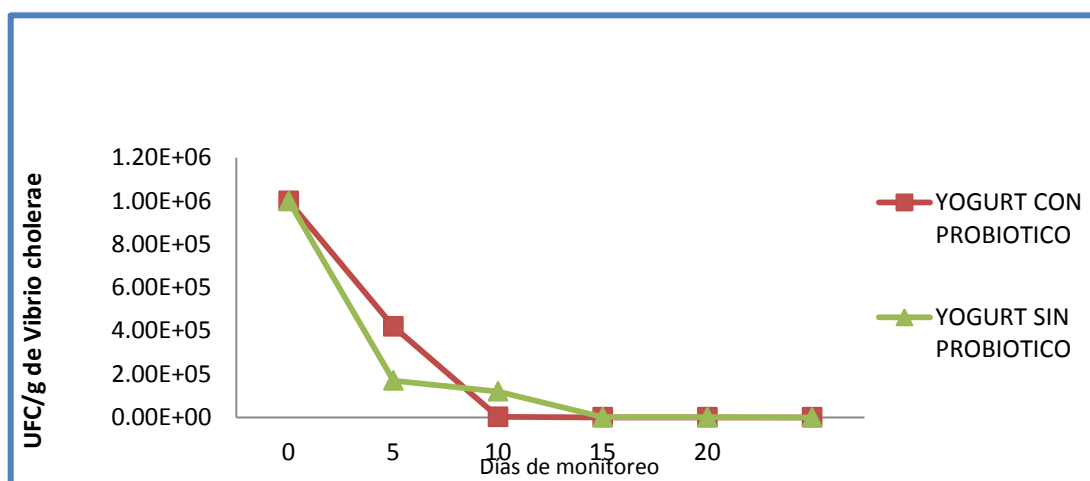


Figura N° 16 Grafico comparativo de conteos en ambos tipos de yogurt a la misma concentración inicial de *Vibrio cholerae* 1.0×10^6 UFC/g

En la gráfica se muestra que a una concentración inicial de 1×10^6 UFC/g de ***Vibrio cholerae*** en el yogurt con probiotico se tiene un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano de este patógeno ya que se observa que a partir del día 15 ya no es detectado su crecimiento, igual efecto inhibitorio se demuestra en el yogurt sin probiotico aunque en menor intensidad ya que se demuestra que se requiere de 30 días para observar efecto inhibitorio de las cepas de yogurt sobre ***Vibrio cholerae***.

En el cuadro No. 23 se describe el comparativo del comportamiento de los tres patógenos: ***E. coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae*** a la misma concentración de 1×10^3 ufc/g en los dos tipos de yogurt con y sin ***Lactobacillus acidophilus***.

Cuadro N° 23 Comparativo de los tres patógenos a la concentración de 1×10^3 UFC/g en ambos tipos de yogurt

Tiempo/ días	Con Probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
0	1.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^3
5	1.0×10^3	1.0×10^3	1.8×10^2	1.0×10^3	2.0×10^2	2.7×10^2
10	0.0×10^0	1.9×10^2	0.0×10^0	1.1×10^2	1.6×10^2	1.4×10^2
15	0.0×10^0	1.6×10^2	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	1.0×10^2
20	0.0×10^0	$0. \times 10^0$	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0
30	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro No. 23 se observó el comportamiento de los tres patógenos en estudio en ambos tipos de yogurt y evaluadas en los 30 días de monitoreo. Se evidencia en las tres bacterias la disminución de carga microbiana es más evidente en el yogurt que tiene el ***Lactobacillus acidophilus***, sin embargo también se observa disminución de las poblaciones en el yogurt sin probiotico, demostrando que las bacterias lácticas presentes en el yogurt tienen un efecto

inhibitorio sobre los tres patógenos en estudio pero demostrando que el efecto es más rápido y significativo en el yogurt que contiene el probiotico ***Lactobacillus acidophilus***, además se evidencia que usando yogurt con probiotico de las 3 bacterias patógenas en estudio son ***E. coli*** y ***Salmonella*** quienes disminuyeron su población hasta no ser detectadas después de los 10 días de monitoreo cuando se encuentran a concentraciones de 1.0×10^3 UFC/g

En el cuadro N° 24 se describe el comparativo del comportamiento de los tres patógenos: ***E. coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae*** a la misma concentración de 1×10^6 ufc/g en los dos tipos de yogurt con y sin ***Lactobacillus acidophilus***

Cuadro N° 24 Comparativo de los tres patógenos a la concentración de 1×10^6 UFC/g en ambos tipos de yogurt

Tiempo/ días	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
0	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6
5	1.0×10^6	3.9×10^5	2.7×10^5	4.1×10^5	4.2×10^5	1.7×10^5
10	6.9×10^4	1.1×10^4	2.2×10^3	3.8×10^5	1.8×10^3	1.2×10^5
15	1.2×10^3	2.6×10^3	0.0×10^0	1.9×10^4	0.0×10^0	1.4×10^3
20	0.0×10^0	1.6×10^2	0.0×10^0	1.0×10^2	0.0×10^0	1.0×10^3
25	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0	0.0×10^0

En el cuadro N° 24 se observó que usando yogurt con probiotico en los tres patógenos se produce una disminución de la población hasta no ser detectada luego de los 20 días para el caso de ***E. coli*** y 15 días para ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae*** de monitoreo, demostrando que también en el yogurt sin probiotico se produce un efecto inhibitorio del crecimiento microbiano, observando disminución de la población de ***E. coli***, ***Salmonella enterica*** y ***Vibrio cholerae*** hasta no ser detectadas luego de los 30 días de monitoreo cuando se encuentran a una concentración de 1×10^6 UFC/g

5.6 Medición del pH en ambos tipo de yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus*

En el cuadro N° 25 se demuestra la medición del pH en ambos tipos de yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus*, se demuestra que durante los 30 días de monitoreo el pH de ambos tipos de yogurt y a ambas concentración de patógenos se mantuvo en un rango entre 4.25 – 4.40 ya que la tendencia a observar una pequeña disminución de pH es normal y se debe a las bacterias ácido lácticas presentes en el yogurt el cual como parte del proceso de fermentación las tienden a consumir los azúcares presentes dando como resultado producción de ácido láctico y de otros compuestos volátiles que producen un descenso en el potencial hidrogeno. Al comparar los 2 diferentes tipos de yogurt (con y sin *Lactobacillus acidophilus*) no se observa diferencia en los valores de pH, además se demuestra que pese a las concentraciones bacterianas de patógenos, la acidez del yogurt se mantiene en un rango entre 4.25 – 4.40 a temperatura de refrigeración entre 2 - 6°C demostrando estabilidad del producto que contiene las bacterias lácticas del yogurt. Los resultados demuestran que el pH no se ve afectado por acción ni de las cargas microbianas patógenas, ni la presencia de bacterias ácido lácticas presentes en el yogurt.

Cuadro N° 25 pH en ambos tipos de yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* y patógenos a concentraciones de 1.0×10^3 UFC/g

MEDICION DE PH CONCENTRACIONES DE PATOGENOS DE 1.0×10^3 UFC/g						
Días	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Vibrio cholerae</i>	
	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico
0	4.38	4.41	4.36	4.39	4.40	4.38
5	4.34	4.38	4.36	4.39	4.39	4.36
10	4.34	4.36	4.32	4.30	4.33	4.32
15	4.27	4.28	4.31	4.28	4.30	4.31
20	4.26	4.27	4.27	4.26	4.27	4.28
30	4.26	4.25	4.26	4.26	4.25	4.27

Cuadro N° 26 pH en ambos tipos de yogurt con y sin *Lactobacillus acidophilus* y patógenos a concentraciones de 1.0×10^6 UFC/g

MEDICION DE PH CONCENTRACIONES DE PATOGENOS DE 1.0×10^6 UFC/g						
Días	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Vibrio cholerae</i>	
	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico	Con probiotico	Sin probiotico
0	4.36	4.38	4.38	4.36	4.39	4.40
5	4.34	4.38	4.37	4.33	4.36	4.36
10	4.32	4.31	4.34	4.33	4.35	4.35
15	4.26	4.30	4.30	4.28	4.31	4.30
20	4.25	4.26	4.27	4.27	4.29	4.30
30	4.25	4.25	4.26	4.27	4.26	4.27

La disminución en los valores de pH en el yogurt aunque es poco significativa, resulta del proceso normal de la fermentación de yogurt ya que las bacterias lácticas presentes aún son capaces de consumir lactosa como parte de fermentación de carbohidratos y producir como parte del metabolismo ácido láctico. Los rangos de pH obtenidos en las dos diferentes concentraciones de patógenos demuestran que el pH se mantuvo en el intervalo de 4.25-4.40 en ambos tipos de yogurt.

5.7 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizara un diseño estadístico de parcelas subdivididas y se realizó el análisis de varianza.

El total de tratamientos fue de 12 y se realizaron 3 repeticiones.

Se consideraron 3 factores: Tipos de yogurt, concentraciones de los patógenos, microorganismos patógenos. El detalle descriptivo es el siguiente:

Factor A: 2 diferentes tipos de Yogurt:

Yogurt sin Probiotico (Ysp)

Yogurt sin Probiotico (Ycp)

Factor B: Concentraciones de los Patógenos

1.0×10^3 UFC/g

1.0×10^6 UFC/g

Factor C: Microorganismos patógenos en estudio

E. coli

Salmonella enterica

Vibrio cholerae

➤ **ANALISIS DE VARIANZA**

GI= grados de Libertad

Factor de variación	GI
Repeticiones	5 (6-1)
Tratamiento	11 (12-1)
A	1
B	1
AxB	1
C	2
AxC	2
BxC	2
AxBxC	2
Error	55
Total	71 ((72-1)

TOTAL (n) = (12) (6) = 72

Tabla de análisis de Varianza					
F de V	GL	SC	CM	Fc	F tabla (0.05)
Repet	$\frac{(r-1)}{5}$	6764173.35	1352834.6	0.38	5.05
Factor A (Yogurt)	$\frac{(a-1)}{1}$	34018.2	34018.2	0.01	6.61
Error (a)	$\frac{(r-1)(a-1)}{5}$	17463670	3492734		
Factor B (Concentración) =[]	$\frac{(b-1)}{1}$	1431215.88	$\frac{1431215.8}{8}$	4.9	4.96
A*B	$\frac{(a-1)(b-1)}{1}$	26342.2	26342.2	0.09	4.96
Error (b)	$\frac{(r-1)a(b-1)}{10}$	2920019.2	292001.92		
Factor C (microorganismo)	$\frac{(c-1)}{2}$	586946.34	293473.17	7.31	3.23
A*C	$\frac{(a-1)(c-1)}{2}$	774713.67	387356.83	9.65	3.23
B*C	$\frac{(b-1)(c-1)}{2}$	60360.71	30180.35	0.75	3.23
A*B*C	$\frac{(a-1)(b-1)(c-1)}{2}$	14880486	7440243	185.54	3.23
Error©	$\frac{ab(r-1)(c-1)}{40}$	1603984.7	40099.61		
Total	71				

El valor de F para Yogurt (A) no es significativo. Esto indica que los dos tipos de Yogurt han tenido éxito en conducir el experimento de una manera uniforme. Puesto que F para Concentración (B) no es significativo, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre las potencias de las dos concentraciones que se han probado en este experimento; no así en F para microorganismo (C) es significativo, podemos concluir que existen diferencias significativas entre las potencias de la patogenicidad de los tres microorganismo que se han investigado en este experimento.

La interacción Yogurt y Concentración al no ser significativa, asegura que las 2 concentraciones entre ellas mantienen las mismas diferencias relativas durante la vida útil del yogur, no importa cuál es el Tipo de yogur (con probiótico o sin

probiótico). Esta información es importante ya que esto asegura la uniformidad en la calidad del producto elaborado.

