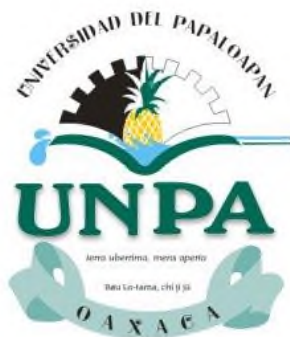


UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec



Caracterización parcial de la actividad
probiótica de diferentes bacterias ácido
lácticas

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

Presenta
Liria Pozos Pineda

Directora de tesis
Dra. María de Jesús García Gómez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México
2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/113
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 25 de octubre de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Biotecnología de **C. Liria Pozos Pineda**, matrícula **16140011**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Caracterización parcial de la actividad probiótica de diferentes bacterias ácido lácticas**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

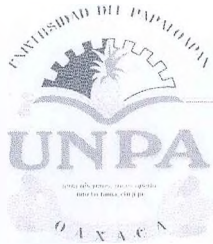
Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Liria Pozos Pineda
C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/0137
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 25 de octubre de 2018

C. LIRIA POZOS PINEDA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Presidente
Dra. Cynthia M. Antonio Cisneros	UNPA	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACyT-UNPA	Secretario
M en C. Ernestina Paz Gamboa	ITTux	1er Suplente
Dr. Oscar Núñez Gaona	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Sandra T. del Moral Ventura
Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefa de la División de Estudios
de Posgrado

Héctor López Arjona
M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dra. María de Jesús García Gómez – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioprocesos y Químico Biológico de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús García Gómez y con asistencia del Cuerpo Académico de la presente institución.

La investigación contó con el apoyo de la beca CONACyT con número de registro 458259 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

AGRADECIMIENTOS

Intenté hacer algo lindo e inspirador para esta sección sin embargo como no pude, solo me queda más que agradecer a mis padres por apoyarme en todos los aspectos de mi vida, puede que no sea la mejor hija, pero sin duda ustedes son los mejores padres que pude haber deseado en este mundo.

A mis hermanos que, aunque saquen lo peor de mí, también sacan lo mejor de mí y fuera de todo, sería tonto no amar a este par de tontos.

A la doctora María de Jesús García Gómez por la paciencia y apoyo durante estos dos años y término de este proceso.

Al Cuerpo Académico Biotecnología sustentable (UNPA-CA-15) de la Universidad del Papaloapan. Proyecto "Determinación de la actividad antibacteriana de extractos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de suero de queso elaborado en la región de la cuenca del papaloapan". PROMEP Fortalecimiento de los cuerpos académicos convocatoria 2011

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que estuvieron conmigo todo este tiempo, accediendo a mis dudas, ayudándome, acampando días y semanas en la universidad, sin dormir y comer bien (jajajajaja) sólo para hacerme compañía, ¡realmente fue divertido!

“Kono sekai wa zankoku totemo utsukushi”- Shingeki no kyojin-
この世界は残酷でとても美しい



DEDICATORIA

A mis padres:
Liria Pineda Sánchez y Rafael Pozos Vázquez

A mis hermanos:
Rafael y Alberto Pozos Pineda



Lista de términos

BAL: Bacterias ácido lácticas

CO₂: Dióxido de carbono

UFC: Unidades formadoras de colonias

MRS: Medio de cultivo selectivo para lactobacilos Man, Rogosa y Sharpe

TGI: Tracto gastrointestinal

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

CIM: Concentración inhibitoria mínima

G+C: Guanina + Citocina

CTE: Cadena de transporte de electrones

EPS: Exopolisacáridos

IL: Interleucina

TNF: Factor de necrosis tumoral

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

NK: Cell Natural Killer, Células Naturalmente Asesinas-Linfocitos

CD: Linfocitos T con cluster de diferenciación 4

Ig: Inmunoglobulina

Th: Linfocitos T helper (auxiliares)

°C: Grado Celsius

S/R: Sensibilidad/Resistencia

%A: Porcentaje de acidificación

rpm: Revoluciones por minuto

g: Gramo

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mm: Milímetro

nm: Nanómetro

μL: Microlitro

cP: Centipoise

h: Hora

p/v: Peso/ volumen

g/v: Gramo/volumen

sp: Especie

Índice

I. Resumen	xi
II. Abstract	xii
III. Introducción	1
IV. Antecedentes	3
V. Marco teórico	11
5.1 Microbiota.....	11
5.2 Bacterias ácido lácticas	13
5.3 Hábitats de las bacterias ácido lácticas	14
5.4 Metabolismo	15
5.5 El género <i>Lactobacillus</i>	17
5.6 Descripción de las especies dentro del género.....	18
5.6.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
5.6.2 <i>Lactobacillus casei</i>	18
5.6.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	19
5.7 El género <i>Enterococcus</i>	19
5.8 El género <i>Streptococcus</i>	20
5.9 Alimentación.....	20
5.10 Producción de Exopolisacáridos (EPS)	21
5.11 Bacterias ácido lácticas	22
5.11.1 Cultivos iniciadores	22
5.11.2 Probióticos.....	23
5.11 Identificación de las cepas probióticas	26
VI. Justificación	27
VII. Hipótesis	28
VIII. Objetivo general	28
IX. Objetivos particulares	28
X. Estrategia experimental	29
XI. Materiales y métodos	30
11.1 Microorganismos	30
11.2 Acondicionamiento de las cepas	30
11.3 Cinética de crecimiento y obtención de biomasa	31
11.4 Tolerancia a la acidez.....	31
11.5 Tolerancia a sales biliares	32

11.6 Prueba de inhibición a patógenos.....	32
11.7 Prueba de resistencia a los antibióticos.....	32
11.8 Prueba de acidificación y viscosidad	33
XII. Resultados y discusión.....	35
12.1 Cinética de crecimiento de las cepas de interés	35
12.3 Tolerancia a la acidez con diferentes pH.....	36
12.4 Tolerancia a las sales biliares.....	38
12.5 Inhibición de patógenos intestinales	41
12.6 Resistencia a antibióticos	43
12.7 Prueba de acidificación en leche	45
12.8 Viscosidad.....	48
XIV. Conclusiones	51
XIV. Perspectivas.....	52
XVI. Bibliografía	53

Índice de Tablas

Núm. de tabla	Título	Pág.
1	Nomenclatura para cada una de las cepas de estudio.	30
2	Concentraciones de los antibióticos de uso común utilizados en la caracterización de las cepas de estudio.	33
3	Viabilidad de las BAL de estudio a diferentes valores de pH.	37
4	Viabilidad de las BAL de estudio a distintas concentraciones de sales biliares.	39
5	Actividad antagonista de las cepas de estudio frente a microorganismos patógenos.	41
6	Prueba de sensibilidad y resistencia de BAL frente antibióticos de uso común: A (ampiciliana), C (ciprofloxacino), D (dicloxacilina) y T (trimetroprima).	44
7	Disminución de pH y porcentaje de acidificación de las BAL analizadas.	46
8	Viscosidad de leche fermentada con las BAL de estudiadas	49

Índice de Figuras

Núm. de tabla	Título	Pág.
1	Esquema para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente probióticas.	6
2	Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género <i>Lactobacillus</i> aisladas de lactosuero fermentado.	8
3	Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género <i>Enterococcus</i> aisladas de lactosuero fermentado.	9
4	Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género <i>Streptococcus</i> .	10
5	Vías metabólicas en la fermentación de las cepas de estudio.	16
6	Acondicionamiento de las BAL probadas.	31
7	Cinética de crecimiento de las BAL en medio MRS, 37°C y 15% de CO ₂ .	35
8	Sobrevivencia de <i>Lactobacillus</i> a diferentes valores de pH.	37
9	Sobrevivencia de <i>Enterococcus</i> a diferentes concentraciones de sales biliares.	39
10	Prueba de inhibición de patógenos por cepas de <i>Streptococcus</i> .	42
11	Sensibilidad de las BAL frente a antibióticos de uso común con respecto al tiempo cuando se utiliza como cultivo iniciador como <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Streptococcus</i> .	45
12	A) Disminución de pH y B) Porcentaje de acidez con respecto al tiempo cuando se utiliza como cultivo iniciador: <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. italicus</i> , <i>Streptococcus</i> S1 y <i>Streptococcus</i> S2.	47

I. Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un grupo de microorganismos de gran interés biotecnológico, debido a su capacidad metabólica para fermentar carbohidratos, producir ácido láctico, además de otros compuestos como ácido acético, CO₂ y etanol. La mayoría de éstas pueden ser utilizadas como probióticas en humanos y animales. Sin embargo, no todas las BAL cumplen con los criterios de selección como la fuente de aislamiento y su viabilidad posterior a la digestión gastrointestinal del huésped (10⁶ UFC/mL). En este trabajo se evaluó la capacidad probiótica de cepas de BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* aisladas de suero fermentado de queso regional. La simulación gastrointestinal se realizó *in vitro* evaluando la tolerancia de las cepas a diferentes valores de pH (2-7) y sales biliares (sal de bilis de buey 0.5-3% p/v) en caldo MRS a 37°C y 15% de CO₂, la viabilidad se expresó en UFC/mL. Además, se analizó la resistencia de las cepas frente a cuatro antibióticos de uso común (ampicilina, trimetoprima, dicloxacilina y ciprofloxacina); su efecto antagónico frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aerus* y *Helicobacter pylori*) y la capacidad de acidificación en leche. Las cepas de *Enterococcus durans*, *Streptococcus* S1 y *Streptococcus* S2 cumplieron con los criterios de selección para su uso como potenciales probióticos alcanzando concentraciones mayores de 10⁶ UFC/mL, mostrando sensibilidad a los antibióticos de uso común y la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de inhibir por lo menos un microorganismo patógeno. Por otro lado, *Enterococcus durans* mostró un mayor porcentaje de acidificación durante la fermentación en leche.

II. Abstract

The lactic acid bacteria (BAL) represent a group of microorganisms of great biotechnological interest, due to their metabolic capacity to ferment carbohydrates, produce lactic acid, as well as other compounds such as acetic acid, CO₂ and ethanol. Most of these can be used as probiotics in humans and animals. However, not all BALs meet the selection criteria as the source of isolation and its viability subsequent to the gastrointestinal digestion of the host (10⁶ CFU / mL). In this work, the capacity as probiotic potentials of BAL strains of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Streptococcus* genera isolated from fermented regional cheese whey was evaluated. The gastrointestinal simulation was performed *in vitro*, evaluating the tolerance of the strains at different pH values (2-7) and bile salts (salt of ox bile 0.5-3%) in MRS broth at 37 ° C and 15% CO₂, the viability was expressed in CFU / mL. In addition, the resistance of the strains was analyzed against four commonly used antibiotics (ampicillin, trimethoprim, dicloxacillin and ciprofloxacin); its antagonistic effect against pathogenic microorganisms (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aerus* and *Helicobacter pylori*) and the capacity of acidification in milk. The strains *Enterococcus durans*, *Streptococcus* S1 and *Streptococcus* S2 fulfilled the selection criteria for their use as potential probiotics reaching counts of more than 10⁶ CFU / mL, showing sensitivity to commonly used antibiotics and the ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms. On the other hand, *Enterococcus durans* showed a higher percentage of acidification during fermentation in milk. All strains evaluated were able to inhibit at least one pathogenic microorganism.

III. Introducción

La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos que habitan en el intestino grueso de los seres humanos, los cuales son indispensables para el buen funcionamiento del organismo, desarrollo del sistema inmunitario y la nutrición (Vizoso-Pinto *et al.*, 2006). Existen más de 1000 especies bacterianas en el tracto digestivo del ser humano, principalmente especies pertenecientes a las familias de Firmicutes y Bacteroidetes, seguidos de Actinomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia y Archaeobacteria (Icaza-Chávez, 2013).

Junto con el rápido crecimiento de la población, los estilos de vida y la dieta han ido cambiando continuamente. Las dietas altas en grasas, azúcares y proteínas son cada vez más frecuentes y van en aumento. Diversos estudios han demostrado que la alimentación tiene un impacto en la microbiota intestinal relacionado con diversas enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico, diabetes y problemas gastrointestinales esto tal vez asociado a microorganismos patógenos transitorios que llegan a colonizar el tracto digestivo causando alteraciones en el mismo (Guarner, 2007). La mayoría de los microorganismos que conforman la flora intestinal se encuentra en una asociación benéfica con su hospedero, pero también existen otros microorganismos que causan alteraciones graves al organismo. Se ha encontrado que las características de la dieta, junto con los factores genéticos, influyen en el predominio de unos microorganismos sobre otros (Zhang *et al.*, 2016).

Además, el uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de algunas infecciones del tracto digestivo también resulta un gran problema ya que estos medicamentos disminuyen la resistencia a las enfermedades generando microorganismos resistentes (Jurado *et al.*, 2009).

Entre los promotores de salud sugeridos se encuentran los probióticos; los cuales son coadyuvantes dietéticos de origen microbiano que benefician al hospedante

modulando la inmunidad de la mucosa y sistémica, así como mejorando el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (TGI) (Olagnero *et al.*, 2007).

Dentro de las especies probióticas de mayor interés, ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, se encuentran géneros como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los cuales forman parte de un grupo conocido como bacterias ácido-lácticas (BAL) (Prasad *et al.*, 1998).

Las BAL han sido ampliamente utilizadas, ya que varias de sus propiedades metabólicas, contribuyen al desarrollo de características organolépticas en productos lácteos, generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos y poseen una marcada capacidad antagonista sobre otras bacterias patógenas (Hinestroza y López, 2008).

Por lo tanto, para poder determinar la eficiencia de las BAL como probióticos es necesario realizar una adecuada evaluación de cada cepa de acuerdo con diferentes criterios de selección: es que los microorganismos lleguen en estado viable y en cantidades suficientes al intestino grueso una vez que han superado las barreras ácida y biliar durante la digestión (Noriega *et al.*, 2004); demostrar el efecto benéfico en la salud del hospedero, mejorar la digestión en personas intolerantes a la lactosa, inhibición de patógenos en el intestino, disminución de problemas de estreñimiento, prevención de la diarrea, reducción de los niveles de colesterol en la sangre, acción anticancerígena y disminución de infecciones por rotavirus en lactantes estimulando la actividad fagocítica de los granulocitos (producción de citoquinas) fortaleciendo al sistema inmune (Prieto, 2017).

IV. Antecedentes

El interés científico por las bacterias como agentes protectores surgió a partir del aislamiento de un microorganismo contenido en un producto como el yogurt que suponía mejoraba la salud incrementando la expectativa de vida. Desde entonces diversos autores han tratado de conocer las distintas funciones de estos microorganismos benéficos encontrados en la flora intestinal pertenecientes al grupo de las BAL, donde la mayoría son utilizados como probióticos (Amores *et al.*, 2004).