El microorganismo es significativo, lo cual implica que la potencia del microorganismo depende de la concentración que se adiciono a cada tipo de yogurt.

La interacción yogurt y microorganismo es significativa. Esto indica que el factor yogurt y el factor microorganismo no son independientes. La interacción concentración y microorganismo no es significativa indicando que la viabilidad del microorganismo no depende de la concentración sino del tipo de yogurt elaborado en la investigación. La interacción triple Yogurt, Concentración y microorganismo es significativa lo que implica que el tipo de patógeno así como su concentración y el tipo de yogurt utilizado en la investigación está relacionado. El yogurt elaborado con probiotico presenta, más efecto inhibitorio sobre el microorganismo en estudio.

➤ **Discusión de Resultados**

Los recuentos de la cepa probiótica utilizada ***Lactobacillus acidophilus*** se mantuvieron constantes durante los primeros 20 días de monitoreo, manteniendo recuentos próximos a 1×10^6 UFC/g y disminuyendo el número de bacterias lácticas para el día 30 hasta recuentos de 8.4×10^5 UFC/g.

El yogurt con probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** disminuyó la población de ***E. coli*** a niveles no detectables en 10 días de almacenamiento a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g y 20 días a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

El yogurt con probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** disminuyó la población de ***Salmonella enterica*** a niveles no detectables en 10 días de almacenamiento a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g y 15 días a la concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

El yogurt con probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** disminuyó la población de ***Vibrio cholerae*** a niveles no detectables en 15 días de almacenamiento a la concentración de 1.0×10^3 UFC/g y lo mismo para la concentración de 1.0×10^6 UFC/g.

El nivel de pH para ambos tipos de yogurt se mantuvo en un rango de disminución poco significativo de 4.25 – 4.40 durante los 30 días de monitoreo, no se detectó ninguna diferencia en el pH del yogurt que contenía probiótico o sin probiótico

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Debido a la fermentación del yogurt producida por la presencia de las bacterias lácticas que son capaces de consumir lactosa como parte de fermentación de carbohidratos y producir el ácido láctico en los sistemas de yogurt analizados, no se generó una disminución significativa del pH durante los 30 días de la investigación.
2. El pH en ambos tipos de yogurt y a las concentraciones de patógenos de 1×10^3 UFC/g y 1×10^6 UFC/g se mantuvo en el intervalo entre 4.25-4.40 durante los 30 días de ensayo del yogurt con y sin probiótico, la acidez existente permite controlar el crecimiento de los patógenos debido a que muchos son inhibidos a pH bajos.
3. En el yogurt sin probiótico también presentó efecto antagónico para inhibir cepas de patógenos aunque con mayor tiempo esto significa que los cultivos lácticos iniciadores de yogurt (***Streptococcus termophilus*** y ***Lactobacillus bulgaricus***) son capaces de producir inhibidores de patógenos como bacteriocinas.
4. El conteo de bacterias ácido lácticas en ambos tipos de yogurt se mantuvieron constantes en 1×10^6 UFC/g, únicamente evidenciando una disminución al día 30 de evaluación en 8.4×10^5 UFC/g de concentración de ***Lactobacillus acidophilus***.
5. Los recuentos constantes de ***Lactobacillus acidophilus*** demuestran viabilidad y estabilidad de las bacterias lácticas en el yogurt manteniéndolo almacenado en condiciones de refrigeración.

6. Se detectó mayor efecto antagónico del yogurt con probiótico en ***E. coli*** y en ***Salmonella enterica*** (bacterias Gram -) y menor efecto en ***Vibrio cholerae***, las tres bacterias son gram negativas, esto está en contraste con lo que menciona la teoría que se obtiene mayor eficiencia de inactivación de patógenos para el caso de Gram + y su pared celular más sensible a efecto de bacteriocinas producidas por probióticos, demostrando que las bacterias gram negativas pueden ser inhibidas por presencia de las bacterias ácido lácticas.
7. Los resultados de la investigación demuestran la capacidad que tiene el yogurt con probiótico ***Lactobacillus acidophilus*** sobre su efecto para inhibir y competir contra ciertos patógenos intestinales.
8. El uso de probióticos en el yogurt potencia su efecto sobre patógenos intestinales causantes de enfermedades como Salmonelosis, cólera y otras infecciones intestinales
9. El tiempo de sobrevivencia de patógenos en el yogurt dependerá de la dosis infectante, en esta investigación se comprobó que el yogurt contaminado con una concentración de 1×10^3 UFC/g de patógenos se produjo un efecto más rápido que la inhibición de patógenos a la concentración de 1×10^6 UFC/g.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Elaborar un manual técnico que permita realizar la estandarización bacteriana por medio de espectrometría, este manual permitiría facilidad en el aprendizaje de estandarización cuantitativa para cepas bacterianas.
2. Realizar el proceso de inoculación de las cepas patógenas el mismo día de la estandarización ya que la solución salina usada para la calibración de la concentración no garantiza la viabilidad de las cepas bacterianas.
3. Emplear buenas prácticas de manufactura en la elaboración del yogurt para evitar la contaminación del producto elaborado, ya que en esta investigación se ha comprobado que aun en almacenamiento a temperaturas de refrigeración los patógenos han sobrevivido, siendo peligro potencial de causar enfermedad al consumidor.
4. Incentivar a la población al consumo de productos lácteos y leches fermentadas como el yogurt ya que constituyen un vehículo para el aporte de bacterias benéficas y viables, además aportan nutrientes a quien los consume, por lo que se recomienda el consumo de derivados lácteos que contengan este tipo de bacterias probióticas.
5. Concientizar a la población que el consumo de suplementos alimenticios como los probioticos le benefician fisiológicamente en la modulación de la mucosa intestinal y el sistema inmunológico.
6. Realizar un cuidadoso análisis previo la leche, el uso de cultivos iniciadores activos y un adecuado manejo de los productos cultivados podría garantizar la ausencia de estos patógenos en estos alimentos.

7. Investigar por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo* a fin de conocer mejor la capacidad de los microorganismos probióticos para funcionar en el organismo humano y su acción contra los microorganismos patógenos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Alais, Ch. Ciencia de la leche Principios de técnica lechera. México: Continental; 1998.
2. Alvarez-Olmos, M. I. Probiotic agents and infectious diseases a modern perspective on a traditional therapy. En: OBERHELMAN, Director. Clinical Infectious Diseases. 3^aed. Cuba. ClinInfent; 2001.p. 1567–1576
3. Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria En: Salmminen S, Editor. Microbiology and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker; 1998.p. 1-72.
4. Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Appl. Environm 1984 Microbiología. 26: 328-334.
5. Calderón O y varios. 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. 2007.
6. Campos JA. Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul 26-37. 2002
7. Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. Bacteriocin production: a probiotic trait Applied and Environmental Microbiology 2012, ch 78:1–6.

8. Food on Drug Administration .Bacteriological Analytical Manual.(BAM).EE.UU. 7^aed: AOAC; 1992.
9. Food on Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). [sede web] EE.UU. 2010. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.html>.
10. Escuela Centroamericana de Ganadería. Manual para Capacitación de Agroindustrias Lácteas. Costa Rica: Atenas; 1999.p.63.
11. Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic applied and Environmental Microbiology 78:1–6
12. FAO/OMS. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, 2001. p.2.
13. Ferrer B, Dalmau J. Alimentos funcionales: probióticos. Acta Pediatr Esp 2001; 59: 150- 155.
14. Gilliland's, C R Nelson .Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology.1985; 49: 377-381.
15. Gómez, G. (2003). Los probióticos. Una alternativa en el tratamiento de enfermedades. España, 2008, consultado en:
<http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>
16. Guarner, Khan Guías prácticas de la OMGE Probióticos y prebióticos 2008

17. Holzapfel, W. H. Introduction to prebiotics and probiotics. Probiotics in Food Safety Human Health Editec: Goktepe Ipek, M. Taylor & Francis 2006. 1,1-33
18. James M. Gray. Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ªed. Zaragoza España: Acribia.2002.p. 134.
19. Jawetz, Melnick&Adelberg`s.Vibrios, Campilobacterias y bacterias relacionadas. En: Manual Moderno, Editor. Microbiología Médica.15ª ed. México: Manual Moderno; 1995.p.215-217.
20. Kosin, B., Rakshit, SK. Microbial and Processing Criteria for production of Probiotics: A Review. Food Technol 2006. Biotechnol 44, 371-379
21. Laboratorios Merck. Manual de Merck de medios de cultivo.12ª Ed. España: Merck; 2000.p.404.
22. Marteau P, Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of Probiotics. Am J ClinNutr. 2001; 73(2): 430-436.
23. Mateos JA. Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En Alimentos Funcionales. Probióticos. Ed. Médica Panamericana. 2002, Cap. 6.
24. Norma del Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003.

25. Pelczar, M.; Chang, R. Clinical applications of probiotic agents. En: Saavedra JM, Coordinador. MICROBIOLOGÍA. 2ª ed. México: Graw Hill; 200.p. 1147-1151.
26. Penna FJ. Diarrea y Probioticos. Simposio sobre Utilidad de los probioticos en el manejo de las diarreas. Revista de enfermedades infecciosas en pediatría. 1998; 9(6):182-187.
27. Peter Feng, Stephen D. Weagant (ret.), Michael A. Grant .Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. En: William Burkhardt Coordinador. Bacteriological. Analytical Manual. 8ª ed. E.E.U.U:CFSAN. 1998.
28. Productos lácteos. Yogurt especificaciones. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.10:08 Diario Oficial, N° 384 (28/07/2009)
29. Riley LW. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. 1983; 308
30. Saavedra, J. M. Clinical applications of probiotic agents. Amer. J. Clin. Nutr. 2001; 29(4): 1147-1151.
31. Saavedra JM. Microbes to fight microbes: A not so novel approach to controlling diarrheal disease. J. Pediatr Gastroenterol Nutr 1995; 21: 125-129.
32. Salminen, S. and Von Wrigh, A. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker: Inc New York; 1993.

33. Samaniego Fernández LM, Sosa del Castillo M. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. (artículo en internet) Disponible en <http://revistas.mes.edu.cu/greenstone/collect/repo/import/repo/20081023/9789591601131.pdf>
34. Santos Moreno A. Manual de Elaboración de Productos Lácteos. Universidad Autónoma Chapingo: Depto Ingeniería Agroindustrial; 2001. p.133.
35. Samaniego F. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas, Cuba. P 5,6
36. Stanton, William J. Comportamiento del consumidor. 9^a Ed. México: Thomson; 2004.
37. González-Martínez y otros. BACTERIOCINAS DE PROBIÓTICOS. Facultad de Salud Pública y Nutrición, 2003, Vol. 4 No.2
38. Vela, G. Applied Food Microbiology. CA: Star; 1997.
39. Wood, B.J. The lactic acid bacteria in health and disease. London: El Sevier Applied Science; 1992.

GLOSARIO

GLOSARIO

Bacterias ácido lácticas: Grupo heterogéneo de bacterias Gram + no espatuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación de azúcares.

Bacterias anaerobias: Son bacterias que no viven ni proliferan en presencia de oxígeno.

Bacterias aerobias facultativas: Bacterias que pueden adaptarse para crecer y metabolizar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Bacterias aerobias mesofilas: Son bacterias que viven en presencia de oxígeno libre a temperaturas entre 15° y 45°C.

Bacteriocinas: Toxina proteica sintetizada por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de otras cepas.

Cepa: Conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica o una variante fenotípica de una especie.

Cepa ATCC: Material biológico de referencia certificado; ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU.

Colonias: Grupos discretos de microorganismos sobre una superficie.