Entre las propiedades más importantes de los microorganismos probióticos está la capacidad de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, soportando los efectos de las diferentes condiciones encontradas en cada sector como cambios en el pH y la presencia de sales biliares, los cuales generan ambientes hostiles para cualquier microorganismo. De acuerdo con Tuomola *et al.* (2001) los resultados de estas pruebas pueden predecir la capacidad de las cepas para sobrevivir en condiciones drásticas de acidez y alcalinidad. En este sentido, se han realizado diversos estudios en los que se trata de probar la tolerancia que tienen las BAL, especialmente el género *Lactobacillus* en medios gastrointestinales, como el estudio realizado por Ahrné *et al.* (2005) quienes demostraron la tolerancia a diferentes valores de pH y porcentajes de sales biliares de especies aisladas de heces fecales de infantes, las cepas fueron resistentes en medios con valores de pH de 3 y 7; a la presencia de sales biliares al 1% p/v con conteos viables de 10^6 UFC/mL. Otros estudios de evaluación gastrointestinal simulada como el de Frizzo *et al.* (2006) encontraron que cepas de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* aisladas de diferentes partes del intestino de terneros fueron capaces de resistir pH de 3 y concentraciones de 0.3, 0.5 y 1% p/v de sales biliares, sin embargo, la viabilidad después de las pruebas en comparación con otros trabajos, describen valores por debajo de 10^6 UFC/mL. Sánchez *et al.* (2014) evaluó la capacidad probiótica de un número variable de BAL como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leunostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* aisladas de leche de vaca criolla, las

cepas fueron expuestas a valores de pH entre 3 y 6 con 6.5% p/v de NaCl, observando crecimiento de la mayoría de las BAL en concentraciones ideales (10^6 UFC/mL), a excepción del género *Lactobacillus*, el cual no pudo crecer en la mayoría de las condiciones probadas, ocasionado posiblemente por la temperatura de incubación de 45°C.

Otra característica relevante de los microorganismos probióticos, es la capacidad de producir compuestos que puedan reducir o disminuir de forma significativa la colonización de bacterias oportunistas o patógenas que puedan llegar con la alimentación, causando cuadros graves de infecciones gastrointestinales como *E. coli* y *Helicobacter pylori*. Estudios como el de Pieniz *et al.* (2014) comprueban la inhibición de una gama de patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. thyphimurium*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* y *C. fimi* durante su exposición frente a *E. durans* en un periodo de 24 horas a 37°C de incubación, debido posiblemente a la producción de diversos ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas por parte de esta cepa. Diversos estudios han determinado la capacidad antagonista de *E. durans* frente a microorganismos como *Shigella* y *H. pylori* generando halos de inhibición debido a la secreción de ácido láctico después de 48 horas de incubación (Affhan *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016). Se ha comprobado que la producción de peróxido de hidrógeno por algunos aislados de *Lactobacillus* pueden exhibir propiedades antimicrobianas debido a la presencia de haluros y peroxidasa, implicados en la toxicidad hacia las bacterias patógenas, esta información puede corroborarse con estudios como el de Yadav *et al.* (2016) donde se observa la inhibición de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. alboni* por parte de la cepa *L. plantarum* (aislada de una bebida láctea fermentada) la cual mostró produjo H_2O_2 .

Los antibióticos son ampliamente utilizados para el tratamiento contra infecciones bacterianas, sin embargo, muchas bacterias son capaces de adaptarse desarrollando mecanismos de resistencia. Esta resistencia puede presentarse tanto en bacterias de la microbiota autóctona del ser humano como en bacterias

oportunistas que llegan con la alimentación, dificultando en caso de una infección grave, su erradicación. Por lo que, la presencia o ausencia de resistencia a los antibióticos se suma a los criterios de selección de microorganismos con potencial probiótico, evitando el desarrollo de cuadros de infección graves (Cueto-Vigil, *et al.*, 2010). Vanegas *et al.* (2010) mostraron que algunas especies de *Lactobacillus* (aislados de leche materna) pueden presentar resistencia hacia distintos tipos de fármacos como Cloranfenicol, Tetraciclina, Gentamicina, Penicilina, Cefepine e Imipenem, la cual puede estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, los plásmidos o transposones. Laurencio-Silva *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares de cepas resistentes de *Lactobacillus* (aisladas de vagina de vaca lechera) para fármacos como Amikacina, Acitromicina, Vancomicina y Neomicina, la cual podría estar condicionada genéticamente para el género *Lactobacillus*. Por tal motivo, existe una creciente preocupación por la utilización de bacterias probióticas (especialmente en cepas aisladas del intestino) que contengan la condición de resistencia, ya que, en la actualidad, no se disponen de métodos fenotípicos normalizados que estén reconocidos internacionalmente para la evaluación de BAL no patógenas. Hasta la fecha, no se ha encontrado un gen relacionado con patogenicidad en los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sin embargo, los procedimientos más aceptados en cuanto a la evaluación de resistencia a los antibióticos en bacterias potencialmente probióticas son los propuestos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Figura 1).

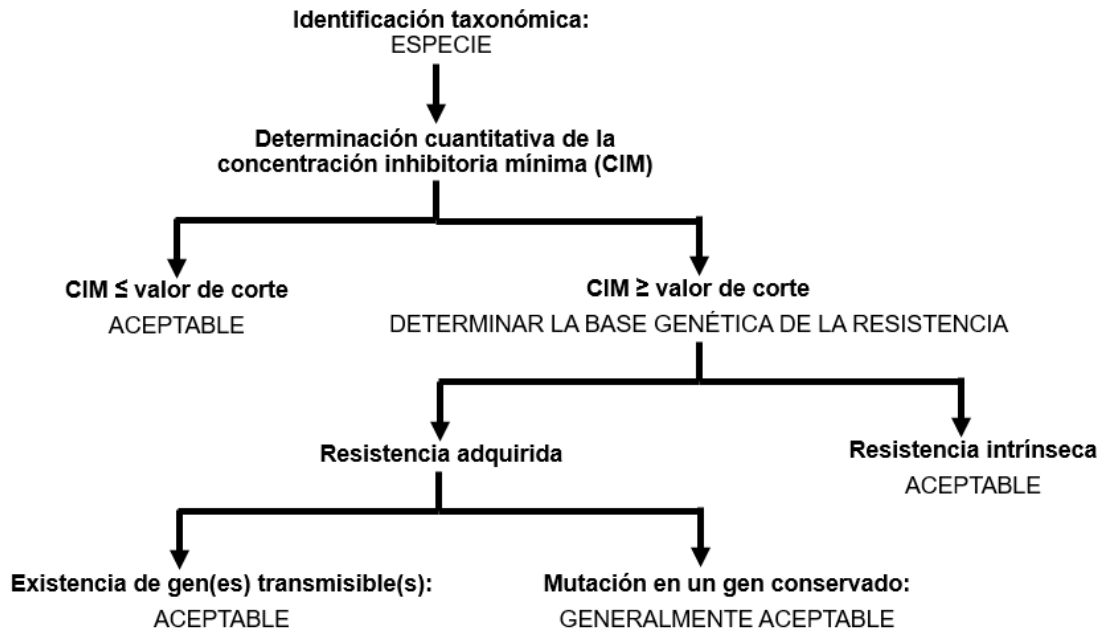


Figura 1. Esquema para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente probióticas (Tomado de Rodríguez, 2015).

Por otro lado, la forma más conocida de conservación de los alimentos es la fermentación, unos de los microorganismos que se han utilizados son las bacterias ácido lácticas. Las preparaciones de microorganismos vivos para aprovechar sus metabolitos son conocidos como cultivos iniciadores. Estas bacterias aprovechan dependiendo del metabolismo que presenten (homo y heterofermentativo) los azúcares del medio obteniendo como producto final ácido láctico u otros ácidos orgánicos, los cuales tienen capacidad acidificante, reducen el crecimiento microbiano y asociado a su actividad proteolítica les confieren sabor, aroma y textura a los alimentos (Abosereh *et al.*, 2016). Por lo tanto, la acidificación del medio de cultivo por parte de las BAL es un criterio para su selección con cultivo iniciador; algunos autores lo utilizan en la caracterización de microorganismos probióticos (Tabasco-Rentero, 2009). Por lo que diversos estudios tratan de adentrarse en la constante búsqueda de bacterias que puedan servir como cultivos iniciadores, Durán-Quintana *et al.* (1997), muestran las características de las bacterias ácido lácticas en la elaboración de tres tipos de aceitunas de mesa, determinando que la presencia de BAL durante los procesos de fermentación y conservación dependieron de ciertos factores como la variedad del producto,

concentración de cloruro de sodio y nivel de acidificación del medio. Toledano (2009) durante la elaboración de jamón curado a base de BAL observó una disminución del pH, actividad proteolítica y ausencia de microorganismos patógenos. Tuncer (2009) caracterizó cepas de BAL aisladas de muestras de queso Tulum para demostrar su capacidad como cultivos iniciadores encontrando que las especies de *E. faecium* fueron resistentes al calor ($\approx 60^{\circ}\text{C}$) acidificación y actividad lipolítica. Siendo la actividad de acidificación, un criterio de selección de un cultivo iniciador.

Las propiedades de las BAL se caracterizan de acuerdo a la fuente de la cual fueron aisladas, para su multiplicación necesitan de un alto requerimiento nutricional con óptimas condiciones para su crecimiento y desarrollo, estas características pueden ser muy complejas por lo que es de gran interés conocer la dinámica poblacional de estos microorganismos (Ramírez *et al.*, 2011). Martínez-López *et al.* (2016) aislaron y clasificaron diferentes cepas de BAL pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Figuras 2,3 y 4) procedentes de suero fermentado obtenido durante la elaboración de queso regional, comprobaron el crecimiento de estas bacterias en un intervalo de pH de 3.4-4.05, observando un recambio en la población debido a un efecto antagónico en las especies de BAL.

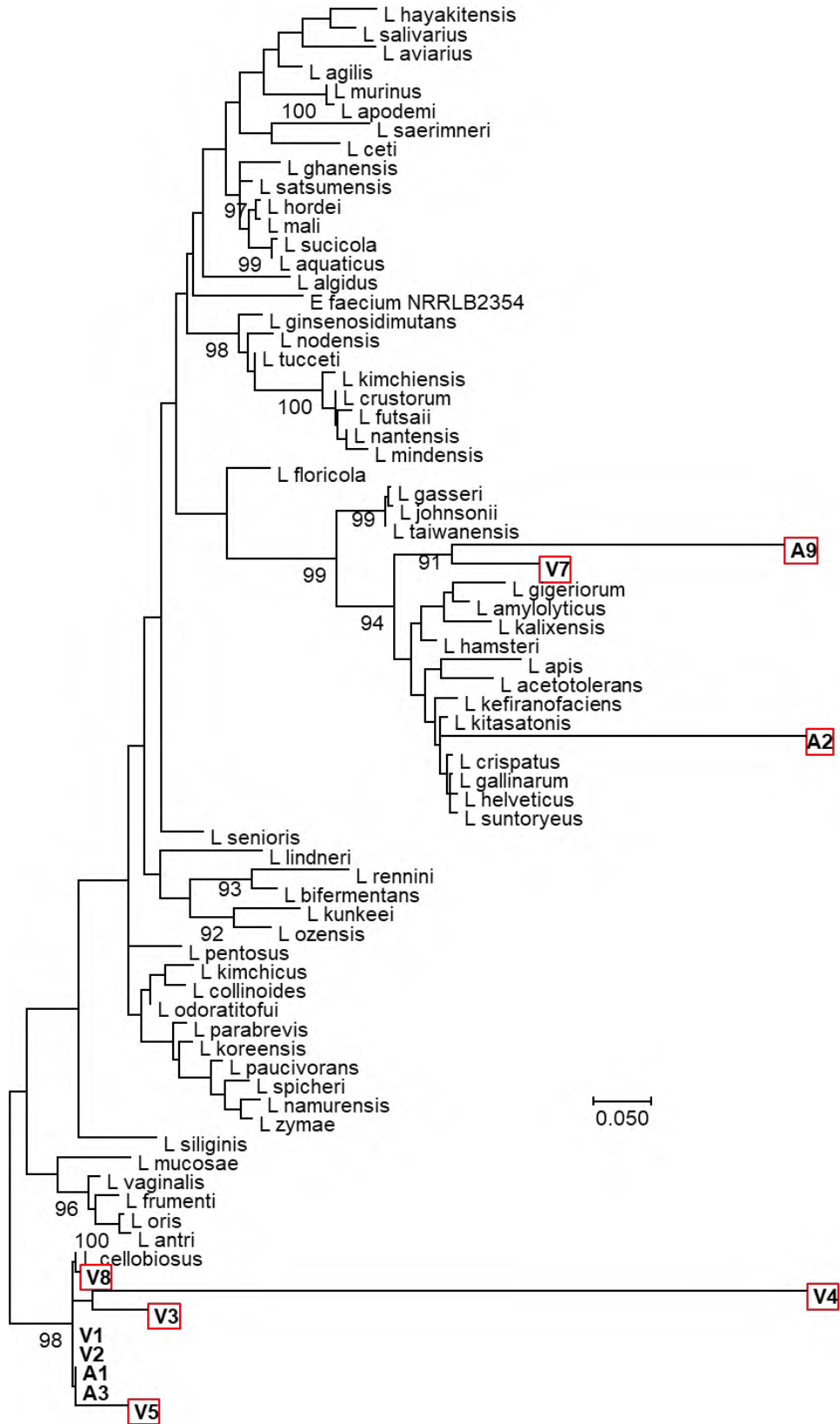


Figura 2. Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género *Lactobacillus* (Tomado de Martínez-López *et al.*, 2016).



Figura 3. Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género *Enterococcus* (Tomado de Martínez-López *et al.*, 2016).

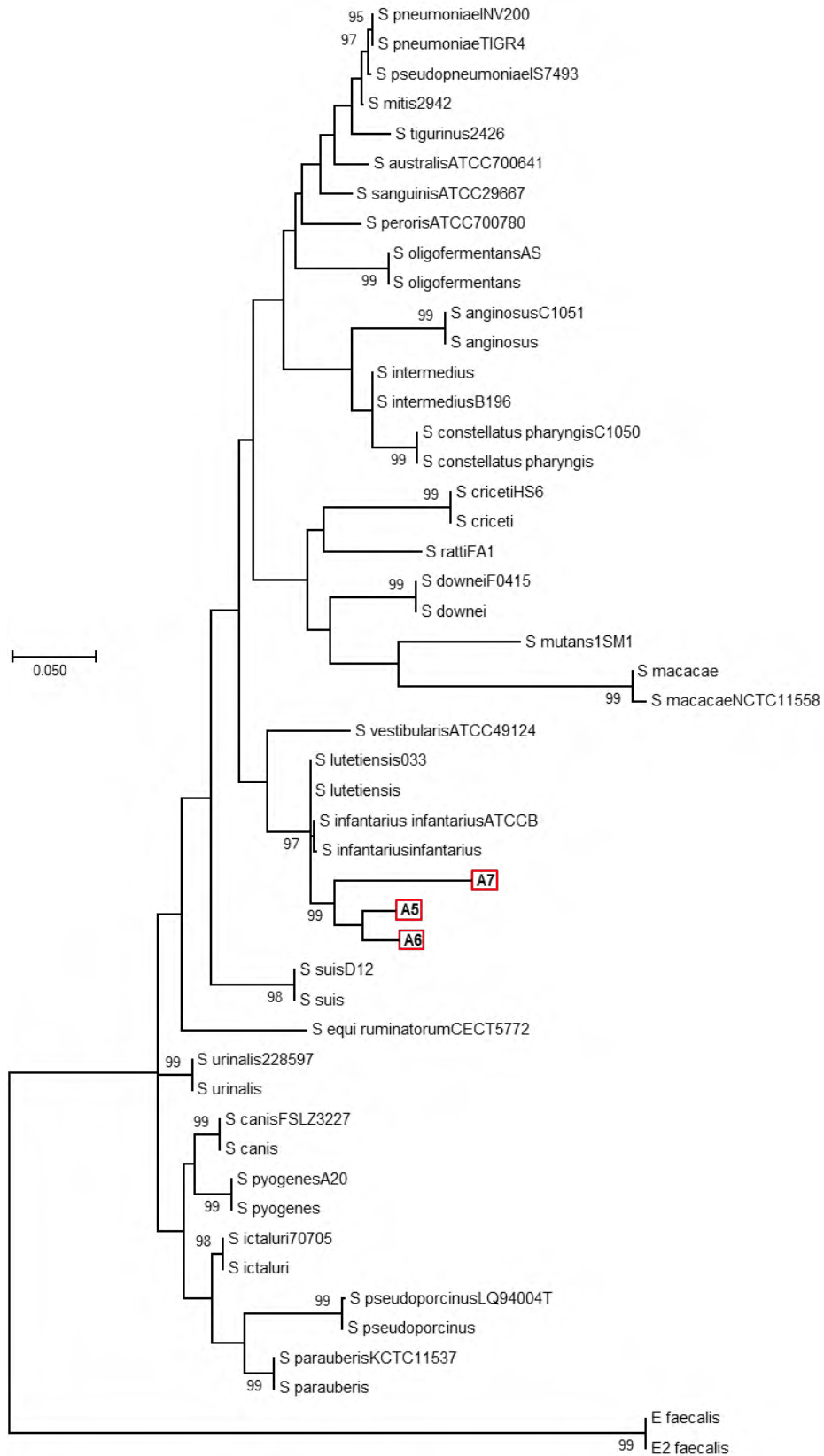


Figura 4. Árbol filogenético de BAL aisladas de lactosuero, pertenecientes al género *Streptococcus* (Tomado de Martínez-López *et al.*, 2016)

V. Marco teórico

5.1 Microbiota

Durante el nacimiento el ser humano adquiere la mayor parte de los microorganismos que formaran parte de su microbiota intestinal, la cual se irá modificando con la edad y el tipo de alimentación (Tannock, 1995). Esta flora intestinal estará constituida tanto de bacterias anaerobias facultativas principalmente *Lactobacillus* y *E. coli* (Ahrné *et al.*, 2007), como de bacterias anaerobias estrictas, *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, juntos formando parte del tubo digestivo. La función de estos microorganismos es la de contribuir con la descomposición de los alimentos, generar medios de protección frente a patógenos y colaborar con el sistema inmune del hospedero (Macfarland y Dillon, 2007).