Efecto Antagónico: Es la consecuencia de una sustancia o grupo de sustancias que contrarresta los efectos de otra.

Estandarizar: Ajustar una concentración bacteriana a la cantidad necesaria para producir el efecto deseado.

Incubación: Mantener la mezcla de leche a una temperatura promedio durante cierto tiempo.

Inocular: Consiste en incorporar a la leche el cultivo activado de yogurt (bacterias ácido lácticas) en la proporción adecuada.

Inocuidad de alimentos: Acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin abarcan toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo.

Microorganismos patógenos: Microorganismos capaces de penetrar y multiplicarse en otros seres vivos, a los que perjudican, originando una infección.

pH: Concentración de iones hidronio $[H_3O^+]$ presentes en determinadas sustancias. Medida de acidez o alcalinidad de una disolución.

Tramitancia: Fracción de luz incidente, a una longitud de onda especificada, que pasa a través de una muestra.

Probióticos: Son microorganismos que se adicionan a un alimento y que permanecen activos en el intestino y ejercen efectos fisiológicos. Contribuyen al equilibrio de la flora intestinal del huésped.

Unidades formadoras de colonias (UFC): Expresa el número de colonias originadas, a partir de una célula o agrupaciones de células.

Yogur: Es el producto lácteo pasteurizado obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Los microorganismos vivos presentes en el

producto final deben ser de los tipos antes mencionados y su contenido abundante.

Yogur natural: Es el yogur que no lleva colorantes, aromatizantes ni edulcorantes.

ANEXOS

ANEXO 1

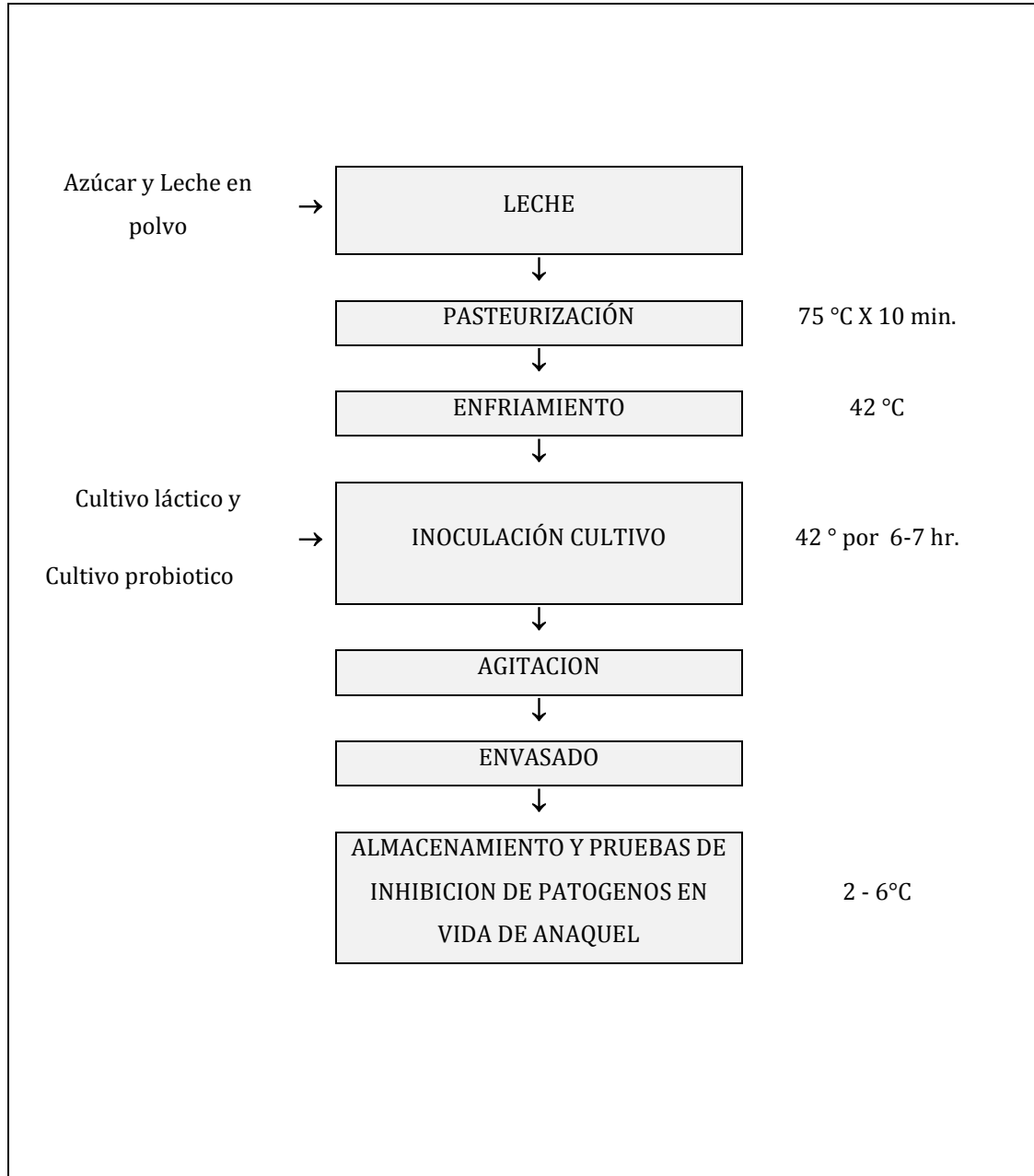


Figura N° 1 DIAGRAMA DE FLUJO PREPARACION DE YOGURT

ANEXO 2

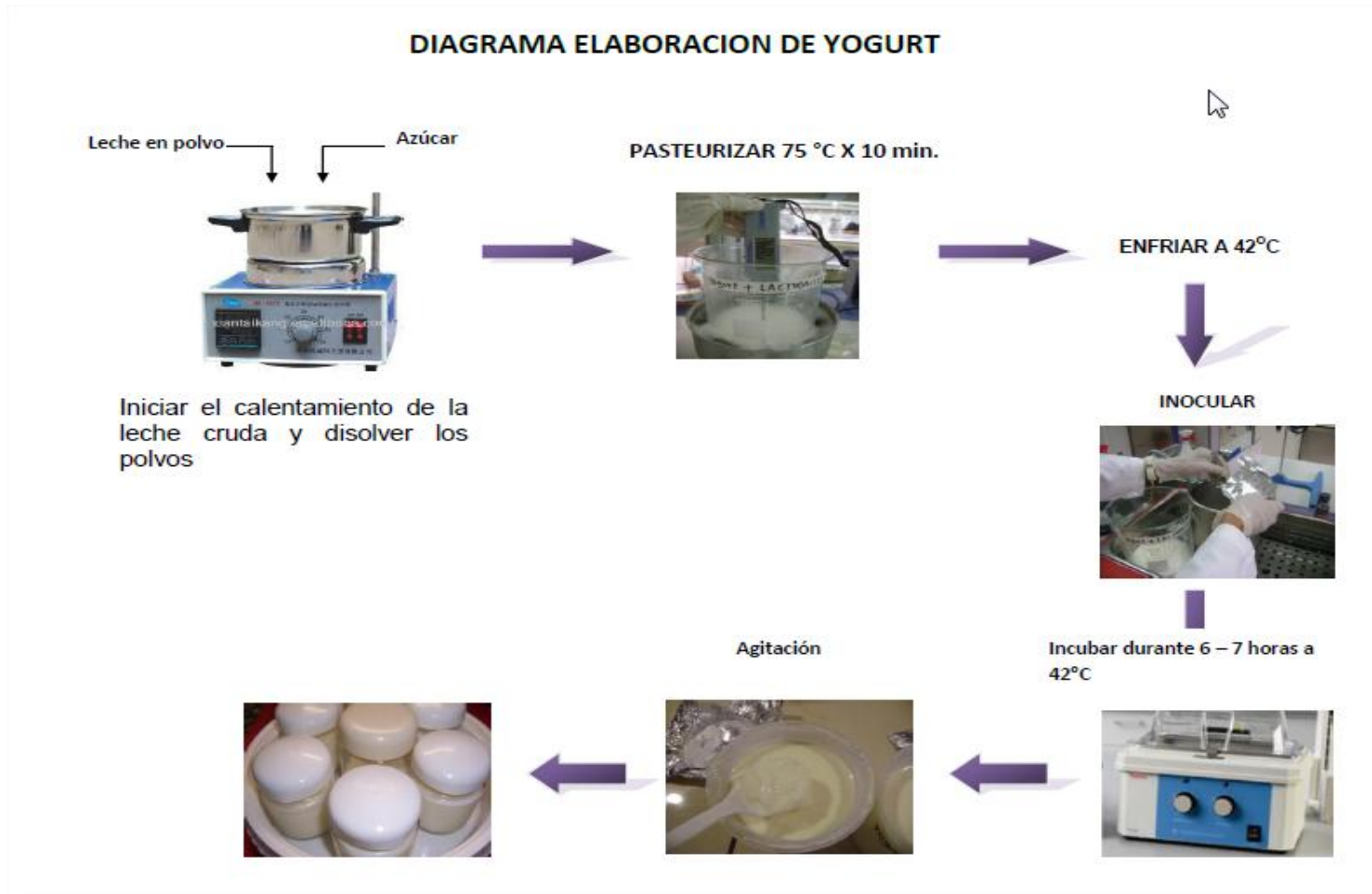


Figura N° 2 DIAGRAMA METODOLOGICO- ELABORACION DE YOGURT

ANEXO 3

PREPARACION DE LA CONCENTRACION DE *Lactobacillus acidophilus*

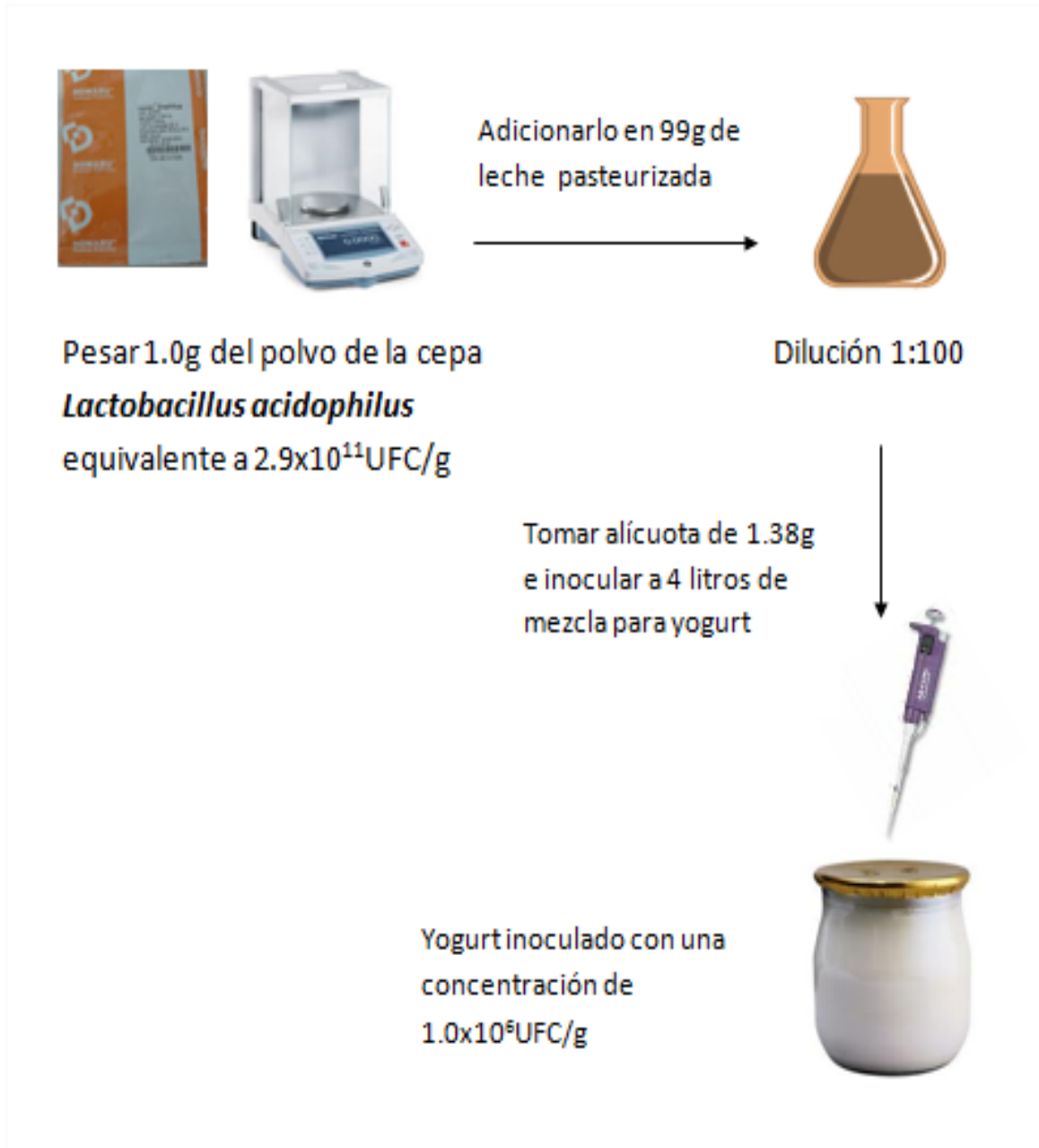


Figura N° 3 Preparación de la concentración de *Lactobacillus acidophilus*

Anexo 4

DIAGRAMA FASE DE PREPARACION PREVIA A ESTUDIO INHIBICION

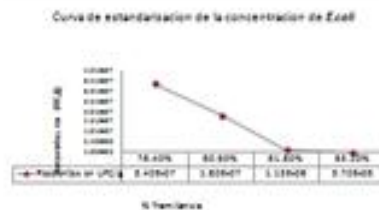
1. Aislamiento de Cepas patógenas



2. Identificación de los patógenos



3. Estandarización de las concentraciones de patógenos





4. Preparación del cultivo probiotico a la concentración del estudio



5. Elaboración de Yogurt



6. Estudio de efecto antagónico de yogurt sobre cepas patógenas

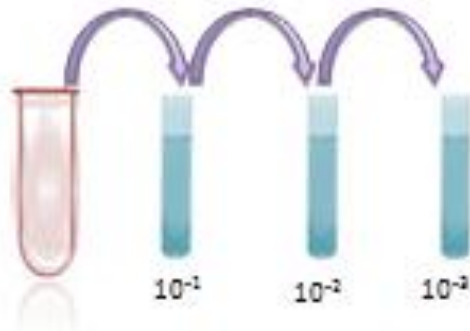
FIGURA N° 4 Diagrama fase de preparación previa al estudio de inhibición

Anexo 5

DIAGRAMA DE ESTANDARIZACION DE CONCENTRACIONES DE PATOGENOS



Tomar asada de Placa con bacteria Patógena en Agar TSA y hacer una solución matriz con solución salina



Realizar diluciones con solución salina estéril para obtener las concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} UFC/ml