La cantidad de bacterias presentes en el tracto intestinal varía ampliamente en los distintos sectores debido a las condiciones estrictas de acidez presentes en el estómago y la elevada concentración de sales biliares en el intestino grueso (Macfarland y Gibson, 1995). La principal fuente de bacterias que ingresan al organismo es mediante la saliva, estas bacterias provienen del medio externo, adhiriéndose a las mucosas obteniendo una concentración entre 10^7 y 10^9 UFC/mL (Tannock, 1995). El estómago es la zona más escasa de microorganismos, con menos de 10^3 UFC/mL, como consecuencia de la secreción gástrica, en la que el ácido clorhídrico ejerce un efecto germicida atribuido al bajo pH (> 3). La microbiota característica de esta área son enterococos, enterobacterias, bacteroides, bifidobacterias y lactobacilos (Campeotto *et al.*, 2007).

En el intestino delgado, la distribución bacteriana comienza con niveles bajos en el duodeno, con 10^3 UFC/g de contenido intestinal, ya que en esta zona se vuelcan las secreciones gástricas mediante los movimientos peristálticos (Macfarland y Gibson, 1995). En el íleon el número de microorganismos se incrementa notoriamente, alcanzando cantidades de 10^7 UFC/g de contenido intestinal,

correspondientes a lactobacilos, estreptococos, bacteroides, enterobacterias, y bifidobacterias (Brunser, 2013). En el intestino grueso se encuentran poblaciones densas de anaerobios contabilizando alrededor de 10^{11} UFC/g de contenido luminal. En el colon el tránsito digestivo es lento lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar fermentando los sustratos disponibles de la dieta o de las secreciones endógenas. En este sector se encuentra la zona más poblada con aproximadamente 10^{12} UFC por gramo de contenido intestinal en donde habitan diversas especies de lactobacilos, bifidobacterias, enterobacterias, clostridios, eubacterias, peptostreptobacterias, ruminobacterias, fusobacterias y bacteroides (Rodríguez, 2006).

Estudios de análisis bacteriológicos convencionales de la flora fecal demuestran que las bacterias anaeróbicas estrictas superan en número a las anaeróbicas facultativas por un factor de 100 a 1.000, evidenciando la gran gama de microorganismos presentes. A pesar de la complejidad de esta microbiota, existe un balance delicado en las poblaciones bacterianas, que si se ve alterado puede producir un desequilibrio microbiano conocido como disbiosis (Pagliari *et al.*, 2015). La disbiosis de las comunidades bacterianas intestinales está relacionada con otras patologías como alergias, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, obesidad, diabetes e incluso cáncer (Zhang *et al.*, 2015).

Múltiples procesos se asocian con cambios en la composición o función metabólica de la flora entérica. Por ejemplo, muchas enfermedades diarreicas agudas se deben a patógenos que proliferan, presentan características invasivas y producción de toxinas. La diarrea asociada a los antibióticos se debe a un desequilibrio en la composición de la flora intestinal con la proliferación de especies patógenas, algunas como *Clostridium difficile* producen ciertas toxinas que causan colitis pseudomembranosa (Vrese y Marteau 2007). Diversas bacterias intestinales desempeñan un papel en la patogenia del síndrome del intestino irritable. En pacientes con este padecimiento son frecuentes síntomas como distensión abdominal y flatulencia. La fermentación que tiene lugar en el colon genera un

volumen variable de gas. Igualmente, la putrefacción de las proteínas por bacterias de la luz intestinal se asocia con la encefalopatía hepática en pacientes con insuficiencia hepática aguda o crónica (Guarner, 2007).

Modelos experimentales han demostrado que las bacterias intestinales pueden desempeñar un papel en la iniciación del cáncer de colon a través de la formación de productos de carcinogénicos. Los defectos genéticos moleculares que aparecen en cáncer colon rectal humano son bien conocidos, y parecen ser consecuencia de productos generados en el intestino. Los datos epidemiológicos sugieren que factores medioambientales como la dieta desempeñan un importante papel en el desarrollo de cáncer de colon. El consumo de grasa animal y carnes rojas, en particular procesadas, se asocia a un riesgo más elevado, mientras que el consumo de frutas, verduras, cereales integrales, pescado y calcio se asocian a disminución del riesgo (León, 2015).

5.2 Bacterias ácido lácticas

Las BAL agrupan un amplio rango de géneros y especies, son microorganismos gram (+), clasificados como catalasa negativo, no formadores de esporas y tienen la cualidad de crecer en diversos ambientes, ya sea en condiciones microaerófilas hasta condiciones de anaerobiosis estricta. Los géneros más importantes de bacterias lácticas son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998). Filogenéticamente, las bacterias gram (+) se dividen en dos grupos, las que cuentan con un bajo contenido en guanósina-citosina (< 50%) y el género *Bifidobacterium*, el cual no incluye bacterias gram (+), pero se le considera BAL por tener propiedades fisiológicas y bioquímicas muy parecidas a los otros géneros, además de compartir nichos ecológicos, como el tracto gastrointestinal humano y productos fermentados (Scheifer y Ludwig, 1995).

Las BAL tienen altos requerimientos de carbono y nitrógeno siendo su hábitat natural ambientes ricos en nutrientes como los productos fermentados. Mediante la fosforilación de los carbohidratos, las BAL obtienen la energía metabólica que necesitan para formar como principal metabolito ácido láctico. Su actividad proteolítica les permite obtener aminoácidos a partir de proteínas. (Salminen y Von Wright, 2001).

Las BAL se han empleado a lo largo de la historia en la fermentación de alimentos induciendo cambios en el sabor y textura, mostrando efecto conservante, incrementando la vida útil de los productos debido al proceso de acidificación que realizan durante la producción de ácido láctico (Vasek *et al.*, 2000). La mayoría de las BAL son utilizadas como probióticos, usualmente son aisladas de productos lácteos y pertenecen a especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Leuonstoc*, pudiendo ser suplementadas a la flora intestinal de humanos y animales (Parra *et al.*, 2009). Las funciones probióticas no están presentes en todas las cepas de BAL y muestran una considerable variabilidad a nivel especie. Las especies de BAL afectan de diferente forma a la microflora intestinal humana, por lo que resulta importante conocer qué microorganismos están presentes en el ecosistema microbiano e identificar las especies con efectos protectores. Se requiere de la identificación a nivel de especie para su uso en la industria de alimentos (Delgado, 2005).

5.3 Hábitats de las bacterias ácido lácticas

Las BAL están asociadas con ambientes ricos en nutrientes como alimentos o materiales vegetales. Pueden estar presentes en el suelo, agua, composta, aguas residuales y en alimentos fermentados o en descomposición. También se encuentran en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la vagina, influenciando estos ecosistemas (Parra-Huerta, 2010).

Se han realizados aislamientos y estudios de las características probióticas de las BAL a partir de tracto gastrointestinal de pollos, así como de heces de niños

lactantes, muestras vaginales y de intestinos de ratas, cerdos y humanos, ya que todas tienen la posibilidad de ser candidatas para utilizarse como probióticos una vez evaluadas (Fabrice *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2009; Rondón *et al.*, 2008; Argun *et al.*, 2016).

5.4 Metabolismo

Las bacterias ácido lácticas cuentan con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación de azúcares y en otras ocasiones generando otros compuestos como etanol, acetato y CO₂. En general estas bacterias tienen complejas necesidades para su crecimiento como: síntesis de vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, por lo que para su aislamiento se deben emplear medios selectivos que ayuden a cumplir estos requerimientos (Carr *et al.*, 2002). De acuerdo a su metabolismo se pueden clasificar en:

1. Homofermentativos: Producen predominantemente ácido láctico y utilizan las hexosas siguiendo la vía de Embden-Meyerhof (Figura 5A).



La fermentación homoláctica puede dar lugar a una mezcla de ácidos cuando existe una concentración de glucosa limitante, cuando se incrementa el pH, la temperatura o se fermentan azúcares distintos de la glucosa; en estos casos, la diferencia radica en el metabolismo del piruvato, el cual además de producir ácido láctico produce formiato y acetyl CoA (Serna-Cock y Rodríguez-Stouvenel, 2005).

Las familias *Streptococcaceae* (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*) son las mayores productoras de ácido láctico. Dentro del género *Lactobacillus*, existen especies homofermentativas obligadas y facultativas, éstas últimas tienen glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y siguen la vía de las pentosas (Figura 5B) (Waldir *et al.*,

2007).

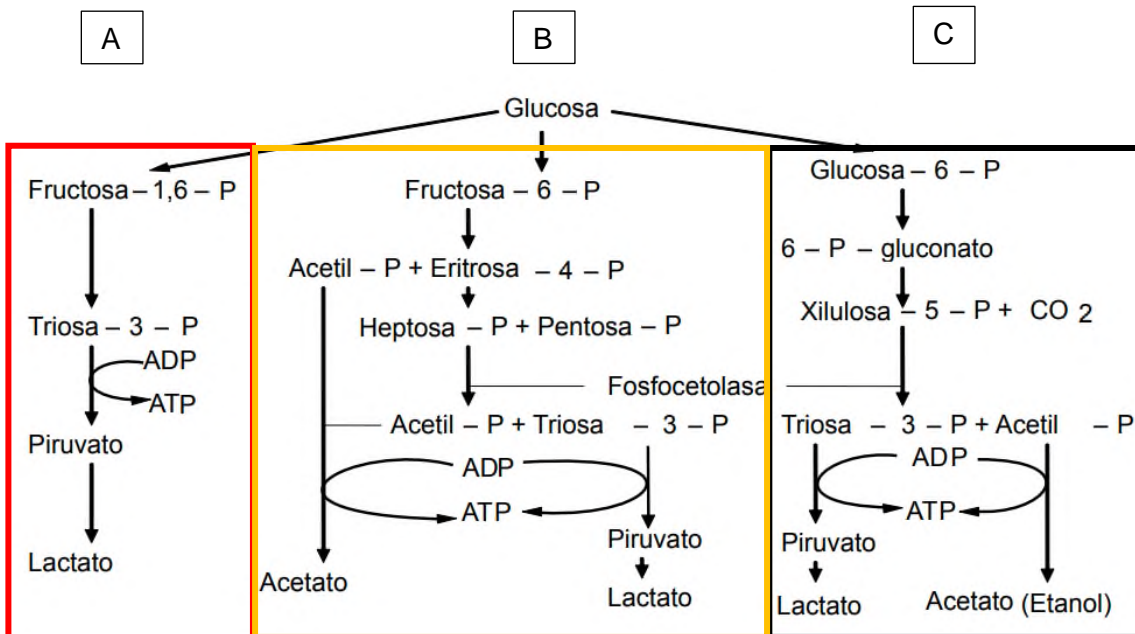
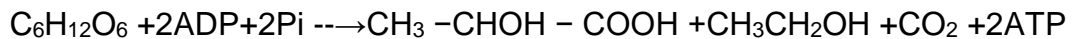


Figura 5. Vías metabólicas en la fermentación por bacterias lácticas (Tomado de Waldir *et al.*, 2007).

2. Heterofermentativos: producen a partir de glucosa, cantidades equimolares de otros productos de fermentación como ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Figura 5C).



Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus bifidus* y todas las especies del género *Leuconostoc*. En la fermentación heteroláctica hay formación de xilulosa-5 fosfato por el sistema de la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. Los facultativos heterofermentativos fermentan las hexosas a ácido láctico y puede producir CO₂ a partir del gluconato, pero no de la glucosa. Ellos también pueden seguir la vía de las pentosas para producir ácido láctico y acético (Waldir *et al.*, 2007).

Algunas especies del género *Lactobacillus* son heterofermentativos facultativos; en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como

homofermentativos, y en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoína y peróxido de hidrógeno (Vaca, 2011). Las bacterias heterofermentativas obligadas como el género *Leuconostoc*, oxidan la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, produciendo una mezcla equimolar de lactato, CO₂ y etanol o acetato (Vaca, 2011).

5.5 El género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* está integrado por bacilos gram positivos, no formadores de esporas, fermentativos, anaerobios facultativos, con importantes requerimientos nutricionales y un alto contenido de G+C en su ADN. Teniendo como fuente de carbono a la glucosa. Los *Lactobacillus* pueden ser homofermentativos, cuando el producto final de su metabolismo es casi exclusivamente ácido láctico, o heterofermentativos cuando producen una mezcla de ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético (Galarza, 2012). Actualmente el género *Lactobacillus* cuenta con algo más de 80 especies reconocidas, caracterizadas por una alta diversidad, la disponibilidad de las secuencias completas del genoma de algunos miembros de este género ha permitido confirmar su extrema divergencia, que se refleja en la dificultad para su clasificación taxonómica (Ramírez *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Lactobacillus* son habitantes normales del tracto gastrointestinal y mucosas de los seres humanos, también se encuentran en vegetales y en alimentos fermentados de origen animal y vegetal, en la industria alimentaria y desde tiempos antiguos los lactobacilos han sido utilizados para la elaboración y conservación de alimentos (Lozada, 2001).

En la actualidad una de las principales áreas de investigación en el género *Lactobacillus*, se basa en la comprobación de las propiedades probióticas que tienen muchos de sus miembros. El descubrimiento de nuevos probióticos o nuevas aplicaciones de los ya existentes, genera grandes expectativas para el desarrollo en campos como la nutrición, la salud y la industria alimentaria (Juárez, 2005).

5.6 Descripción de las especies dentro del género

5.6.1 *Lactobacillus acidophilus*

Caracterizado por bacilos de 0.6 – 1.0 µm de ancho y 1.5 – 6 µm de largo. Aparecen en parejas, individualmente o unidos por cadenas cortas. Algunas especies fermentan el almidón. Se encuentran de forma en masas fermentadas y en vinos. Acidifica productos lácteos y no hidrolizan la lactosa, por tal motivo su uso no es recomendado para personas con intolerancia a la lactosa. Desempeña un papel importante en el control de la microbiota indeseable en el tracto intestinal de animales y humanos. Ha presentado efecto antagónico en diferentes cepas de *H. pylori*. La acción inhibitoria de esta cepa se debe a la producción de ácidos orgánicos, incluido el ácido láctico y peróxido de hidrógeno. Las proteínas antimicrobianas o bacteriocinas son las que median el antagonismo por *L. acidophilus* (Kenneth y Charles, 2006).