Hacer lectura en espectrofotómetro a 580nm

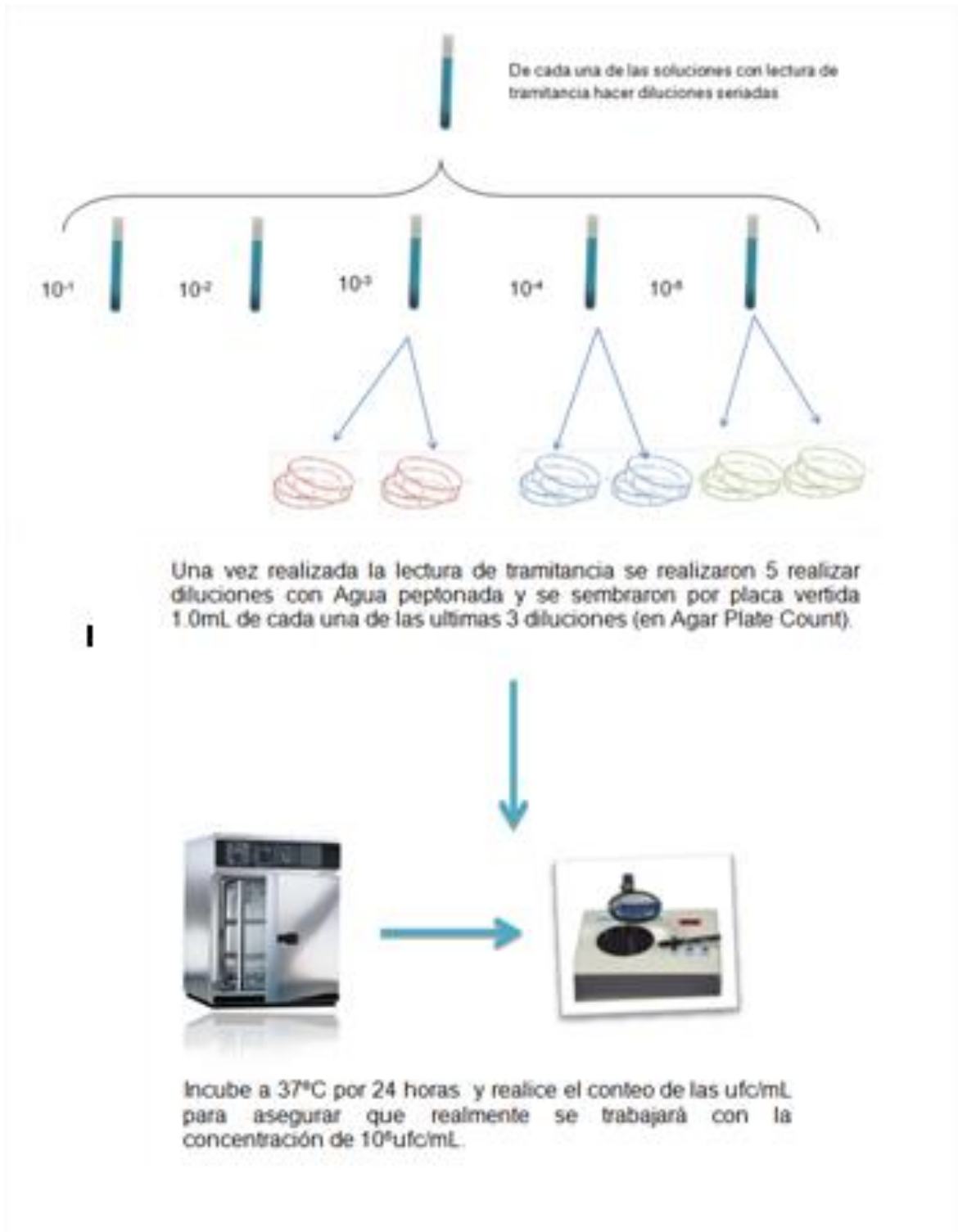


FIGURA N° 5 Diagrama de estandarización de la concentración de patógenos

Anexo 6

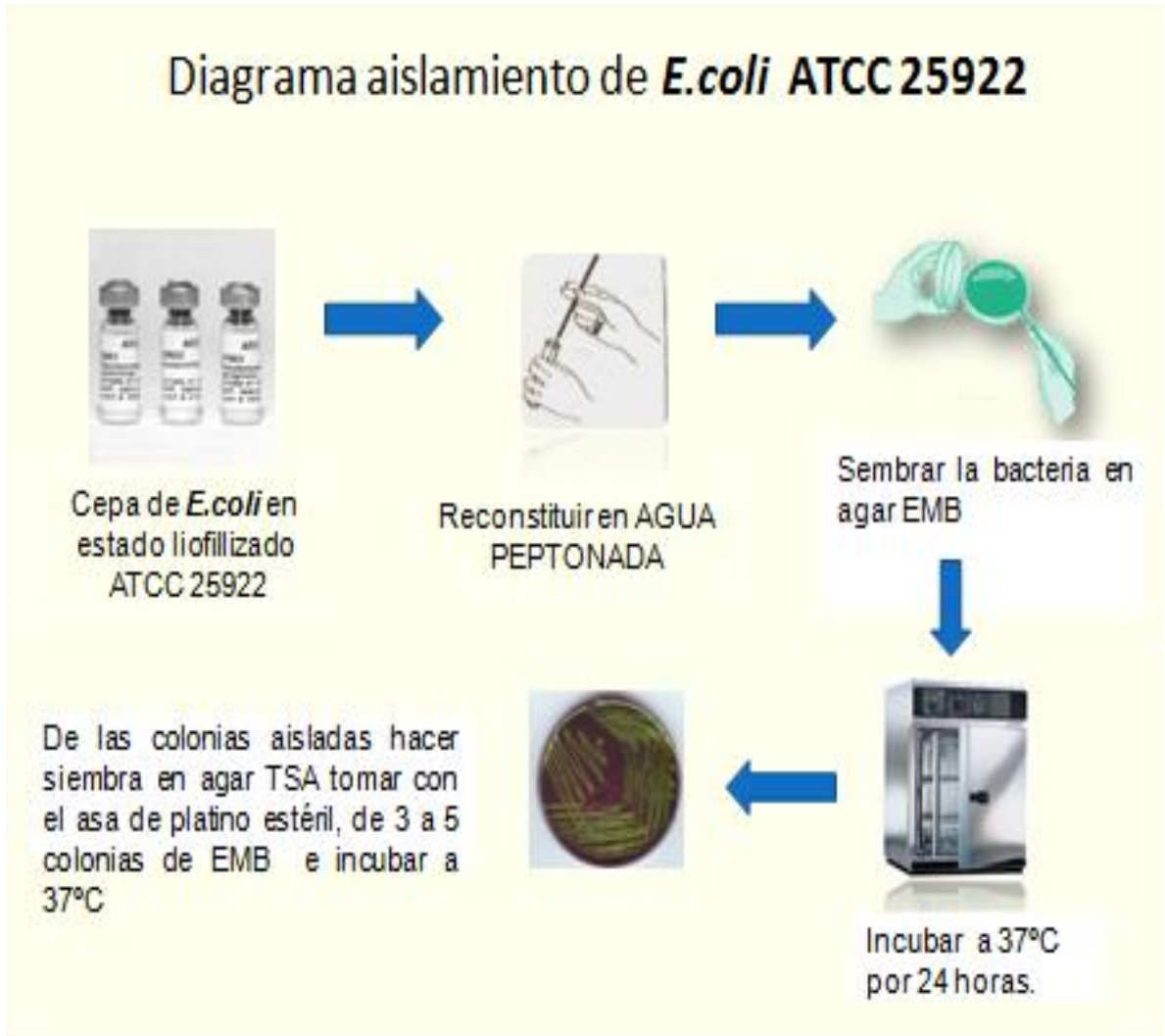


FIGURA N° 6 Diagrama aislamiento de *E. coli* ATCC 25922

Anexo 7

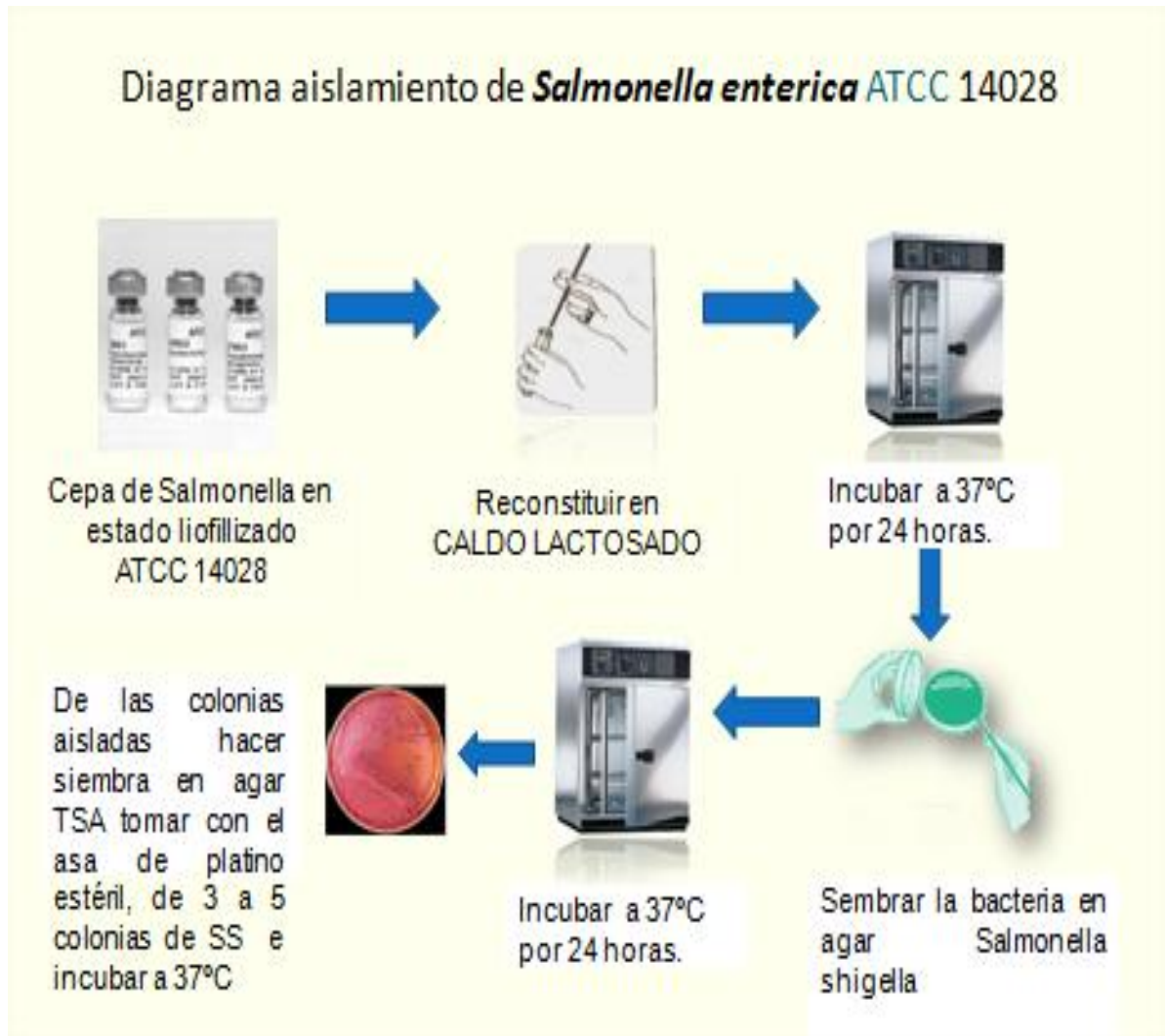


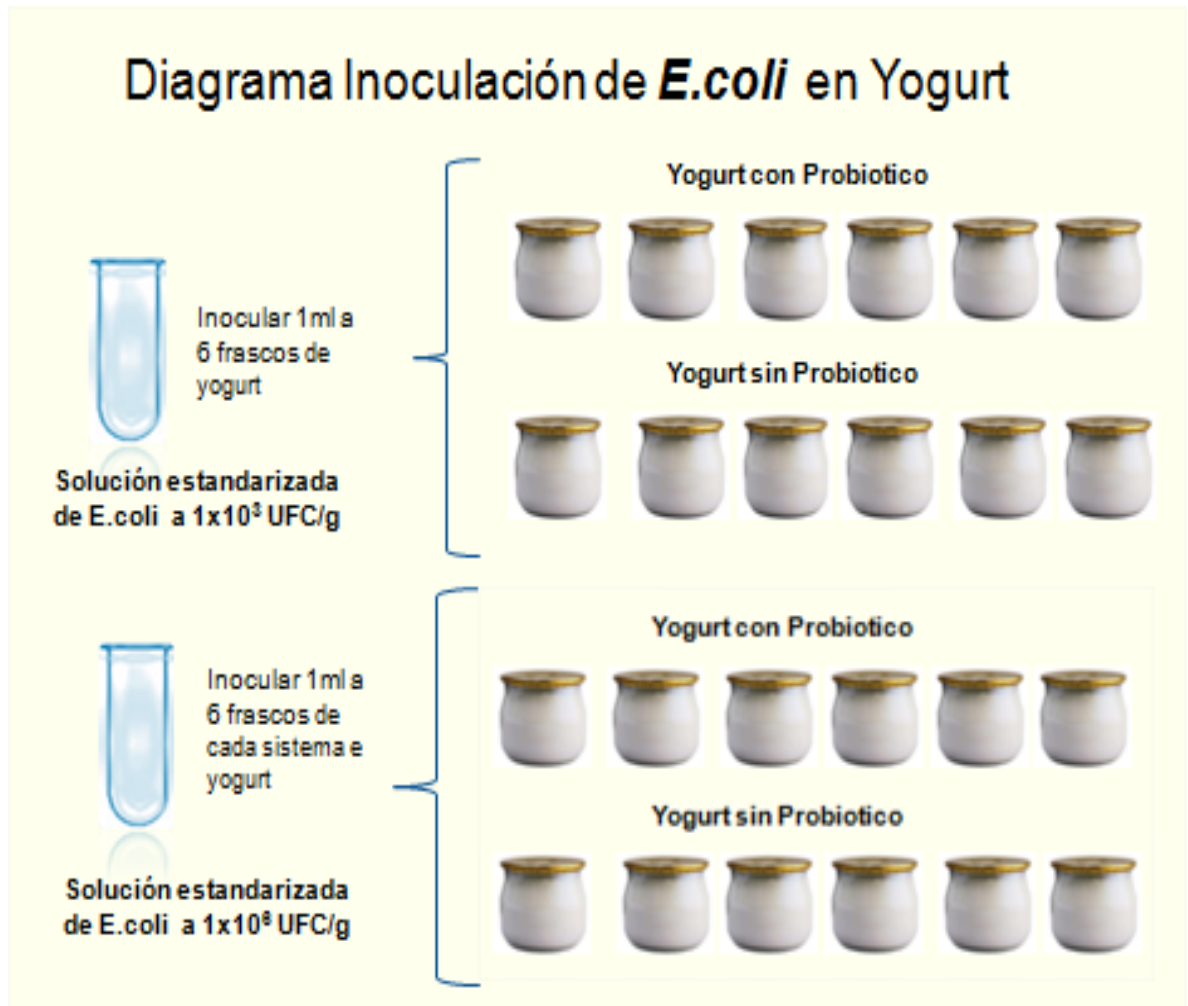
FIGURA N° 7 Diagrama aislamiento de *Salmonella enterica* ATCC 14028

Anexo 8



FIGURA N° 8 Diagrama aislamiento de *Vibrio cholerae*

Anexo 9



FIGURAN^o 9 Diagrama inoculación de *E. coli* en Yogurt

Anexo 10

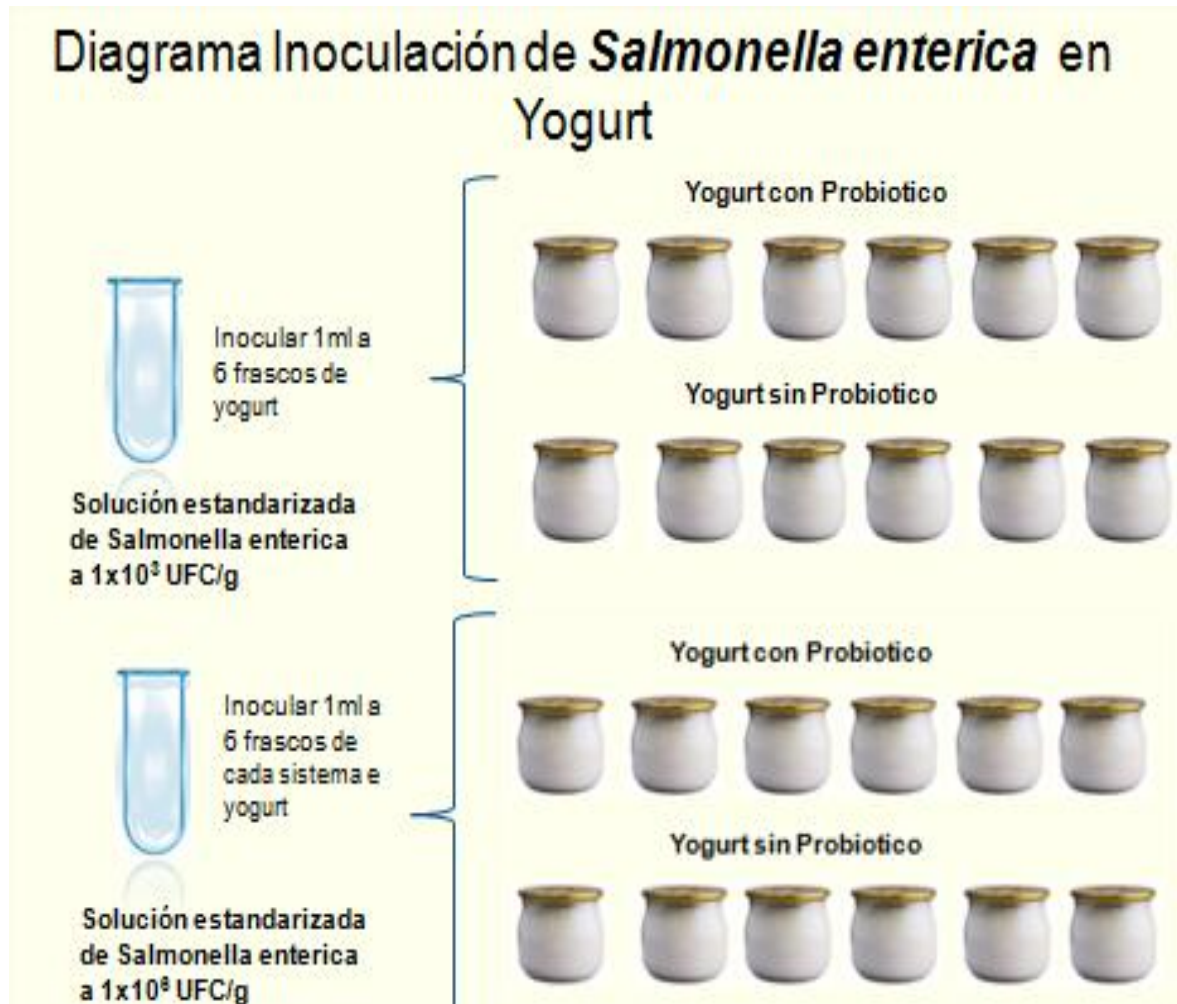


FIGURA N° 10 Diagrama inoculación de *Salmonella enterica* en Yogurt

Anexo 11

Diagrama Inoculación de *Vibrio cholerae* en Yogurt

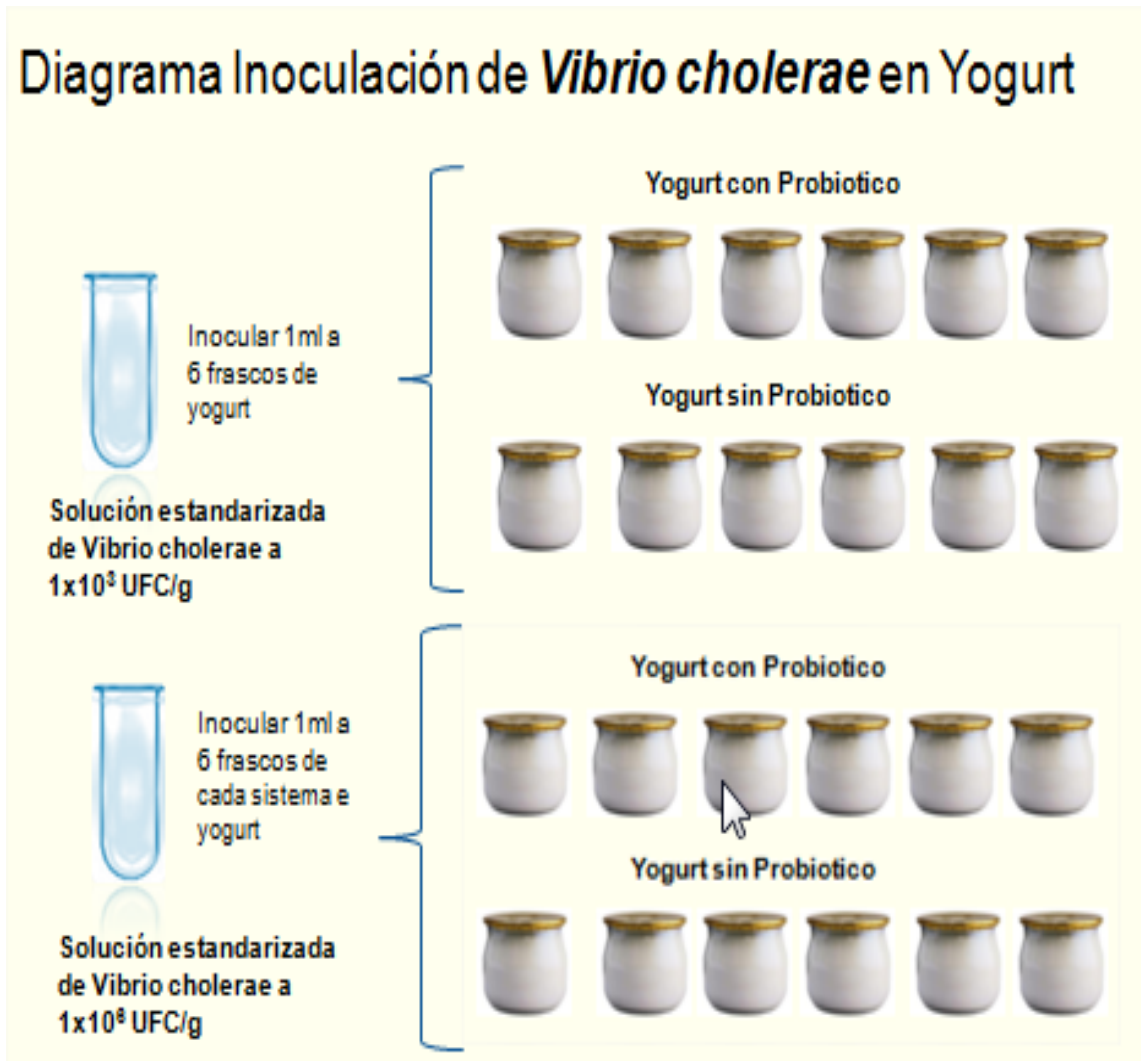


FIGURA N° 11 Diagrama inoculación de *Vibrio cholerae* en Yogurt

Anexo 12

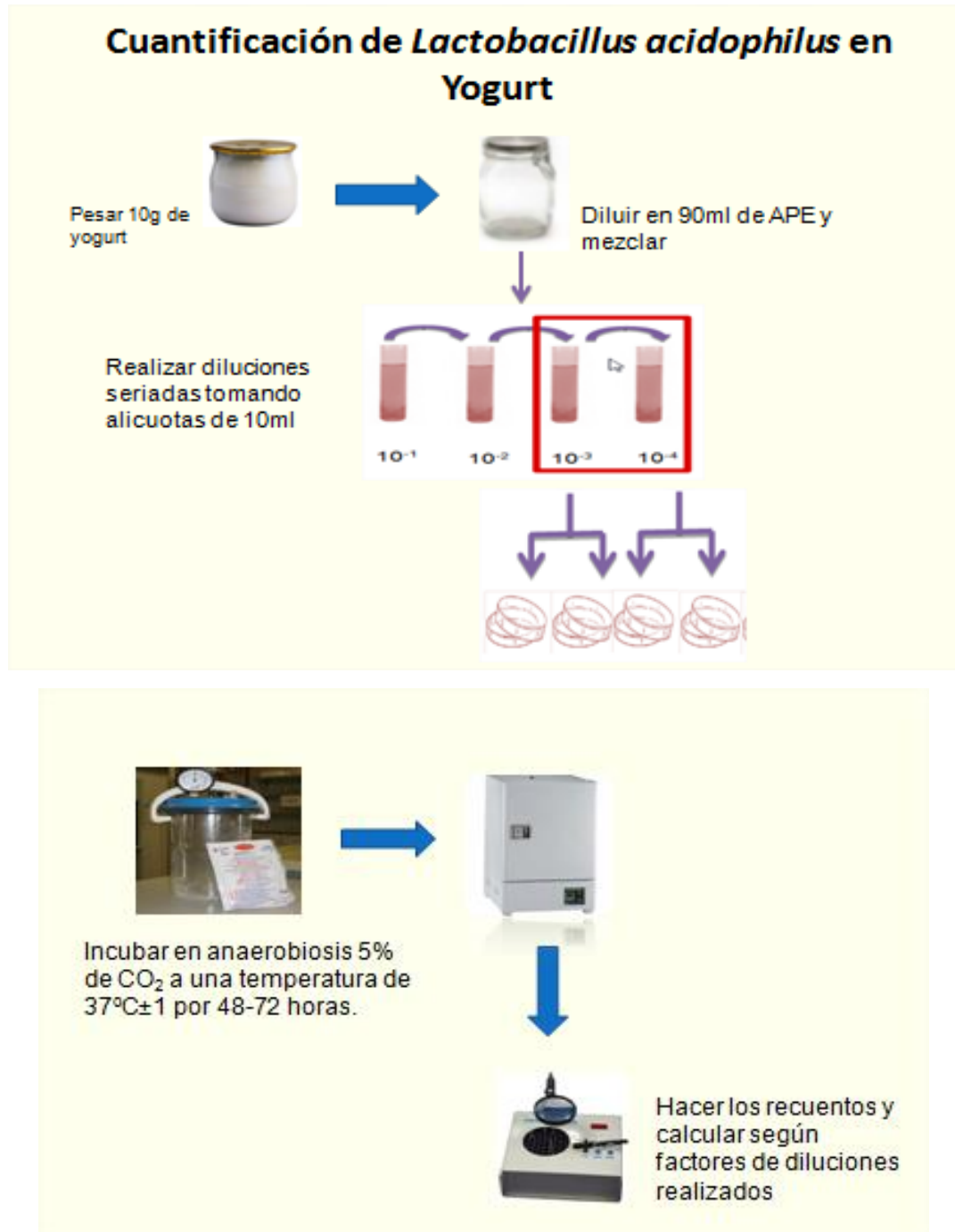


FIGURA N° 12 Diagrama cuantificación de *Lactobacillus acidophilus* en Yogurt

Anexo 13

Diagrama medición de *E.coli*



Realizar diluciones seriadas tomando alicuotas de 10ml y usando APE como diluyente

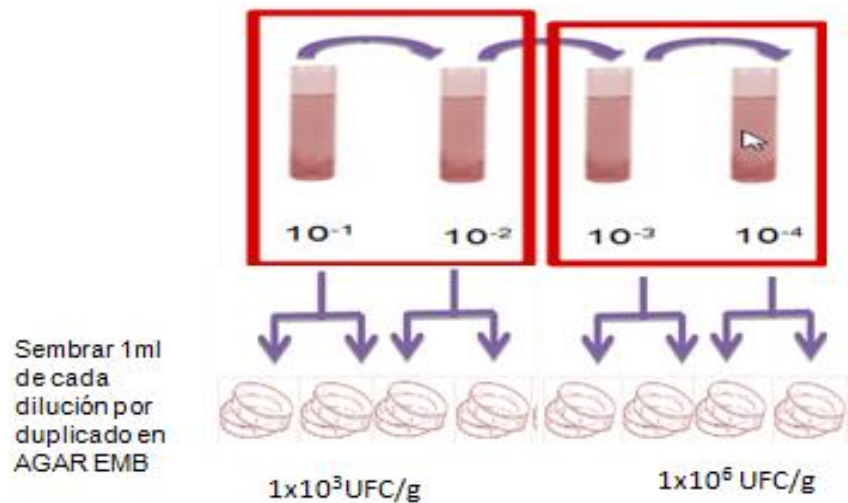




Figura N° 13 Diagrama medición de *E. coli* ATCC 25922

Anexo 14

Diagrama medición de *Salmonella enterica*



Realizar diluciones seriadas tomando alicuotas de 10ml y usando APE como diluyente

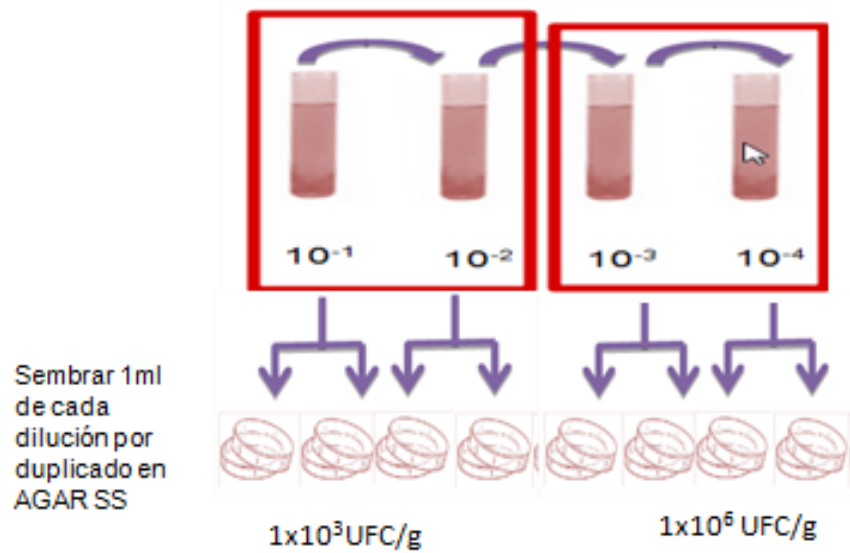
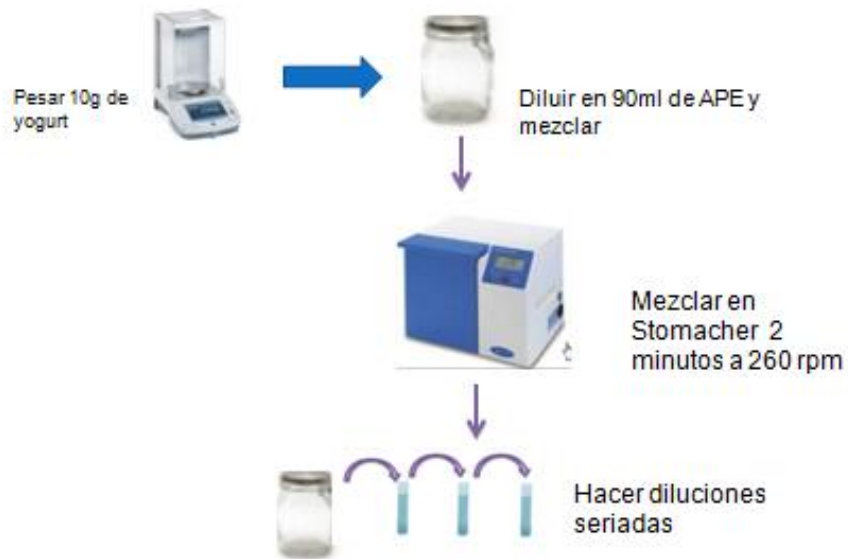