5.6.2 *Lactobacillus casei*

Este bacilo se encuentra estrechamente relacionado con otras especies como *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, las cuales pueden ser encontradas en productos lácteos y en el TGI de los seres vivos por lo que son ampliamente utilizados en aplicaciones relacionadas con la salud. Su distribución va desde el ser humano, vegetales, carne y productos lácteos (Sobarzo, 2007).

La taxonomía de *L. casei* es controvertida y recientemente, estudios genómicos comparativos resaltan heterogeneidad lo que sugiere una diversificación de su genoma contribuyendo a la adaptación en su nicho ecológico. Se consideran anaerobios tolerantes al oxígeno con metabolismo fermentativo, catalasa negativa y actividad presente en la cadena de transporte de electrones (CTE). El crecimiento y el tipo de metabolismo afecta significativamente las respuestas de estrés en BAL induciendo características útiles (biomasa mejorada) para aplicaciones industriales y biotecnológicas, como el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, estudios genéticos y fisiológicos (Zotta *et al.*, 2014).

5.6.3 *Lactobacillus fermentum*

L. fermentum es un habitante común de la boca humana, el tracto gastrointestinal y la vagina, produce una amplia gama de compuestos metabólicamente activos, como el glutatión, el cual previene la inflamación de células epiteliales del colon. Tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de bacterias gram-negativas, incluyendo *Shigella sonnei*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococci*, atribuido a la producción de etanol, ácido acético, ácido succínico y ácido láctico (Chery *et al.*, 2013).

5.7 El género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas. Son cocos gram-positivo, no esporulados, catalasa negativa, se agrupan en parejas en cadenas cortas. Las diferentes especies reconocidas en la actualidad se asocian en diversos grupos (Abriouel *et al.*, 2008). Los enterococos crecen de forma óptima a 37°C, aunque la mayoría de las especies crecen en un rango de temperatura de 10 a 45°C. También son capaces de crecer en medios con pH de 9.6, en presencia de NaCl al 6.5% p/v, en presencia de sales biliares al 40% p/v y de hidrolizar la esculina, con ciertas excepciones. Algunas especies son pigmentadas (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus*) o móviles (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). En general son anaerobios aerotolerantes, ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que destruyen respectivamente el O₂ y el H₂O₂ que se generan en condiciones de aerobiosis (Díaz *et al.*, 2010).

Los enterococos se consideran microorganismos integrantes de la flora intestinal del hombre y otros animales. Las especies más frecuentes en el intestino humano son *E. fecalis* y *E. faecium*. La proporción de éstas varía dependiendo de la región geográfica, lo que hace suponer la influencia de la dieta y de otros factores ambientales en la presencia de tales microorganismos en el intestino. Los enterococos se encuentran en más del 90% de los individuos sanos. Por ello, con

frecuencia son considerados como comensales inocuos o bien con bajo potencial patogénico (Abriouel *et al.*, 2008).

5.8 El género *Streptococcus*

El género *Streptococcus* está constituido por un grupo heterogéneo de bacterias en forma redondeada, gram positivas, pueden estar formando cadenas o parejas y se encuentran bien distribuidas en la naturaleza. Se han reportado especies que son patógenas para el ser humano, pero la mayoría se encuentran en una asociación comensal, formando parte de su microbiota normal de piel y mucosas (Suárez, 2002).

Los estreptococos son bacterias de 2 μm de diámetro, fermentan la glucosa produciendo ácido láctico. Las distintas especies del género *Streptococcus* crecen en medios enriquecidos con sangre, suero o carbohidratos en un intervalo de temperatura de 35-37°C, especialmente en una atmósfera con dióxido de carbono del 5 al 7%. Algunas especies necesitan el CO₂ para crecer (Montes y García-Arenzana, 2006). El género *Streptococcus* comparte características metabólicas similares a las de *Lactobacillus*, puede presentar fermentación homofermentativa como heterofermentativa, según la especie (Tortola *et al.*, 2007).

5.9 Alimentación

El ser humano y los animales para sobrevivir deben hacer uso de los alimentos para cubrir sus requerimientos nutricionales, junto con el agua, éstos son la fuente constructora, reguladora y energética para el desempeño adecuado de las funciones vitales del organismo; no obstante, éstos también pueden ser el origen de un sin número de afecciones y de enfermedades por exceso, por defecto o por su composición química (Kozak, 1968; Vega-Rodríguez *et al.*, 2015)

El consumo de alimentos funcionales se ha incrementado en los últimos años, debido al beneficio para la salud de los consumidores y en la productividad de los

animales, esto ha acrecentado el interés por la investigación orientada al avance en la producción de alimentos inocuos, con alto contenido nutricional, de poco aporte calórico y saludable, generando el desarrollo de una variedad de productos alimenticios (González-Aguilar *et al.*, 2014). El mercado actual de los alimentos funcionales se estima alrededor de los 33 billones de dólares, siendo Estados Unidos el más importante y dinámico con un consumo estimado mayor al 50% de la cantidad global producida, seguido por Japón (Florez *et al.*, 2014).

5.10 Producción de Exopolisacáridos (EPS)

Los EPS bacterianos pueden estar organizados estructuralmente de forma compacta, formando una cápsula que presenta uniones muy fuertes a otros componentes de la superficie celular, dependiendo de su composición química y a su modo de síntesis, los EPS de bacterias lácticas se dividen en homopolisacáridos (HoPS) los cuales están compuestos por un único tipo de monosacárido y hay una única enzima implicado en su síntesis, y los heteropolisacáridos (HePS) que están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, que pueden llevar unidos otras moléculas, y en su síntesis y polimerización están implicados varias enzimas. El interés de la investigación y caracterización de los EPS descritos, se debe a su relación con la modificación, positiva o negativa, de las propiedades sensoriales, principalmente viscosidad, textura y estructura, de los alimentos fermentados. Las cepas de BAL productoras de EPS (tipo HePS) se han aislado de numerosos productos lácteos fermentados naturales y se han seleccionado para su uso como “cultivos funcionales” en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, como el yogurt y kéfir. En los últimos años se está estudiando, y aplicando de forma eficaz, el uso de cepas productoras de HePS en la elaboración de queso con bajo contenido graso. De esta forma el EPS producido *in situ*, durante la etapa de coagulación y posteriormente durante maduración del queso, actúa como un espesante natural y un sustituto eficaz de la grasa, consiguiéndose un queso bajo en calorías con una textura y consistencia adecuadas (Wilches, 2005).

5.11 Usos de las BAL

5.11.1 Cultivos iniciadores

Las BAL han recibido atención debido a su importancia comercial. Las investigaciones se centran en el aislamiento de nuevas cepas para poder estudiar sus efectos como cultivos iniciadores. Un cultivo iniciador se define como el uso de una o más cepas (de una o diferentes especies), que se utilizan para inocular un producto crudo o pasteurizado con el fin de iniciar su fermentación. Dependiendo del número y tipo de cepas, los cultivos iniciadores se clasifican en: cultivo de cepa única, cultivo múltiple, cultivo mixto y cultivo indefinido o artesanal (Sánchez, 2005). Las características que estas bacterias tienen que cumplir son variadas como: capacidad de acidificación en menor tiempo, producción de sabor y aroma, obtención de una textura adecuada (grado de viscosidad), ausencia de patogenicidad, fácil preservación y propagación, prevalecer sobre la microbiota competitiva y una alta tasa de viabilidad para poder adecuarse a las diversas condiciones de producción (Ramírez *et al.*, 2011).

La principal aplicación de las BAL como cultivos iniciadores ha sido para la industria láctea obteniendo productos como el yogurt y quesos madurados. Las especies de BAL más ampliamente utilizadas en el proceso de elaboración del yogurt son cepas termófilas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, las cuales se desarrollan en verdadera simbiosis, en el que *S. thermophilus* inicia la fermentación láctica y se desarrolla hasta un pH de 5,5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, como el ácido fórmico, producen las condiciones ideales para que *L. bulgaricus* crezca y se desarrolle. El uso de estos microorganismos se encuentra en una relación cuantitativa de 1:1 a 1:3. La actividad proteolítica de los lactobacilos estimula, a su vez el crecimiento y la actividad acidificante de los estreptococos y su actividad lipolítica liberan ácidos grasos produciendo acetaldehído causante del aroma característico del yogurt, por su parte *Streptococcus thermophilus* al producir CO₂ y polisacáridos otorga textura al producto fermentado (Rivas y Garrro, 2006). La fermentación se lleva a cabo a 45°C

y se considera que esta etapa termina una vez que el pH de los yogures alcanza un valor por debajo de 4,6 (aproximadamente 1% de acidez expresada como porcentaje de ácido láctico) (Cabeza, 2006).

5.11.2 Probióticos

Se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias, que tras ser ingeridos en cantidades suficientes mejoran el equilibrio microbiano en el intestino tanto de humanos como de animales, provocando efectos benéficos sobre la salud (Vrese *et al.*, 2016).

La selección de una cepa como probiótico requiere, que la cepa sea tolerante al ácido y la bilis, excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos, se adhiera a las células de la mucosa intestinal, colabore en el equilibrio normal de la microbiota intestinal y que sus efectos benéficos sean demostrados científicamente (Frizzo *et al.*, 2006). La caracterización de microorganismos probióticos a nivel de género y especie es fundamental para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo y seguro en el estudio de sus efectos biológicos y clínicos (FAO, 2002).

Una característica de los probióticos es que la mayoría son aislados del tracto gastrointestinal de un individuo saludable e introducido nuevamente al intestino, generalmente por medio de un vehículo alimenticio; lo más conocidos son las leches fermentadas, popularmente conocidas como yogurt (Cueto-Vigil *et al.*, 2010). A nivel industrial existen gran variedad de productos alimenticios enriquecidos con BAL como yogures, quesos, helados, natillas, suplementos dietéticos, farmacéuticos, leches infantiles e incluso alimentos para animales (Ávila *et al.*, 2010; Amorocho, 2011).

Los probióticos contribuyen a mejorar la digestión de los alimentos favoreciendo procesos como la proteólisis, transformando las proteínas en moléculas más pequeñas asimilables (polipéptidos y aminoácidos) y las lipasas de estas bacterias degradan las grasas en ácidos grasos y glicerol, haciendo más fácil su digestión.

Según el requerimiento metabólico, algunos microorganismos probióticos son capaces de sintetizar vitaminas como K, B12, B9, B7, B2, B5, cuya actividad es de gran importancia para la función fisiológica del aparato gastrointestinal (Cabrera y Fdragas, 2005).

Los pacientes intolerantes a la lactosa tienen riesgo de suprimir el consumo de calcio y vitamina D, y están predispuestos a padecer osteoporosis. Se estima que 65-75% de la población mundial tienen bajos niveles de lactasa. Las bacterias productoras de ácido acético y β -galactosidasa como *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium acidipropionici* aumentan la actividad lactasa reduciendo posibles problemas de asimilación, pueden encontrarse en la naturaleza, formando parte del sistema gastrointestinal o estar presentes en muchos alimentos fermentados (Zarate *et al.*, 2000; Aburjaile, 2015).

El consumo de probióticos puede ayudar a disminuir y aliviar síntomas de alergias alimentarias por medio de la modulación del sistema inmune a través de la microbiota intestinal. Las cepas no son las que inducen o modifican la respuesta inmune, pero si están vinculadas a alteraciones transitorias que favorecen al consumidor. Además, tienen efecto benéfico sobre la evolución de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Manzano *et al.*, 2012). Estudios previos han demostrado que el uso de probióticos puede inducir una respuesta inflamatoria frente a microorganismos oportunistas, células mononucleares de sangre periférica tratadas con *Lactobacillus sakei* y *Escherichia coli nissle* aumentan la expresión de CD69 y CD25 y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y GM-CSF. Asimismo, algunas especies de probióticos mejoran la actividad de los linfocitos Th17 e inducen una respuesta tipo Th1, favoreciendo la inmunidad celular. Se ha demostrado que el uso de probióticos puede aumentar la frecuencia de linfocitos T reguladores e inducir la producción de IL-10, además de regular negativamente la secreción de citoquinas proinflamatorias de pacientes con colitis ulcerativa y síndrome de fatiga crónica. Los probióticos mejoran las uniones entre las células epiteliales, a través de la activación del receptor de crecimiento epitelial de enterocitos, aumentan la liberación de mucinas y anticuerpos IgA, inhiben la

respuesta citotóxica mediada por linfocitos intraepiteliales, incrementan la producción de bacteriocinas y defensinas, la citotoxicidad de las células NK, inducen el óxido nítrico sintasa en macrófagos promoviendo un aumento en los receptores tipo Toll, etc. (Hao *et al.*, 2011; Feria *et al.*, 2017). Algunas hipótesis sugieren que ciertas cepas bacterianas pueden asimilar la molécula del colesterol impidiendo su reabsorción, produciendo diversos metabolitos que afectarán los niveles de grasa en la sangre lo que influirá favorablemente a la disminución de las enfermedades coronarias. El efecto y los mecanismos de acción aún son desconocidos (Cueto y Aragón, 2012).

Las bacterias ácido lácticas producen gran variedad de sustancias como ácidos grasos, peróxidos y bacteriocinas que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Algunas especies bacterianas probióticas estimulan la producción de mucina en el epitelio, compiten con las bacterias patógenas por sitios de adhesión y modifican las toxinas derivadas por estos patógenos. Las bacterias probióticas, especialmente cepas de *Lactobacillus*, tienen habilidad para influir en la colonización y actividad de *H. pylori* (Kainulainen *et al.*, 2013)

El uso indiscriminado de los antibióticos provoca efectos residuales en los alimentos, el desarrollo de cepas patógenas resistentes y dañan el equilibrio ecológico de la flora gastrointestinal aumentando el riesgo de contraer enfermedades (Argun *et al.*, 2016). Debido a las limitaciones que tienen el uso de los antibióticos, ha sido necesario buscar productos más seguros e inocuos, comprobando que el empleo de los probióticos estabiliza el ecosistema gastrointestinal manteniendo en buen estado en la salud del huésped. La diferencia entre probióticos y antibióticos es que los primeros se describen a favor de la vida, no tienen un efecto inmediato pero si por un periodo más prolongado y presentan actividad inmunoestimulante, los antibióticos por el contrario van contra la vida, son inmediatos pero tóxicos para todas las células y su actividad es inmunodepresora, por lo que en base a estas características el uso de probióticos como coadyuvantes de los antibióticos podría mejorar el efecto de estos fármacos ampliando el tiempo de acción y aminorando los efectos secundarios durante su estadía en el organismo.

Diversos estudios sugieren la ingesta de probióticos como medio preventivo antes de una terapia con antibióticos, ya que hasta el momento no existen datos suficientes del uso de estos agentes vivos en la prevención de enfermedades infecciosas graves (Curbelo *et al.*, 2005; Pérez, 2015)

5.11 Identificación de las cepas probióticas

Las cepas deben ser identificadas utilizando diferentes metodologías, una de ellas, la identificación bioquímica de acuerdo al tipo de fermentación con el sistema API 50 CH, la identificación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16s, hibridaciones de ADN, huella genética empleando el análisis RAPD–PCR y relaciones de similitud de cada cepa de estudio (Ramos-Izquierdo *et al.*, 2009).