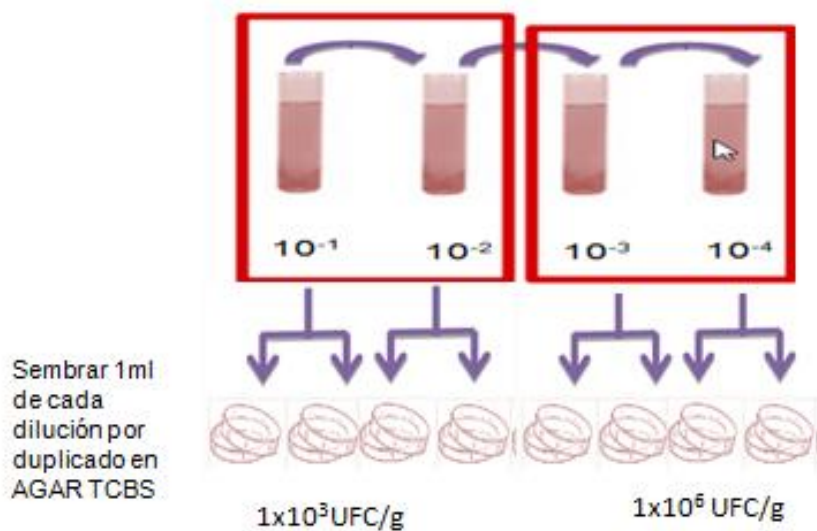
Figura N° 14 Diagrama medición de *Salmonella enterica* ATCC 14028

Anexo 15

Diagrama medición de *Vibrio cholerae*



Realizar diluciones seriadas tomando alícuotas de 10ml y usando APE como diluyente





Se incubo a 37C
durante 24 horas



Se realizaron los
recuentos bacterianos
de *Vibrio cholerae*

RECuentos DE *Vibrio cholerae*



Agar TCBS Colonias
largas color amarillo y
ligeramente planas
con centros opacos y
periferias translúcidas

Figura N° 15 Diagrama medición de *Vibrio cholerae*

Anexo 16

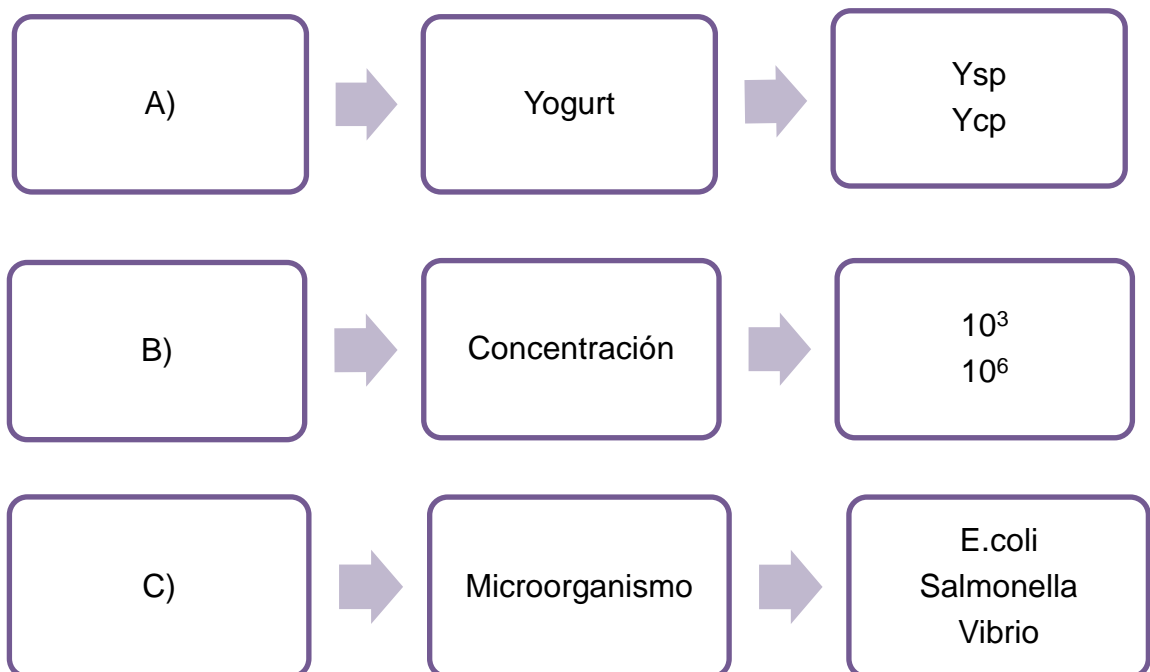
CALCULOS ANALISIS ESTADISTICO

<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
----------------	----------------------------	------------------------	----------------	----------------------------	------------------------

DISEÑO: PARCELAS SUBDIVIDIDAS



Factores:



Cálculos Generales

Repeticiones: 6

Total:(2) (2) (3) (6)=72

gL totales = 72-1 =71

$$FC = \frac{(11080.12)^2}{72} = 1,705,125.82$$

SC_{total}=8281310.38-FC

SC_{total}=6,576,184.56

$$SC_{rep} = \frac{(6201.72)^2 + \dots + (12)^2}{6} - FC$$

$$=8469299.17-1705125.82$$

$$=6764173.35$$

SCA	0	5	10	15	20	30	SUMA
Y _{sp}	3100.86	1768.91	1132.09	254.88	60.26	6	6323
Y _{cp}	3100.86	1495.52	142.6	6	6	6	4756.98
SUMA	6201.72	3264.43	1274.69	260.88	66.26	12	11079.98

$$SCA = \frac{62609.187}{36} - FC = 1739,144 - 1705125.82 = 34018.20$$

$$SC \text{ ERROR A} = \frac{(3100.86)^2 + \dots + (6)^2}{6} - FC - SC_{REP} - SCA$$

$$=17,463.670$$

SC[]	[103]	[106]	SUMA
Ysp	279.69	6043.36	6323.05
Ycp	184.68	4572.32	4757
Suma	464.37	10615.68	11080.05

$$SC[] = \frac{(464.37)^2 + (10615.68)^2}{36} - FC = 3136341.70 - 1705125.82$$

$$= 1431215.88$$

$$SCA * [] = \frac{(57540.642)}{18} - FC - SCA - SC[]$$

$$SCA*[] = 3196702.30 - 1705125.82 - 34018.20 - 1431215.88 = 26342.2$$

ScerrorB								
yogurt	[]	0	5	10	15	20	30	SUMA
ysp	[103]	97.86	88.8	61.36	25.64	3	3	279.66
ycp	[103]	97.86	62.17	15.64	3	3	3	184.67
ysp	[106]	3003	1680.11	1070.73	229.24	57.26	3	6043.34
ycp	[106]	3003	1433.35	126.96	3	3	3	4572.31
SUMA		6201.72	3264.43	1274.69	260.88	66.26	12	11079.98

$$SC_{\text{errorB}} = (97.86)^2 + \dots + (3)^2 - FC$$

$$\begin{aligned} SC_{\text{error B}} &= 22462212 - 17463670 - 1431215.28 - 34018.20 - 586946.34 \\ &\quad - 26342.20 \\ &= 2920019.20 \end{aligned}$$

SC _{mo}					
Yogurt	[]	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>V. cholerae</i>	SUMA
Ysp	[103]	125.05	79.73	74.91	279.69
Ysp	[106]	1799.01	2410.594	1833.76	6043.364
subtotal		1924.06	2490.324	1908.67	6323.05
Ycp	[103]	69.24	51.03	64.41	184.68
Ycp	[106]	1303.31	1572.51	1696.5	4572.32
subtotal		1372.55	1623.54	1760.91	4757
Total		3296.61	4113.86	3669.58	

$$\begin{aligned} SC_{m.o} &= \frac{(3296.61)^2 + (4113.86)^2 + (3669.58)^2}{18} - FC \\ &= 2292072.16 - 1705125.82 = 586946.34 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SC_{\text{yogurt} * m.o} &= \frac{(279.69)^2 + (184.68)^2}{18} + \frac{(6043.36)^2 + (4572.32)^2}{18} - FC - SC[] \\ &= 3196702.41 - 1705125.82 - 1431215.88 \\ &= 60360.71 \end{aligned}$$

$$SC_{\text{yogurt} * [] * m.o} = (125.05)^2 + \dots + (1696.50)^2 - FC = 14880486$$

$$\begin{aligned} SC_{\text{errorc}} &= 6576184.56 - 2920019.20 - 34018.20 - 1431215.88 - 586946.34 \\ &= 1603984.7 \end{aligned}$$

Anexo 17

20

DIARIO OFICIAL Tomo N° 384

**NORMA
SALVADOREÑA**



NSO 67.01.10:08

PRODUCTOS LÁCTEOS.

YOGURT. ESPECIFICACIONES. (Primera actualización)

CORRESPONDENCIA: Esta norma es una adaptación del capítulo correspondiente al YOGURT de la Norma del Codex para Leches Fermentadas, Codex Stan 243-2003

ICS 67.100

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Colonia Médica, Av. Dr. Emilio Álvarez, Pje. Dr. Guillermo Rodríguez Pacas, # 51, San Salvador. Teléfonos (503) 2226-2800, (503) 2225 6222; Fax (503) 2225 6255; e-mail: info@conacyt.gob.sv.

Derechos Reservados

Primera actualización

NORMA SALVADOREÑA

NSO 67.01.10:08

1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer las especificaciones y características que debe cumplir el yogurt.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Aplica al yogurt natural y aquel que se le han agregado aromatizantes, saborizantes, frutas naturales o procesadas y otros productos naturales, sean fabricados en el país o importados.

3. DEFINICIONES

3.1 Probióticos: son microorganismos que se adicionan a un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen efectos fisiológicos. Contribuyen al equilibrio de la flora intestinal del huésped.

3.2 Yogurt: es el producto lácteo obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Los microorganismos vivos presentes en el producto final deben ser de los tipos antes mencionados y su contenido abundante. Puede contener cultivos probióticos mantenidos en pleno vigor.

3.3 Yogurt natural: no lleva colorantes, aromatizantes ni edulcorantes.

3.4 Yogurt edulcorado: al que se ha agregado azúcar u otro edulcorante autorizado.

3.5 Yogurt saborizado y/o aromatizado: al que se ha agregado sustancias aromatizantes, saborizantes y colorantes naturales o artificiales autorizados.

3.6 Yogurt con fruta u otros productos naturales: al que se ha agregado alimentos aromatizantes u otros ingredientes tales como: frutas (frescas, en conserva, en polvo), puré de fruta, pulpa de fruta, jugo de fruta, cereales u otros productos naturales o artificiales autorizados.

3.7 Yogurt light, ligero o liviano: es el yogurt natural descremado, al que se le pueden agregar edulcorantes artificiales (sin calorías), fruta u otros productos naturales. El yogurt se denominará "yogurt light, ligero o liviano" siempre y cuando esté acompañado por la información de las características que hacen que sea "yogurt light, ligero o liviano".