Así como una descripción de las propiedades probióticas relacionadas con el tipo de cepa, es decir tipificación genética, garantizar que el cultivo que contiene a la cepa no sufra una alteración o una mutación, revisar periódicamente la actividad probiótica de la cepa, siempre mantener la viabilidad de la cepa durante su manipulación y su almacenamiento (Mantilla y Burgos, 2012).

VI. Justificación

En la actualidad se sabe que hay una estrecha relación entre los alimentos que se consumen y sus efectos en la microbiota bacteriana, razón por la cual existe una tendencia en la búsqueda de una dieta más sana que aumente la expectativa de vida y disminuya el riesgo de padecer enfermedades. La microbiota intestinal al estar constituida de bacterias benéficas como lactobacilos y bifidobacterias juega un rol importante en la salud humana, por lo que el desbalance de ésta con la introducción de bacterias oportunistas traídas de la mala alimentación provocaría múltiples trastornos digestivos de importancia clínica. En diversos sectores de la industria alimentaria se está implementando el uso de microorganismos probióticos, sin embargo, son pocos los productos con probióticos que muestran evidencia científica que soporte sus propiedades benéficas como: facilitar la absorción de nutrientes, contribuir con la síntesis proteica, mejorar el tránsito intestinal y regular el sistema inmunitario. Por lo tanto, la búsqueda de microorganismos con potencial probiótico extraídos de fuentes como el suero de queso, que por lo general es un subproducto de desecho y menospreciado, pueda ser reutilizado para contribuir con la salud del ser humano.

VII. Hipótesis

Las cepas pertenecientes al género de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* que forman parte del grupo de BAL aisladas de suero fermentado de queso, podrían presentar características de resistencia a pH ácido, tolerancia a las sales biliares, resistencia a antibióticos y actividad antagonista frente a patógenos intestinales, colocándolas como posibles microorganismos probióticos.

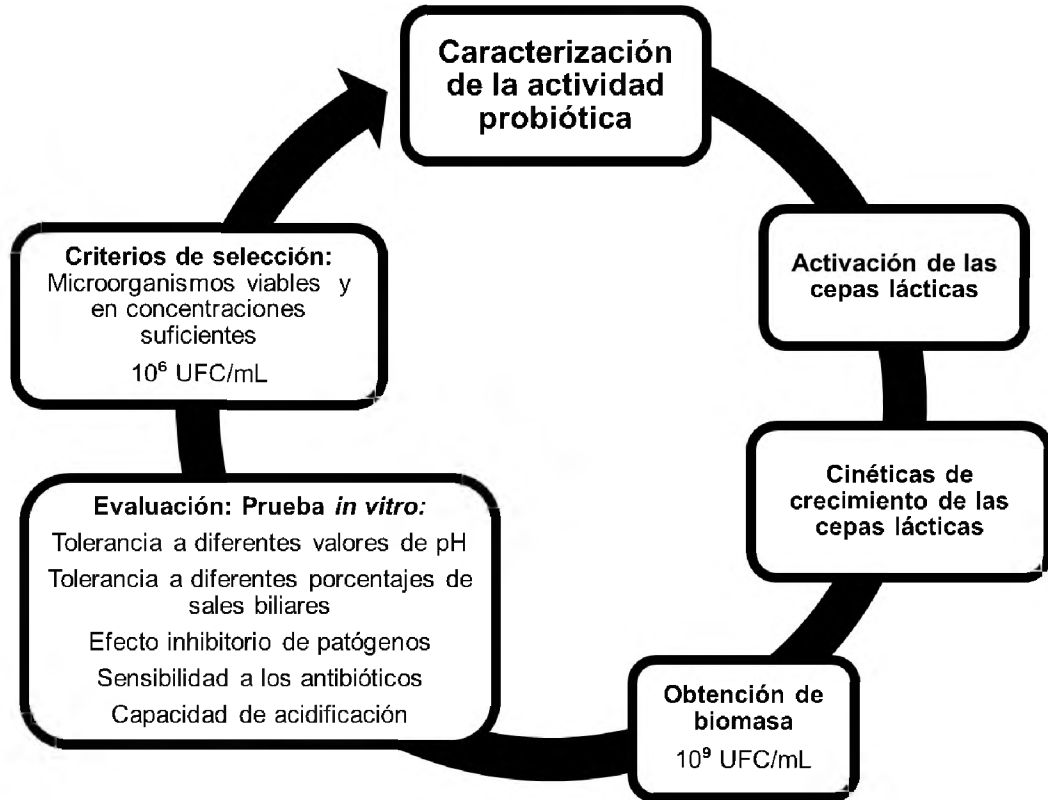
VIII. Objetivo general

Caracterizar, parcialmente, el potencial probiótico de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* aisladas de suero fermentado de queso, evaluando su viabilidad al ser sometidas a diferentes valores de pH, concentraciones de sales biliares, antibióticos y microorganismos patógenos.

IX. Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* con diversos valores de pH.
- Determinar la viabilidad de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* en diferentes concentraciones de sales biliares
- Evaluar la capacidad de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* de inhibir a microorganismos patógenos (*H. pylori*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*)
- Evaluar la resistencia de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* a antibióticos de uso común.
- Determinar la capacidad de acidificación de la leche de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.

X. Estrategia experimental



XI. Materiales y métodos

11.1 Microorganismos

El potencial probiótico de cinco cepas de BAL aisladas de suero fermentado de queso, *Lactobacillus fermentum* (A3), *Enterococcus durans* (A4), *Enterococcus italicus* (V6) y dos especies de *Streptococcus* (S1 y S2) fue analizado junto con dos cepas control *Lactobacillus acidophilus* A12 y *Lactobacillus casei* V12 (aisladas de Pediasure y Nido Kinder Etapa 1-3, respectivamente, ambas leches en polvo) (Tabla 2). Las cepas se encontraban caracterizadas bioquímica y molecularmente, mantenidas en congelación a -20°C en viales con glicerol.

Tabla 1. Nomenclatura para cada una de las BAL de estudio

Clave	Cepa
A12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
V12	<i>Lactobacillus casei</i>
A3	<i>Lactobacillus fermentum</i>
A4	<i>Enterococcus durans</i>
V6	<i>Enterococcus Italicus</i>
A5	<i>Streptococcus (S1)</i>
A6	<i>Streptococcus (S2)</i>

11.2 Acondicionamiento de las cepas

Las cepas se inocularon en caldo MRS, se incubaron a 37° C por 48 horas en una atmósfera con 15 % de CO₂, en las primeras 24 h se renovó el medio de cultivo, al cumplirse las 48 h de incubación el caldo se centrifugó a 5,500 rpm durante 15 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en agua destilada estéril hasta la obtención de una concentración de 10⁹ UFC/mL (Figura 6, Tubo 2 de McFarland, Anexo II). La suspensión obtenida se utilizó como inóculo para realizar las pruebas de caracterización probiótica (Mantilla y Burgos, 2012; Jurado-Gómez *et al.*, 2016).

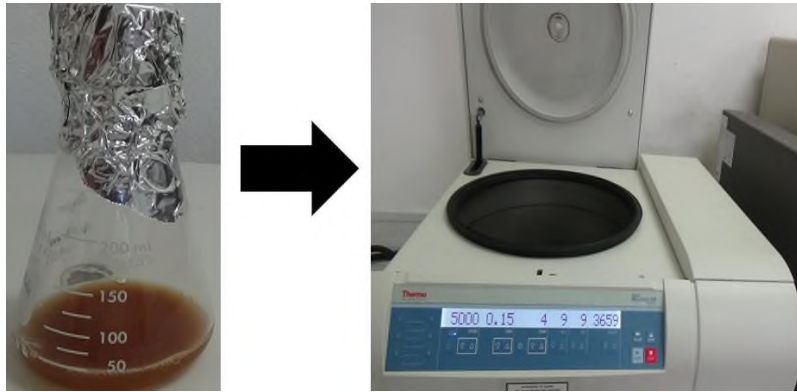


Figura 6. Acondicionamiento de las BAL probadas

11.3 Cinética de crecimiento y obtención de biomasa

Las cinéticas de crecimiento de las cepas lácticas se realizaron inoculando 1 mL de la suspensión de bacterias (10^9 UFC/mL) en 50 mL de medio MRS. El cultivo se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera con 15 % de CO_2 , cada 3 horas se tomaron muestras de 1 mL del medio de cultivo y su absorbancia fue leída a 540 nm (Espectrofotómetro UV-Vis, Marca Jenway, Modelo 6700 Single Cell Holdes, Reino Unido) para registrar el crecimiento de cada cepa (Monteagudo, 2011). Cabe mencionar que para el uso de la absorbancia establecida se realizó un barrido espectral.

11.4 Tolerancia a la acidez

La tolerancia a la acidez de las cepas lácticas se evaluó en tubos de ensayo con 3 mL de caldo MRS ajustado con HCL 0.1 N a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5, 6 y 7); el medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Cada tubo fue inoculado con una concentración de 1.2×10^9 UFC/mL (Tubo 2 de McFarland, Anexo II) de las cepas de interés. Los caldos se incubaron a 37°C en una atmósfera con 15% de CO_2 durante 4 horas, simulando el tiempo de residencia de un alimento en el estómago. Posteriormente se realizó la cuenta en placa en agar MRS y el resultado se reportó como UFC/mL. Las determinaciones se hicieron por triplicado. (Vélez, 2014).

11.5 Tolerancia a las sales biliares

La tolerancia a las sales de biliares de las cepas lácticas se evaluó en tubos de ensayo con 3 mL de caldo MRS con cuatro concentraciones de sal de bilis de buey (0.5, 1, 2 y 3 % p/v), los tubos con medio se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos, después cada tubo fue inoculado a una concentración de 1.2×10^9 UFC/mL (Tubo 2 de McFarland, Anexo II) de las cepas lácticas. Los caldos se incubaron a 37°C en una atmósfera con 15% de CO₂ durante 4 horas, posteriormente se hicieron siembras en placas de agar MRS para determinar las UFC/mL. La determinación se realizó por triplicado (Moreno, 2012).

11.6 Prueba de inhibición a patógenos

Las cepas se sembraron en pozos hechos en la superficie de una placa con agar MRS, las placas se incubaron a 37°C por 24 h en una atmosfera con 15% de CO₂. Por separado, las cepas patógenas *Salmonella* sp. *Shigella* sp., *E. coli*, *H. pylori* y *Staphylococcus aureus* (donadas por la Facultad de medicina UNAM) se inocularon en 3 mL de caldo GC (Anexo I) y se incubaron en las mismas condiciones que las cepas de BAL. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos con las cepas patógenas se centrifugaron (5,500 rpm por 30 minutos) y el pellet se resuspendió con agua estéril hasta alcanzar una concentración equivalente a 10^8 UFC/mL; 1 mL de esta suspensión se mezcló con 9 mL de agar nutritivo blando al 1% y se vació sobre las placas donde se encontraba el cultivo de las cepas lácticas, quedando dos capas sobrepuestas, para poner en contacto la cepa láctica con la cepa patógena. Las placas se incubaron a 37 °C con 15% de CO₂ por 48 horas, durante este periodo se midieron los halos de inhibición. La determinación se hizo por triplicado (Zamora, 2003).

11.7 Prueba de resistencia a los antibióticos

Esta prueba se realizó con discos de papel filtro impregnados con antibióticos de uso común de acuerdo a las concentraciones que se muestran en la Tabla 2, según el método estándar de difusión en discos del instituto de análisis clínicos (CLSI). El inóculo de la cepa control y las cepas de interés se ajustaron a una turbidez similar

al tubo 2 en la escala de McFarland, esta suspensión se sembró por césped o tapiz sobre la superficie de placas de agar MRS, inmediatamente se colocaron los discos con los antibióticos sobre el medio y las placas se incubaron a 37°C durante 48 h con 15% de CO₂, posteriormente se midió el diámetro de la zona de inhibición y se reportó la sensibilidad o resistencia de la cepa ensayada.

Tabla 2. Concentraciones de los antibióticos de uso común utilizados en la caracterización de las BAL de estudio (Modificado de Sánchez, 2007).

Antibiótico	Concentración
Ampicilina(A)	15 mg/mL
Ciprofloxacino (C)	15mg/mL
Trimetroprim (T)	25 mg/mL
Dicloxacilina (D)	15 mg/mL

Los resultados se interpretaron como: sensibles, sensibles intermedios y resistentes (Valenzuela, 2010). Las pruebas de resistencia a los antibióticos se realizaron por triplicado para cada cepa de estudio.

11.8 Prueba de acidificación y viscosidad

Esta prueba se realizó para comprobar la capacidad de acidificación en leche de las cepas de estudio para determinar su posible uso como cultivos iniciadores. Se realizaron cinéticas de acidificación en tubos con 50 mL de leche entera pasteurizada inoculada con 10⁸ UFC/mL de cada cepa, se midió cada 4 h con un potenciómetro (pHmetro Hanna Instrumentos, Hi 208 Educacional, Romania) las variaciones del pH por un periodo de 48 h o hasta alcanzar un pH de referencia de 4.5 (Kristo *et al.*, 2003).

Para medir el porcentaje de acidez se utilizó el método de titulación con hidróxido de sodio 0.1 N y la ecuación (Rivas y Garro, 2006; Bravo, 2012):

$$A\% = \frac{(Vg \times N \times 100 \times F)}{Vm}$$

Donde:

% A: porcentaje de acidez

Vg: volumen NaOH gastado/utilizado

N: normalidad conocida NaOH

F: factor de acidez conocida 0.09 para la leche

Vm: volumen total de la muestra

Por otro lado, los valores de viscosidad producidos después de la fermentación de la leche con cada cepa se determinaron utilizando un viscosímetro de rotación (Brookfield 20DV3T™, USA). Para realizar la lectura se utilizaron 600 mL (cantidad mínima requerida por el equipo para realizar la determinación) de leche acidificada, la velocidad de rotación se ajustó a 50 rpm, la temperatura a 25 °C y se usó una aguja del número 2 (Uribe *et al.*, 2008). La acidez y la viscosidad fueron determinadas por triplicado para cada cepa.

XIII. Análisis estadísticos

Para las pruebas de caracterización se realizó un análisis experimental utilizando un modelo ANOVA de dos factores y comparación de medias por Tukey con la hoja de cálculo Minitab versión 2018 (Acevedo *et al.*, 2013).

XII. Resultados y discusión

12.1 Cinética de crecimiento de las cepas de interés

Los resultados de la cinética de crecimiento de las cepas control y las cepas de interés se presentan en la Figura 7. Se puede observar que para la cepa control *Lactobacillus acidophilus*, la fase exponencial se alcanzó a las 18 h y la máxima producción de biomasa a las 27 h, posteriormente se observó un descenso en la velocidad de crecimiento hasta el final del periodo de incubación. Para la cepa control *Lactobacillus casei*, se observó la máxima producción de biomasa a las 20 h. Por otro lado, la cepa de *Lactobacillus fermentum*, alcanzó la fase exponencial hasta las 16 h y se mantuvo estable después de las 40 h de incubación. Para las cepas *E. durans* y *E. italicus*, ambas observaron el tiempo de máxima producción de biomasa a las 12 h, con un descenso en la velocidad de crecimiento que se mantuvo estable hasta el final de la incubación y el tiempo correspondiente para las cepas *Streptococcus S1* y *S2* fue a las 24 h manteniendo su estabilidad después de 48 h. Estos resultados se emplearán para determinar el tiempo de máxima producción de biomasa empleada para la realización de las pruebas de caracterización probiótica.