4. ABREVIATURAS

NSO Norma Salvadoreña Obligatoria

NORMA SALVADOREÑA

NSO 67.01.10:08

mg/kg	miligramos por kilogramo
g	gramo
g/kg	gramos por kilogramo
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
min	mínimo
max	máximo
UFC	Unidades formadoras de Colonia
spp	especie
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
REG N°	Registro número
D G S	Dirección General de Salud
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en castellano)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (en castellano)

5. CLASIFICACIÓN Y DESIGNACIÓN

El yogurt se clasificará y designará en la forma indicada en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación y designación

Clasificación	Designación
Yogurt natural	Yogurt natural entero, semidescremado o descremado
Yogurt edulcorado	Yogurt edulcorado Yogurt edulcorado semidescremado Yogurt edulcorado descremado
Yogurt saborizado, aromatizado	Yogurt entero con sabor y aroma de... Yogurt semidescremado con sabor y aroma de... Yogurt descremado con sabor y aroma de...
Yogurt con fruta, cereales, u otros Productos naturales	Yogurt entero con... Yogurt semidescremado con... Yogurt descremado con...
Yogurt light, ligero o liviano	El yogurt se designará "yogurt light, ligero o liviano" siempre y cuando esté acompañado por una indicación de la(s) característica(s) que hace(n) que el yogurt sea "yogurt light, ligero o liviano"

Nota 1: Cuando el yogurt contenga productos naturales en la designación se debe especificar el tipo de producto natural, por ejemplo "Yogurt Entero con Sábila", "Yogurt con Fresas y Cereales"... etc.

Nota 2: Cuando la consistencia del yogurt sea líquido, el término "líquido" deberá figurar en la designación, por ejemplo: "Yogurt Líquido Semidescremado con Fresa".

6. ESPECIFICACIONES Y CARACTERÍSTICAS

6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

6.1.1 Características generales del producto

De acuerdo al tipo de yogurt, éste puede ser líquido, semilíquido o de consistencia cremosa y su fermentación es procedente de la acción bacteriana de fermentos lácticos, no por otro tipo de fermentación química y gaseosa; no debe tener desprendimiento visible de suero.

6.1.2 Características generales de los ingredientes y aditivos estabilizantes y colorantes alimentarios

- a) **Leche.** La leche con la cual se elabora el yogurt debe ser pasteurizada y cumplirá con las especificaciones indicadas en la Norma NSO 67.01.02:07 PRODUCTOS LACTEOS. LECHE PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA. ESPECIFICACIONES. Primera actualización, o en su última edición vigente;
- b) **Inóculo láctico.** Debe contener microorganismos seleccionados de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* mantenidos en pleno vigor y puede contener cultivos probióticos;
- c) **Fruta fresca.** Los trozos de fruta fresca que se incorporan al yogurt deben provenir de fruta madura, sana, convenientemente lavada. Los trozos estarán libres de fragmentos de cáscara, semillas u otras partículas gruesas y duras y deberán ser higiénicamente manipuladas inmediatamente antes de incorporarlos al yogurt;
- d) **Ingredientes de fruta.** Los jugos, néctares, pulpas, jaleas, mermeladas o frutas elaboradas en otras formas que se incorporen al yogurt, deberán ser pasteurizados antes de incorporarlos, esto aplica cuando los jugos o las frutas sean preparadas directamente por el fabricante. Para casos cuando la fruta es preparada por otro proveedor, el fabricante debe exigir que su fabricación sea bajo un sistema adecuado que garantice la inocuidad;
- e) **Sustancias edulcorantes.** Se permitirá el agregado de edulcorantes naturales y artificiales permitidos, las que estarán perfectamente limpias y cumplirán con las especificaciones indicadas en las normas salvadoreñas correspondientes;
- f) Los aditivos alimentarios que se pueden usar en el yogurt serán los especificados en la Norma general del Codex para los Aditivos, Codex Stan 192-1995, Rev. 9-2008 o en su última edición vigente;

NORMA SALVADOREÑA

NSQ 67.01.10:08

6.2 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES

6.2.1 Sabor. El yogurt tendrá el sabor característico para cada forma de presentación y estará libre de sabor excesivamente ácido por sobre maduración, sabor amargo o cualquier sabor extraño.

6.2.2 Olor. El producto debe tener el olor característico para cada forma de presentación y estar libre de cualquier olor extraño.

6.2.3 Color. El yogurt natural debe tener color blanco o ligeramente amarillento; los otros productos deben tener el color característico de acuerdo a su especificación.

6.2.4 Aspecto. El yogurt en cualquiera de sus formas de presentación, debe tener aspecto de coágulo uniforme, libre de grumos y/o burbujas y estar libre de suero separado. El producto con fruta debe tener aspecto característico con la fruta.

6.3 REQUISITOS QUÍMICOS

El yogurt debe cumplir con los requisitos especificados en la Tabla 2:

Tabla 2. Requisitos

Producto	Materia grasa, gramos por 100 g		Acidez como ácido láctico, gramos por 100 g		Sólidos totales, gramos por 100 g	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.
Yogurt entero, natural, edulcorado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semilla	3,0	4,0	0,6	1,2	11,7	-
Yogurt semidescremado, natural, edulcorado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semilla	0,15	< 3,0	0,6	1,2	8,85	-
Yogurt descremado, natural o simple, azucarado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semilla	0,05	< 0,15	0,6	1,2	8,7	-

6.4 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

El yogurt debe cumplir con los requisitos microbiológicos especificados en la Tabla 3 siguiente:

Tabla 3. Requisitos microbiológicos

Características	Valores (UFC)
Coliformes por gramo	10 máximo
<i>Escherichia coli</i> por gramo	Ausencia
<i>Salmonella</i> spp. En 25 gramos	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia
Levaduras y mohos por gramo	100 máximo

7. CONDICIONES SANITARIAS

7.1 El producto terminado debe ser manipulado y distribuido bajo estrictas condiciones sanitarias y lineamientos de Buenas Prácticas de Fabricación.

7.2 El producto debe envasarse en recipientes sin defectos, rigurosamente limpios, higienizados e inmediatamente sellados herméticamente con el objeto de evitar cualquier contaminación posterior.

- 1 -

8. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras para el yogurt en sus diferentes presentaciones se hará siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 33 de los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC, Sub Capítulo 968.12 Vol. 2 1990.

9. MÉTODOS DE ENSAYO Y ANÁLISIS

La determinación de las características especificadas en la presente norma se llevará a cabo de acuerdo a las normas salvadoreñas correspondientes.

Recuento de Bacterias y Coliformes en Productos Lácteos. Capítulo 17, Subcapítulo 3; Método Oficial 989-10. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

Recuento de Coliformes y *Escherichia coli* en Alimentos. Capítulo 17, Subcapítulo 3; Método Oficial 991-14. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

NORMA SALVADOREÑA

NSO 67.01.10:08

Detección de *Salmonella* en alimentos Procesados. Capítulo 17, Subcapítulo 9; Método Oficial 967.26. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

Identificación de *Salmonella* en Alimentos. Capítulo 17, Subcapítulo 9; Método Oficial 967.27. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

Salmonella en Alimentos. Pruebas Serológicas. Capítulo 17, Subcapítulo 9; Método Oficial 967.28. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

Listeria monocytogenes en Leche y Productos Lácteos. Capítulo 17, Subcapítulo 10; Método Oficial 993-12. Métodos Oficiales de Análisis de AOAC International, 16th Edición, Volumen I.

10. ENVASE Y ETIQUETADO

10.1 Envase. El material del envase no deberá alterar las características del producto, pudiendo ser de cartón laminado, polietileno de alta densidad o de cualquier otro material que sea inocuo aprobado por la autoridad competente.

10.2 ETIQUETADO

El yogurt para venta al consumidor final debe cumplir con lo especificado en la NSO 67.10.01:03 NORMA GENERAL PARA EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS PREENVASADOS y NSO 67.10.02:99 DIRECTRICES DEL CODEX ALIMENTARIUS SOBRE ETIQUETADO NUTRICIONAL. (o en su última edición vigente).

10.2.1 Las etiquetas podrán ser de papel o de cualquier otro material que pueda ser adherido a los envases o bien de impresión permanente sobre los mismos. Las inscripciones deberán ser fácilmente legibles a simple vista, redactadas en español y adicionalmente en otro idioma si las necesidades de algún país así lo dispusieran y hechas en forma tal que no desaparezcan bajo condiciones de uso normal.

10.2.2 Las etiquetas no podrán tener ninguna leyenda de significado ambiguo, ilustraciones o adornos que induzcan al engaño, ni descripción de características del producto que no se puedan comprobar.

10.2.3 Las etiquetas deberán cumplir con lo especificado en la norma salvadoreña y llevar como mínimo lo siguiente:

a) La designación y clasificación del producto de acuerdo a esta norma; podrá usarse por separado en la etiqueta la designación de descremado, semidescremado, o entero según sea el

NORMA SALVADOREÑA

NSO 67.01.10:08

caso en el etiquetado. Ejemplo: "Yogurt natural" designado en la misma etiqueta la palabra "semá descremado" por separado;

- b) La marca comercial;
- c) El contenido neto, expresado en unidades del Sistema Internacional;
- d) La identificación del lote y la fecha de elaboración, las cuales podrán ponerse en clave en cualquier lugar apropiado del envase;
- e) Manifestar su caducidad o fecha de vencimiento en forma clara;
- f) La expresión "consérvese refrigerado" o manténgase refrigerado";
- g) El país de origen;
- h) El nombre o razón social del productor o de la entidad comercial, bajo cuya marca se expende el producto, así como la dirección o el apartado postal;
- i) La leyenda que indique el registro sanitario: REG. No _____ D.G.S. El Salvador;
- j) Para el caso de los vocablos "light, ligero o liviano" se deberá expresar en el etiquetado la indicación de las características que hacen que el producto sea "light, ligero o liviano".

11. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

11.1 El producto deberá mantener su cadena de frío hasta el momento de su comercialización.

12. APÉNDICE NORMATIVO**12.1 CORRESPONDENCIA CON OTRAS NORMAS**

Esta norma tiene correspondencia parcial con la Norma del Codex para Leches Fermentadas, Codex Stan 243-2003

12.2 NORMAS QUE DEBEN CONSULTARSE

NORMA GENERAL DEL CODEX PARA EL USO DE TERMINOS LECHEROS CODEX STAN 206-1999.

NORMA SALVADOREÑA

NSO 67.01.10:08

NSR CODEX CAC/RCP 1:1997 CÓDIGO INTERNACIONAL RECOMENDADO PARA PRÁCTICAS DE HIGIENE EN ALIMENTOS, o en su última edición vigente del Codex.

NSO 67.10.01:03 NORMA GENERAL PARA EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS PREENVASADOS. (Primera actualización).

NSO 67.10.02:99 DIRECTRICES DEL CODEX ALIMENTARIUS SOBRE ETIQUETADO NUTRICIONAL

13. REFERENCIAS TÉCNICAS

Literatura técnica del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), y de la Agencia de Administración de Drogas y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

14. VIGILANCIA Y VERIFICACION

La vigilancia y verificación corresponde al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Ministerio de Agricultura y Ganadería en sus respectivas dependencias y la Defensoría del Consumidor.

-FIN DE LA NORMA-

2º) El presente Acuerdo entrará en vigencia seis meses después de su publicación en el Diario Oficial, de acuerdo a la Conferencia Ministerial de la OMC, Cuarto Periodo, DOHA, 9-14 de Noviembre de 2001. COMUNIQUESE. DIOS UNION LIBERTAD, HÉCTOR MIGUEL ANTONIO DADA HIREZI, MINISTRO*****

Figura N° 15 Norma Salvadoreña Oficial NSO 67.01.10:08 Productos Lácteos. Yogurt, especificaciones (primera actualización)