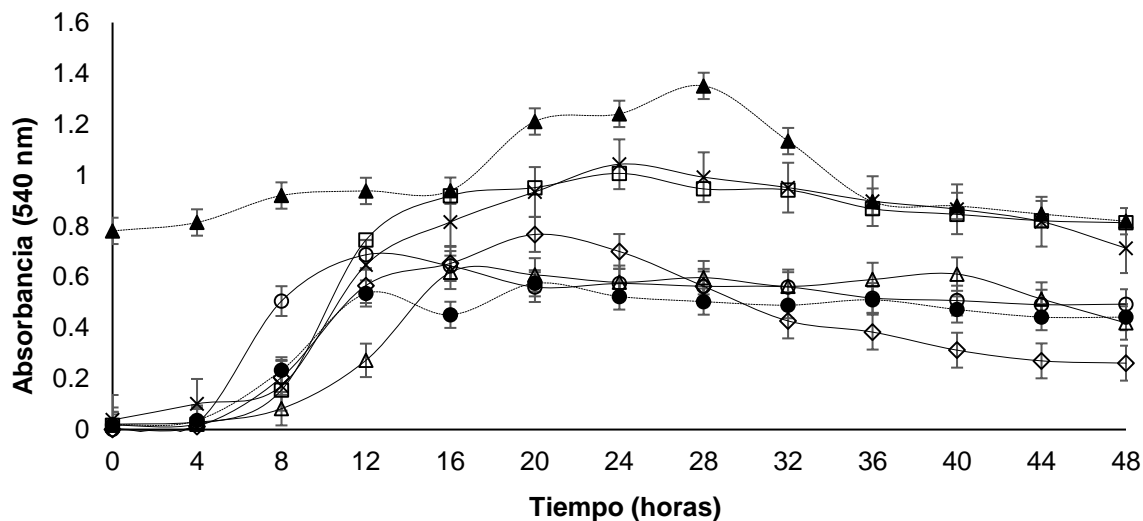


Figura 7. Cinética de crecimiento de BAL en medio MRS, 37°C y 15% de CO₂.

L. *acidophilus* A12 (triángulo lleno), B) *L. casei* V12(círculo lleno), C) *L. fermentum* A3 (triángulo vacío), D) *E. durans* A4 (círculo vacío), E) *E. italicus* V6 (rombo vacío), F) *Streptococcus S1* A5 (cuadrado vacío) y G) *Streptococcus S2* A6 (cruz).

12.3 Tolerancia a la acidez con diferentes valores de pH

La viabilidad de las cepas analizadas en un periodo de incubación de 4 horas en los medios de cultivo ajustados a diferentes valores de pH fue variable (Tabla 3, Figura 8). La comparación entre medias de la viabilidad de las cepas mediante análisis estadísticos (Anexo III), permitió clasificarlas en cuatro grupos A, B, C y D. El grupo A estuvo conformado por las cepas A3 y A6 las cuales mostraron la viabilidad esperada para una bacteria probiótica (10^6 UFC/mL) en todos los valores de pH probados; el grupo B conformado por las cepas A4, A5 y V12, no fueron capaces de alcanzar la viabilidad esperada para el valor de pH 2, el grupo C, conformado por la cepa V6, no fue capaz de alcanzar la viabilidad esperada a valores de pH de 2 y 3; finalmente el grupo D, integrado por la cepa V12 no alcanzó la viabilidad esperada a valores de pH 2,3 y 4 y a valores de 5,6 y 7 apenas alcanzó la viabilidad esperada; este resultado fue inesperado, ya que es una cepa que se encuentra como ingrediente de un producto comercial (Pediasure®) en el que se ostenta como microorganismo probiótico. Los resultados obtenidos coinciden con la mayoría de los reportes sobre caracterización probiótica en los que se menciona que pocos géneros de BAL, entre ellas *Lactobacillus* y *Enterococcus*, pueden resistir ambientes con valores de pH de 2 a 3 con tiempos de exposición de 3 h (Abosereh *et al.*, 2016). Una de las características de los microorganismos probióticos es la capacidad que tienen para resistir las condiciones del estómago (pH <3), permanecer viables hasta el final del vaciamiento gástrico (90 minutos) y continuar con el proceso digestivo hasta llegar al intestino grueso en donde ejercen los efectos benéficos para el huésped (Rodríguez-Guerrero y Guerrero Beltrán 2010).

Tabla 3. Viabilidad de las BAL de estudio a diferentes valores de pH.

Clave	Cepas	Carga inicial log UFC/mL	Viabilidad final (log UFC/mL)					
			pH					
			2	3	4	5	6	7
* ^d A12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	9.07	2.1±0.4	5±0.7	5.3±1.3	6±1.3	6.1±0.7	6.1±1.2
* ^b V12	<i>Lactobacillus casei</i>		4.4±0.1	8.7±0.7	8.7±0	8.7±0.1	10.7±0.8	10.4±0.6
* ^a A3	<i>Lactobacillus fermentum</i>		6.4±0.7	8.2±0	9±0.6	10.1±0.9	10.2±0	10.4±0.7
* ^b A4	<i>E. durans</i>		5.3±0.06	8.7±0.6	9±0.2	9.6±0.1	9.7±0.6	9.7±0.7
* ^c V6	<i>E. italicus</i>		2.9±0	5.8±0.8	6±0	7.4±0.7	8.3±0.2	8.2±0.06
* ^b A5	<i>Streptococcus S1</i>		3.9±0	8.3±0.1	7.4±0.6	7.2±0.4	10±0	10±0
* ^a A6	<i>Streptococcus S2</i>		7.8±0.6	9±0.5	9±0.4	10.1±0.1	10.4±0.8	11.8±0.6

*Las cepas que no comparte una letra son significativamente diferentes

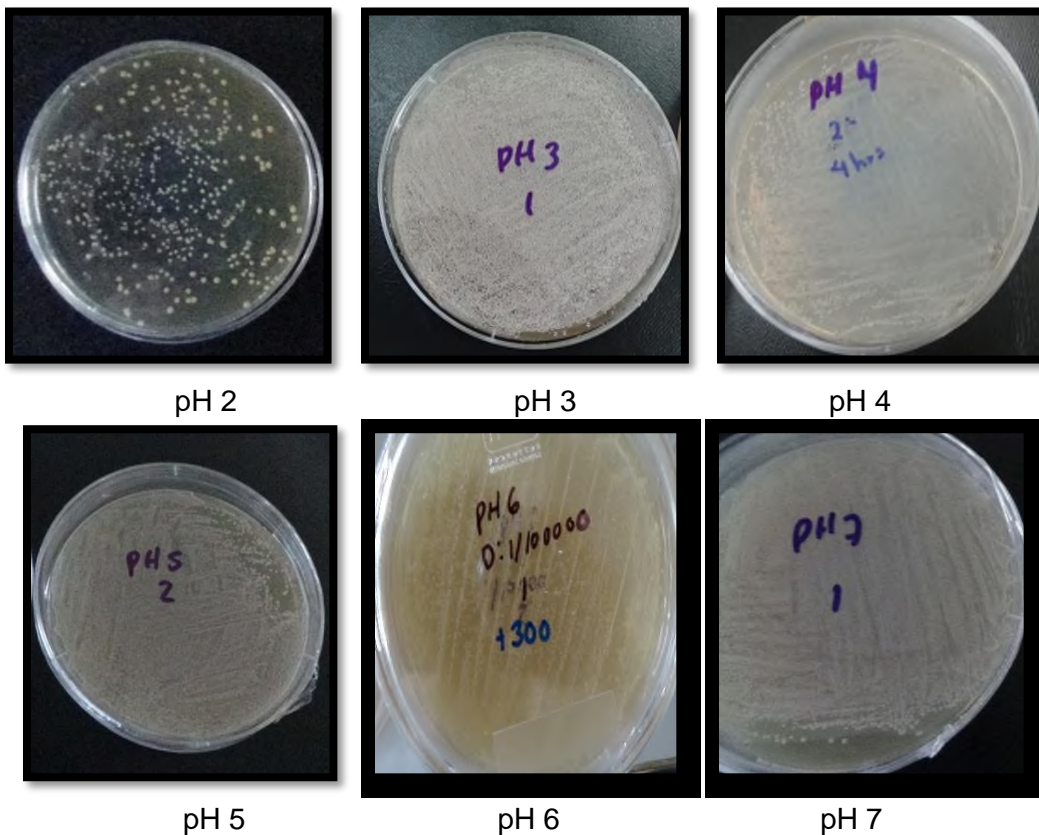


Figura 8. Sobrevivencia de *Lactobacillus* a diferentes valores de pH.

En esta prueba se pudo demostrar que cepas de *Lactobacillus* (A3) y *Streptococcus* (A6) fueron capaces de mantenerse viables a valores de pH 2 y 3 con un tiempo de exposición de 4 h, por lo que estas cepas podrían fácilmente soportar la barrera gástrica y mantenerse activas en el huésped. Las cepas A3, A4, A5, A6 y V12 mostrando un aumento en la biomasa con respecto al inóculo inicial, a partir de valores de pH de 5 y 6. Se ha observado que con un medio de cultivo rico en azúcares ajustado a valores de pH entre 4 y 7 se favorece el crecimiento de las BAL (Agudelo *et al.*, 2010).

12.4 Tolerancia a las sales biliares

La viabilidad de todas las cepas disminuyó conforme aumentó la concentración de bilis en el medio de cultivo (Tabla 4, Figura 9). Las cepas que alcanzaron una viabilidad de 10^6 UFC/mL o mayor a ésta, a concentraciones de sales biliares de 0.5 y 1%, fueron V12, A4, A5 y A6. Por su parte, para concentraciones de 2 y 3% de sales de bilis, las cepas que alcanzaron la viabilidad esperada fueron V12, A4 y A5. Finalmente, las cepas A12 y A3 tuvieron las concentraciones celulares más bajas para todos los porcentajes de sales biliares.

Tabla 4. Viabilidad de las BAL de estudio a distintas concentraciones de sales biliares.

Clave	Cepas	Carga inicial log UFC/mL	Viabilidad final (log UFC/mL) Sales biliares			
			0.5%	1%	2%	3%
* ^d A12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	9.07	3.6±1.3	0.2±0.6	0	0
* ^b V12	<i>Lactobacillus casei</i>		7.7±0.5	7.4±0.5	6.6±0.5	6.5±0.5
* ^b A3	<i>Lactobacillus Fermentum</i>		5.1±0.4	5±0.6	4.2±0.3	4.2±0.1
* ^a A4	<i>Enterococcus durans</i>		8.8±0.7	8.8±0.6	8±0.4	7.9±0.9
* ^b V6	<i>Enterococcus italicus</i>		5.8±0.5	5.2±0.5	4.8±0.5	2.4±0.5
* ^b A5	<i>Streptococcus (S1)</i>		8.6±0.5	8.3±0.3	7.6±0.4	6.4±0.1
* ^c A6	<i>Streptococcus (S2)</i>		7.7±0.3	7±0.4	0	0

*Las cepas que no comparte una letra son significativamente diferentes

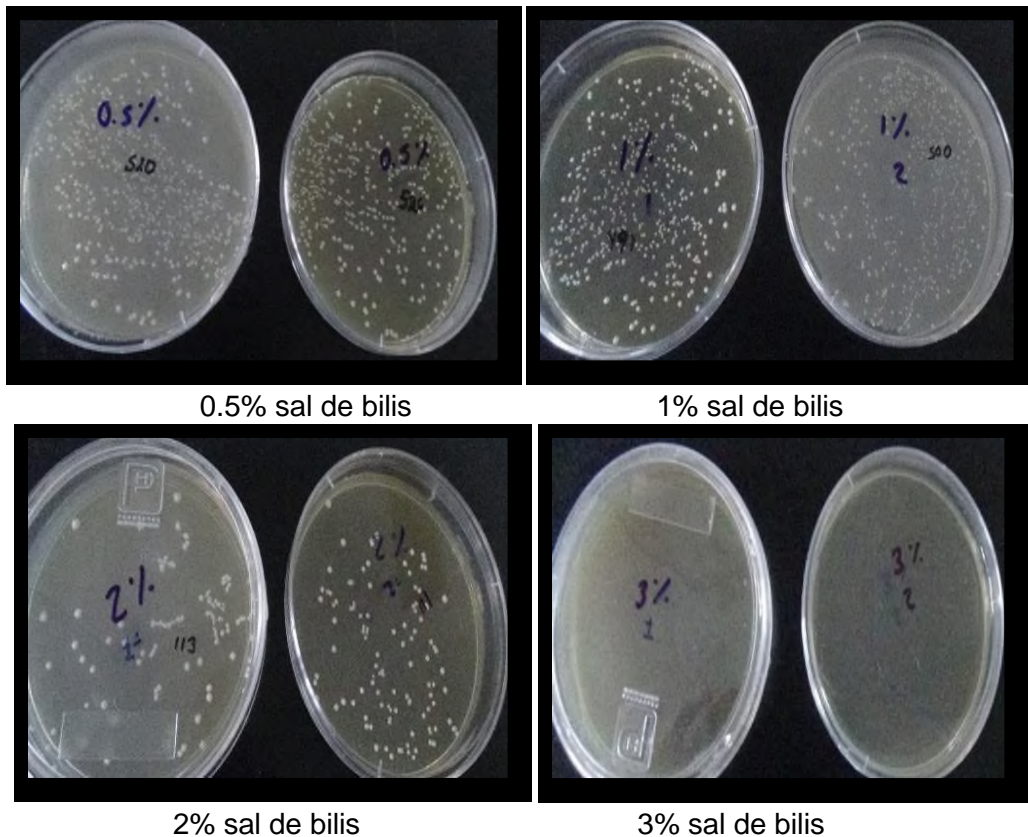


Figura 9. Sobrevivencia de *Enterococcus* a diferentes concentraciones de sales biliares

Los análisis estadísticos (Anexo IV) de la comparación de medias de la viabilidad obtenida después de 4 h de exposición de las cepas a medio MRS con diferentes concentraciones de sales biliares, obtuvieron cuatro grupos, A, B, C y D. En el grupo A, las cepas A4, A5 y V12 mostraron resultados de viabilidad mayores a 10^6 UFC/mL en todos los porcentajes de sales biliares analizados. El grupo B estuvo conformado por las cepas A3 Y V6. Que sobrevivieron a todas las concentraciones biliares analizadas, sin alcanzar la viabilidad esperada (10^6 UFC/mL); en el grupo C se encontró la cepa A6, que alcanzó la viabilidad esperada a concentraciones de sales biliares de 0.5 y 1%; sin embargo, a 2 y 3% no logró sobrevivir. Finalmente, la cepa A12 (grupo D), no sobrevivió a concentraciones de 2 y 3%, ni obtuvo la viabilidad esperada en el resto de las concentraciones de sales biliares analizadas.

Diversos estudios han reportado el crecimiento de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *L. fermentum* en concentraciones de bilis de 0.1 al 0.3%, a partir de una carga inicial de 10^7 UFC/mL hasta una carga final de 10^9 UFC/mL. Bajo las condiciones de este trabajo, no se observó crecimiento a partir del inóculo inicial (Zamudio y Zavaleta, 2003; Ávila *et al.*, 2010; Mantilla y Burgos, 2012); sin embargo, más del 50% de las cepas analizadas obtuvieron la viabilidad esperada de un microorganismo probiótico a porcentajes de 2 y 3% de sales biliares.

Actualmente en los estudios de caracterización, incluyendo el presente trabajo, se evalúa la tolerancia de las BAL frente a la exposición de las sales biliares en concentraciones que van desde 0.1% hasta 40% (Erkkilä y Petäjä, 2000; Díaz *et al.*, 2004; Pennacchia *et al.*, 2004; Castorena, 2014; Torres *et al.*, 2017), lo que no toman en cuenta los autores, es que en general el cuerpo humano produce aproximadamente entre 200 y 600 mg de bilis de los cuales, los ácidos biliares representan el 13.3% (o más dependiendo de cada persona y el tipo de alimentación) que el cuerpo utiliza durante el proceso de digestión (Hofmann, 1999; Briozzo *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2009), sin embargo algunos trabajos mencionan que el rango de concentraciones de bilis en el intestino oscila entre 0.15, 0.30 y 0.5% (Gilliland *et al.*, 1984; García-Ruiz *et al.*, 2014; Zea, 2014). En este trabajo se

probaron concentraciones entre 0.5 y 3%, observando una viabilidad adecuada para la mayoría de las cepas pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus* (V12), *Enterococcus* (A4) y *Streptococcus* (A5 y A6), evidenciando su tolerancia frente a la barrera de vaciamiento biliar y su capacidad de supervivencia.

12.5 Inhibición de patógenos intestinales

Los resultados de la actividad antagonista de las BAL frente a microorganismos patógenos se presentan en la Tabla 5. Las cepas A5 y A6 pertenecientes al género de *Streptococcus* fueron capaces de inhibir a todas las cepas patógenas analizadas, mientras que las cepas A3 y A4 de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* inhibieron el crecimiento de 4 de las 5 cepas patógenas. Por su parte las cepas control, A12 y V12, ambas del género *Lactobacillus* impidieron el crecimiento de 3 cepas patógenas. Finalmente, la cepa V6 (*Enterococcus*) fue capaz de inhibir solo 2 cepas patógenas. Se pudo determinar que las cinco cepas de BAL, incluidas las dos cepas control, fueron capaces de inhibir al menos dos especies de bacterias patógenas (Figura 10).

Tabla 5. Actividad antagonista de las cepas de estudio frente a microorganismos patógenos.

Clave	Diámetro de inhibición (mm)				
	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A12	14±0.4	11±0.1	0	0	11±0.1
V12	12±0	10±0.06	11±0.06	0	0
A3	14±0.1	10±0.06	11±0.06	10±0.1	0
A4	14±0.1	10±0.06	13 ±0.3	0	11±0.06
V6	0	0	0	11± 0.1	21±0.1
A5	10±0.1	14±0.06	13±0.2	12±0.06	10±0.06
A6	21±0.3	7±1.1	7±0.6	15±0.06	11±0.1

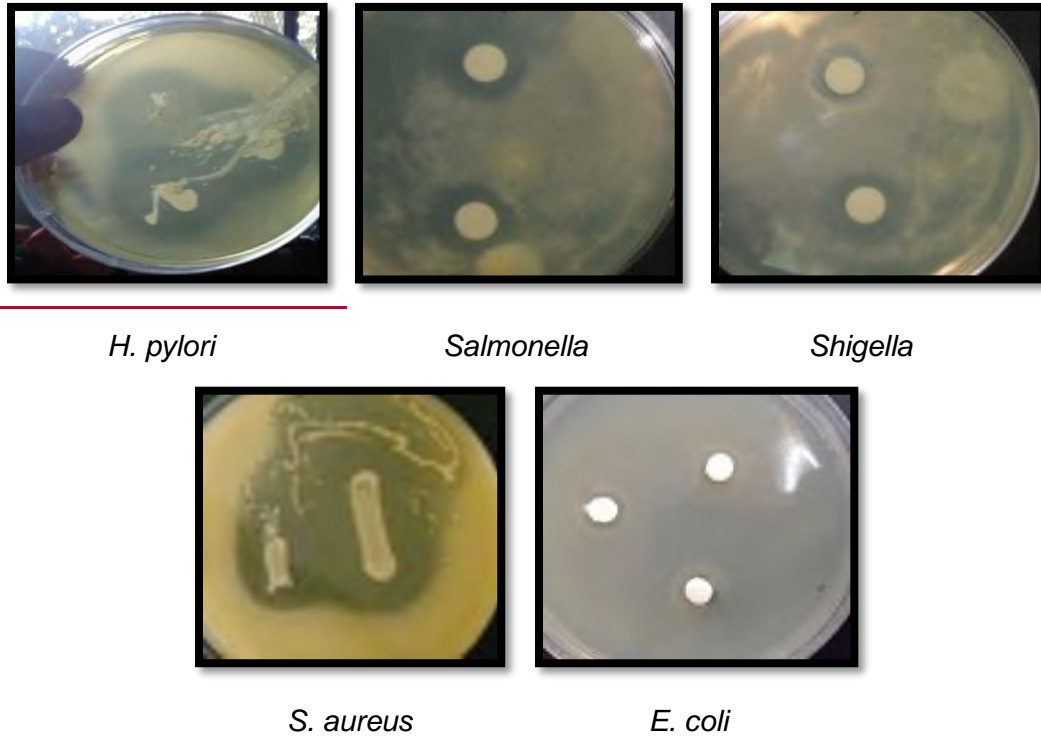


Figura 10. Prueba de inhibición de patógenos por cepas de *Streptococcus*.

En este sentido, existen numerosos estudios *in vitro* que han demostrado que bacterias del género *Streptococcus* tienen la capacidad de interferir en el crecimiento de una gran variedad de patógenos intestinales de importancia clínica en el ser humano, debido a la producción de ácido láctico y otras sustancias como hemolisinas y peróxido de hidrógeno que provocan la muerte de estos microorganismos (Montes *et al.*, 2006). Xingyang *et al.* (2017) reportaron 12 cepas pertenecientes a las especies de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus acidilactici* y *Enterococcus faecium* aisladas de queso artesanal chino con actividad inhibitorio para microorganismos como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolítica*, *C. perfringens* y *E. coli*, debido a la producción de ácido láctico, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas. Por otro lado, Vélez *et al.* (2014) evaluaron la actividad antagonista de BAL aisladas del calostro de cerdas, frente a un patógeno entérico como *Salmonella typhimurium*, mostrando halos de inhibición alrededor de los 7mm de diámetro, cabe destacar que las cepas de BAL fueron seleccionadas para la prueba de inhibición por que mostraron resistencia y viabilidad a condiciones como

jugo gástrico y pancreático, pH y concentraciones de sales biliares al igual que en este trabajo. Otros trabajo similar fue el descrito por De Angelis, *et al.* (2006) quienes comprobaron la inhibición de *Salmonella typhimurium* además de otros microorganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Listeria innocua* cuando fueron expuestos a extractos libres de células de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus platarum* y *Lactobacillus rossiae*, cepas heterolácticas aisladas de heces de cerdos, las cuales también mostraron tolerancia a las condiciones intestinales previo a la prueba de inhibición. La capacidad antagonista de las bacterias ácido lácticas depende del tipo de cepa utilizada y su metabolismo que puede ser homofermentativo o heterofermentativo, éste último tienen una mayor ventaja, debido a los diferentes metabolitos que se producen durante el crecimiento del microorganismo (Muñoz *et al.*, 2011). Las cepas de *Streptococcus* presentaron un mayor número de microorganismos inhibidos, atribuido probablemente a su metabolismo heterofermentativo, lo cual le otorgaría una ventaja adaptativa en un ambiente gastrointestinal.

12.6 Resistencia a antibióticos

En la Tabla 6, Figura 11 se muestran los resultados de la resistencia de las cepas de BAL en presencia de 4 antibióticos de uso común. Se observó que para la ampicilina la mayoría de las cepas fueron sensibles con diámetros entre 20 y 35 mm, con excepción de las cepas A3 y A6 que presentaron diámetros menores, clasificándolas como intermedias. Para el fármaco ciprofloxacino, cuatro (A5, A12, V6 y V12) de las siete cepas fueron sensibles y el resto (A3, A4 y A6) fueron intermedias. Con dicloxacilina las cepas A3, A4, A5 y A6 fueron intermedias; y A12, V6 y V12 sensibles. Finalmente, con trimetoprima se observaron las cepas A3 y V6 sensibles, A6 intermedia mientras que A4, A5 y V12 resistentes.

Tabla 6. Prueba de sensibilidad y resistencia de BAL frente antibióticos de uso común: A (ampiciliana), C (ciprofloxacino), D (dicloxacilina) y T (trimetroprima).

Claves	Cepas	Diámetro de inhibición (mm)			
		A 15mg/mL	C 15mg/mL	D 15mg/mL	T 25mg/mL
A12	<i>L. acidophilus</i>	35±0.2 (S)	25±0.3 (S)	30±0.3 (S)	10±0.9 (R)
V12	<i>L. casei</i>	25±0.2 (S)	20±0.06 (S)	22±0.06 (S)	0 (S)
A3	<i>L. fermentum</i>	16±0.06 (I)	15±0.06(I)	11± 0.1 (I)	21±0.06 (S)
A4	<i>E. durans</i>	22± 0.1 (S)	15±0.2 (I)	13±0.06 (I)	10±0.1 (R)
V6	<i>E. italicus</i>	25±0.2 (S)	24±0.06 (S)	22±0.06 (S)	20±0.1 (S)
A5	S. (S1)	20±0.2 (S)	25±0.1 (S)	15±0 (I)	10±0.1 (R)
A6	S. (S2)	16±0.06 (I)	14±0.6 (I)	16±0.6 (I)	16±0.6 (I)

Los resultados encontrados fueron variables, esto pudo deberse en gran medida al grupo de bacterias utilizadas siendo las enterobacterias, bacilos gram negativos, estafilococos, enterococos y pseudomonas, los géneros que tienen mayor susceptibilidad de presentar resistencia (López-Velandia *et al.*, 2016). La presencia de resistencia a ciertos fármacos puede estar relacionada a diversos factores como: la concentración del fármaco, su velocidad de absorción en el medio, el tiempo de vida media que presenta o bien los mecanismos ya sea cromosómicos o plasmídicos desarrollados por las bacterias resistentes (Morales-Pérez y García-Milian, 2017). Existen muy pocos estudios que comprueban los mecanismos asociados a este fenómeno; sin embargo, algunos estudios *in vitro* han podido dar algún acercamiento de las cepas más susceptibles a desarrollar resistencia. Por ejemplo, Coppola *et al.* (2005), quienes mostraron que ciertas especies de *Lactobacillus* presentaron resistencia para múltiples antibióticos entre ellos trimetroprima, atribuida a una condición genética propia del género. En el 2010, Chávez-Valencia, encontró para diferentes aislados clínicos de *Enterococcus* la presencia de multiresistencia a diversos fármacos como tetraciclina, ciprofloxacino,

piperacilina/tazobactam y nitrofurantoína, se sabe que la resistencia de este género se dirige principalmente hacia las fluoroquinolonas presentando sensibilidad para ampicilina o vancomicina, debida a un tipo de resistencia adquirida como consecuencia del uso indiscriminado antibióticos. Uno de los requisitos fundamentales que deben de cumplir las bacterias benéficas o probióticas, es no presentar resistencia a los antibióticos, porque existe el riesgo de la transferencia de genes de resistencia antimicrobiana a bacterias patógenas que estén presentes en el TGI del huésped (Sanz *et. al.*, 2003). En este estudio se puede observar resistencia para tres cepas de los diferentes géneros (*Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*), sin embargo, al ser aislados de una fuente segura, los parámetros del riesgo en el uso de estas cepas sólo podría corroborarse con una evaluación con métodos más específicos como las técnicas moleculares (PCR), *microarrays*, espectrometría de masas MALDI-TOF, citometría de flujo, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, microfluidos y métodos de lisis bacteriana (March-Rosselló, 2016). Al final de la prueba todas las cepas que obtuvieron la clasificación de intermedias se clasificaron como sensibles.

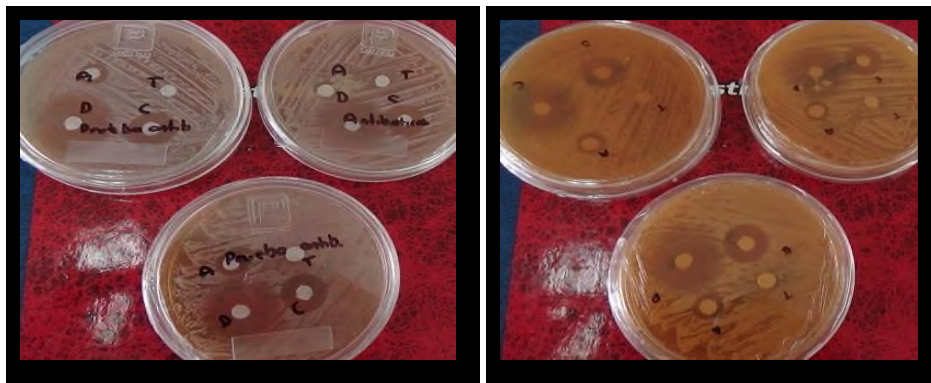


Figura 11. Sensibilidad de las BAL frente a antibióticos de uso común A: ampicilina
C: ciprofloxacino, D: dicloxacilina, T: trimetoprima

12.7 Prueba de acidificación en leche

Los resultados de la evolución del pH con respecto al tiempo y los porcentajes de acidificación en leche para cada una de las cepas probadas se muestran en la Figura 12 y Tabla 7. Se pueden observar diferencias significativas en el tiempo de acidificación de cada BAL hasta la obtención de un pH menor a 4.6 (Vargas-Uscategui *et al.*, 2015).

Tabla 7. Disminución de pH y porcentaje de acidificación de las cepas lácticas de estudio.

Clave	Cepas	pH tiempo 0 h	pH tiempo 24 h	% Acidez	Tiempo de fermentación (pH<4.6)
* ^a A12	<i>L. acidophilus</i>	6.45	6.23	0.43 ± 0.1	24 h
* ^b V12	<i>L. casei</i>	6.46	5.02	0.85 ± 0.1	24 h
* ^b A3	<i>L. fermentum</i>	6.47	5.33	0.54 ± 0.1	24 h
* ^b A4	<i>E. durans</i>	6.46	5.30	0.50 ± 0.1	24 h
* ^b V6	<i>E. italicus</i>	6.46	5.23	0.67 ± 0.1	24 h
* ^b A5	<i>Streptococcus (S1)</i>	6.49	5.14	0.61 ± 0.1	24 h
* ^c A6	<i>Streptococcus (S2)</i>	6.43	4.46	1.03 ± 0.1	16 h

*Las cepas que no comparte una letra son significativamente diferentes

Las cepas se agruparon en tres grupos A, B y C en función del pH de la leche alcanzado en un periodo de 24 h, siendo el grupo A conformado por la cepa A12 con un pH de 6.23; el grupo B integrado por las cepas A3, A4, V6, A5 y V12 con valores de 5.33, 5.3, 5.23, 5.14, 5.02 respectivamente; y finalmente el grupo C con la cepa A6, la cual fue capaz de alcanzar el pH de referencia (4.6) a las 16 h. Con respecto a los porcentajes de acidez, las cepas fueron clasificadas en dos grupos, el grupo A con la cepa A6 presentó el mayor porcentaje de acidez de 1.03% y el grupo B agrupando a todas las cepas restantes (Figura 12B)

Los parámetros de fermentación con microorganismos como cultivos iniciadores en productos lácteos sustrato para el mejor crecimiento de BAL según Arenas-Suescún, (2002), son: capacidad de crecimiento, acidificación, síntesis de compuestos antimicrobianos y producción de exopolisacáridos en un tiempo de 24 h. Un estudio con tiempos de fermentación encontrados dentro de este rango se observó con Simanca *et al.* (2010), quienes reportaron durante la fermentación de suero costeño con especies de *Enterococcus* tiempos de 12 h con la obtención de

valores de pH menor a 4.6, y para *Lactobacillus* tiempos de 18 h con pH menor a 6.17. Éstos valores fueron observados al utilizar cepas individuales durante la fermentación de productos lácteos al igual que en este estudio (Figura 12). Además, se observó que para alcanzar el pH de referencia (4.6) (Vargas-Uscategui *et al.*, 2015); la mayoría de las BAL evaluadas obtuvieron tiempos de fermentación mayores a 24 h excepto la cepa A6 siendo la cepa con menor tiempo (16 h, Figura 12 A, Tabla 7).

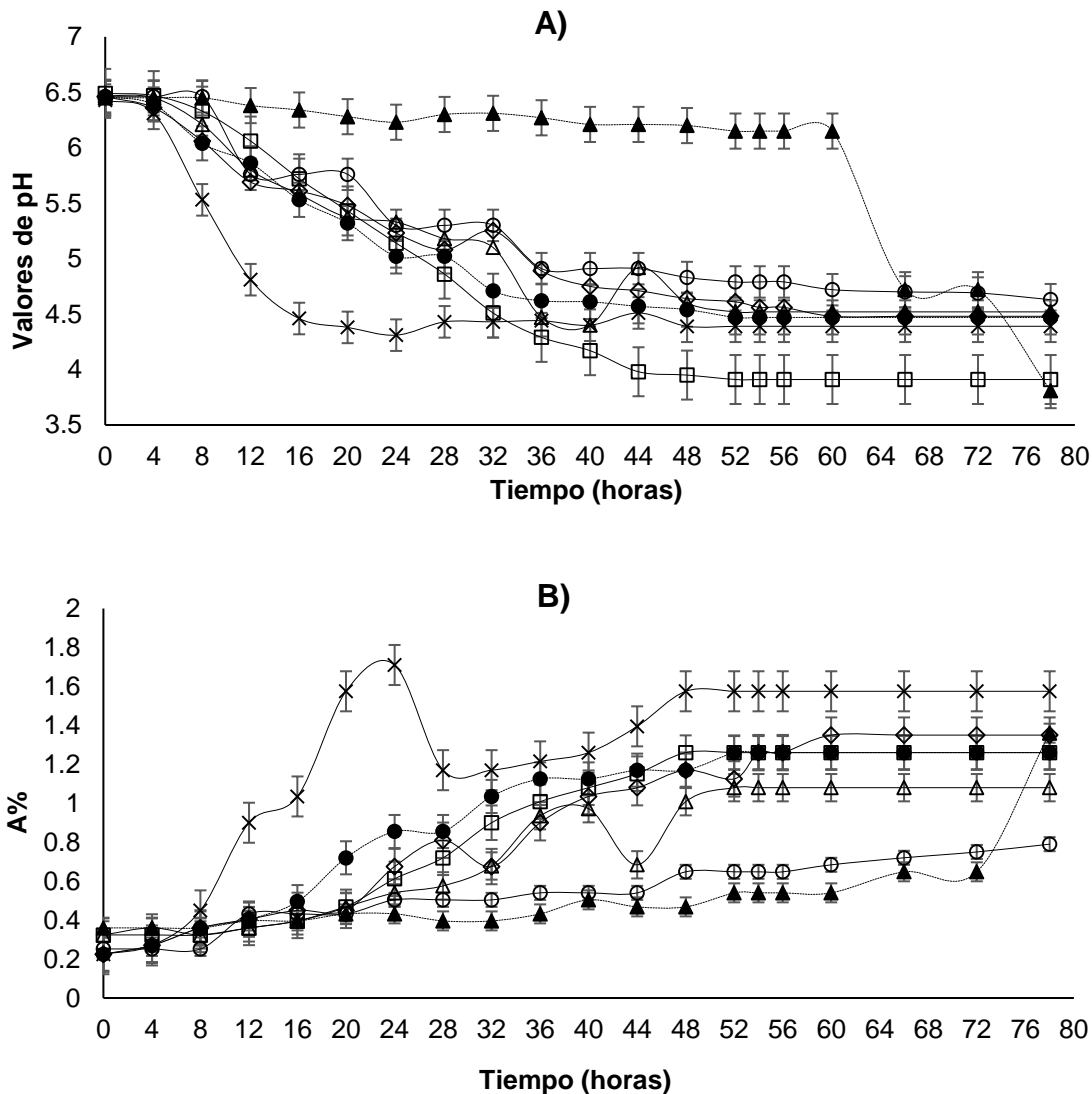


Figura 12. A) Disminución de pH y B) Porcentaje de acidez con respecto al tiempo cuando se utiliza como cultivo iniciador: *L. acidophilus* A12 (triángulo lleno), B) *L. casei* V12 (círculo lleno), C) *L. fermentum* A3 (triángulo vacío), D) *E. durans* A4 (círculo vacío), E) *E. italicus* V6 (rombo vacío), F) *Streptococcus* S1 A5 (cuadrado vacío) y G) *Streptococcus* S2 A6 (cruz).

Por otro lado, los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores en productos lácteos como el yogurt y leches fermentadas son bacterias pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* las cuales se desarrollan en simbiosis, generando ácido láctico y reduciendo el pH del medio favoreciendo la coagulación de las proteínas y dando textura al producto por la producción de exopolisacáridos. Existen diversos estudios que comprueban que la mezcla de diferentes BAL acelera los tiempos de fermentación causando una rápida disminución del pH correlacionado con el aumento de la acidez (Leroy y De Vuyst, 2004; León *et al.*, 2006; Rivas y Garro, 2006; Saucedo-Briviesca *et al.*, 2017). Jurado-Gómez *et al.* (2016) reportaron porcentajes de ácido láctico de 1.8 % producidos por *L. plantarum* durante 24 h de fermentación en caldo MRS, sin embargo, en productos de consumo diario como el yogurt se han encontrado valores entre 0.24% para los yogures asentados y 0.74% para los batidos, siendo 0.7% el valor mínimo de referencia emitida por la FAO/OMS (2002) para productos lácteos fermentados, en este estudio se encontraron dos cepas que superaron este porcentaje, V12 (0.85%) y A6 (1.03%). Por lo tanto, en función de los resultados del pH y porcentaje de acidificación de la leche la cepa A6 podría ser utilizada como cultivo iniciador.

12.8 Viscosidad

Los valores de viscosidad obtenidos al finalizar la fermentación de la leche se encuentran resumidos en la Tabla 8. En ésta se muestran diferencias significativas en los valores de viscosidad obtenidos por cada cepa individualmente por lo que fueron clasificadas en 6 grupos A, B, C, D, E y F de acuerdo de mayor a menor viscosidad. El grupo A integrado por la cepa A4 presentó la mayor viscosidad de 723.2 cP, seguido del grupo B conformado por las cepas V6 y A5 con viscosidades de 630.8 y 605.3 cP respectivamente; el grupo C con la cepa A6 mostró un valor de 577.6 cP; el grupo D con la cepa V12 y un valor de viscosidad de 452.4 cP; y por último el grupo E con la cepa A12 y 33 cP.

Tabla 8. Viscosidad de leche fermentada con bacterias ácido lácticas.

Clave	Cepas	% Torque	Viscosidad (cP)
* ^f A12	<i>L. acidophilus</i>	0.1	33.5± 1.4
* ^d V12	<i>L. casei</i>	56.7	452.4± 4.2
* ^e A3	<i>L. fermentum</i>	33.3	271.7± 12
* ^a A4	<i>E. durans</i>	90.4	722.5± 1.9
* ^b V6	<i>E. italicus</i>	78.8	630.8± 3.1
* ^b A5	<i>Streptococcus (S1)</i>	79.9	605.3± 30.7
* ^c A6	<i>Streptococcus (S2)</i>	74.1	577.6± 17.5

*Las cepas que no comparte una letra son significativamente diferentes

El inoculo inicial de cada cepa se llevó a una concentración de 10⁸ UFC/mL

La viscosidad es un factor deseable en la mayoría de los productos como el yogurt, consecuente del proceso de acidificación, que surgen de la interacción sinérgica de bacterias utilizadas como cultivos iniciadores (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Diversos estudios reportan que los factores como la coagulación de las proteínas por la disminución del pH, la producción de polisacáridos extracelulares de alto peso molecular, la cantidad de sólidos libres presentes en el sustrato y la temperatura de fermentación contribuyen a un aumento en los niveles de viscosidad (Quicazán *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2003; Rivas y Garro, 2006; Betancourt *et al.*, 2014 y Rivera-García *et al.*, 2017). Por tal motivo se podría suponer que el tipo cultivo iniciador utilizado (cultivos mixtos o de cepa única), las concentraciones bacterianas suplementadas y su metabolismo fermentativo afectan de igual forma la viscosidad. Rojas-Castro *et al.* (2007), reportaron que con una mezcla de bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus* utilizadas durante la elaboración de yogurt con leche de cabra y vaca, viscosidades de 11277-19979 cP respectivamente; estos resultados coinciden con los valores encontrados en el rango de 10000 y 20000 cP descritos por Rivera-García *et al.* (2016) para leche de vaca utilizando cepas de los mismos géneros sugiriendo el uso de este sustrato para la obtención de una mejor viscosidad. Esta elevación en la viscosidad es reportada por la combinación de bacterias que presenten compatibilidad, una buena

capacidad acidificante, actividad proteolítica, lipolítica y producción de exopolisacáridos (Blanco, 2015). Es importante mencionar que aún no hay un valor estándar en cuanto a la viscosidad que deben presentar la leche fermentada. (Uribe *et al.*, 2008). Por otra parte, los valores reportados en los trabajos donde se utilizan cultivos mixtos, sobrepasan a los obtenidos en el presente estudio (Tabla 8) en el que se usaron cepas de forma individual; sin embargo, estos resultados podrían elevarse al combinarse las cepas que presentaron los mejores valores de viscosidad (A4, A5 y V6). Los resultados de disminución de pH, porcentajes de acidificación y viscosidad para las cepas control A12 y V12 fueron menores que algunas de las cepas analizadas, lo cual era de esperarse debido a que estas bacterias están caracterizadas para su uso como probióticos. Sin embargo, estos resultados pueden marcar una pauta para el uso de combinaciones utilizando las cepas que presentaron los mejores resultados de acidificación y viscosidad.

XIV. Conclusiones

Para la prueba de resistencia a diferentes valores de pH se comprobó que de las BAL evaluadas el 29% (A6, A3) fueron capaces de alcanzar la viabilidad esperada para todos los valores de pH.

En la prueba de tolerancia a sales biliares se determinó que el 14% (A4) de las cepas evaluadas fueron capaces de alcanzar la viabilidad esperada para todas las concentraciones de sales biliares.

Se pudo observar que en la prueba de inhibición a patógenos el 40% de las BAL (A5 y A6) fueron capaces de disminuir el crecimiento de cinco bacterias patógenas, 40% (A3 y A4) el de 4 bacterias patógenas y por último 20% (V6) inhibió sólo 2 bacterias patógenas.

La mayoría de las BAL presentaron sensibilidad frente antibióticos de uso común, sin embargo, 40% (A4 y A5) de ellas presentaron resistencia a Trimetroprima.

La acidificación de la leche de las cepas A6 y A4, obtuvieron los valores más altos en cuanto a disminución de pH, acidificación y viscosidad, demostrando así su potencial uso como posibles cultivos iniciadores.

La cepa A6 cumplió con todas las características evaluadas para su uso como potencial probiótico y cultivo iniciador.

XIV. Perspectivas

- Realizar otras pruebas de caracterización probiótica, como de autoagregación donde se mide la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal y células epiteliales, relacionada con los componentes de la superficie celular de las bacterias, las cuales determinarán su buena adaptación y prolongación de tiempo en el sitio de acción para ejercer sus efectos benéficos
- Pruebas de metabolismo donde se mida la capacidad de reducción de colesterol, asociada a la actividad proteolítica y lipolítica, las cuales son características ligadas a la degradación de moléculas complejas a otras más simples para obtención de energía y alimentación.
- Realizar pruebas implicadas en la reducción de agentes patógenos como la capacidad hemolítica, producción de peróxido de hidrógeno y CO₂ las cuales ejercen efectos de rompimiento de membrana celular y citotóxicos.
- Realizar estudios de simulación gastrointestinal y disminución de bacterias patógenas *in vivo* en animales como ratones y conejos, para evaluar la efectividad del uso de las BAL que mostraron los mejores resultados en las pruebas de caracterización probiótica (cepa A6).
- Realizar pruebas de compatibilidad entre las cepas A6 y A4 para ser utilizadas como potenciales cultivos iniciadores, evaluando la acidificación y viscosidad.
- Realizar estudios fisiológicos de producción de exopolisacáridos y actividad proteolítica de las cepas A6 y A4.
- Evaluar las posibles combinaciones y simbiosis de las cepas A6 y A4 con otros cultivos iniciadores comerciales.

XVI. Bibliografía

Abosereh, A. Salem A., Gomaa R. and Mohamed T. Fouad, (2016). Molecular Identification of potential probiotic lactic acid bacteria strains isolated from egyptian traditional fermented dairy products. *Biotechnology*, 15: 35-43.

Abriouel H., Nabil B. O., López R.L., Gálvez A. (2008). La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. *Anales* - Vol. 21 (1).

Aburjaile, F. F. (2015). *Mécanismes moléculaires de la survie à long terme chez Propionibacterium freudenreichii* (Doctoral dissertation, Agrocampus Ouest).

Acevedo, D., Guzmán, L., y Rodríguez, A. (2013). Fermentation kinetics for the production of suero costeño. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 16(2), 427-433.

Affhan, S., Dachang W., Xin Y. and Shang D. (2015). Lactic acid bacteria protect human intestinal epithelial cells from *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Genet. Mol. Res.* 14 (4): 17044-17058.

Agudelo C., Ortega R., Hoyos J. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas del yogurt. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8 (2): 8-16 p.

Ahrné S., Lönnermark E., Wold A.E., Aberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegård I.L., Molin G., Adlerberth I. (2005). *Lactobacilli* in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect.* ;7 (11-12): 1256-62.

Amores, R., Calvo A., Maestre J.R., y Martínez-Hernández D. (2004). Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap.*, Vol. 17 (2) 131-139.

Amorocho, C.M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. *Universitat Politècnica de València*. 267 p.

Arenas-Suescún, C., Zapata-Fernández, R., Gutiérrez-Cortés, C. (2012). Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*) *vitae*, 19 (1), 276-278.

Argun, S., Kivanç M. and Yiğit T. (2016) Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterisation of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Experimental and therapeutic medicine* 12: 1732-1740.

Ávila J., Ávila M., Belizis T., Brizuela M., Perazzo Y. y Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica FCV-LUZ* vol. XX (2); 161-169.

Betancourt, S., Ayala, A., Ramírez, C. (2014). Efecto del proceso de fermentación con bacterias ácido lácticas sobre propiedades reológicas de masas de maíz QPM. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 17 (2): 503 – 511. 22.

Bravo, L; Correa, Y; Clausell, J; Fernández, A; Ramírez, M; Núñez, F; Ledo, Y; Cruz, Y. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Revista Chilena de Infectología* 26(3):233-238.

Briozzo, G., Perego, M.C. y González M.M. (2005). Valores de referencia de los ácidos biliares séricos en embarazadas del tercer trimestre. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá, Buenos Aires, Argentina* 24 (1), 7-11 pp.

Brunser, O. (2013). El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 40(3), 283-289.

Cabeza, E.A., (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España*. 12 p

Cabrera, Y. y Fadrugas, A. (2005). Probióticos y salud: una reflexión necesaria. *Rev. Cubana Med Gen Integr* 21 (3-4).

Campeotto, F., Waligora-Dupriet A., Doucet-Populaire F., Kalach N., Dupont C., Butel Marie-José. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né flore intestinale mise au point. *Gastroenterol Clin Biol*; 31 :533-542.

Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literatura survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28 (4): 281-370.

Castorena Alba, M. M. (2014). *Evaluación de la capacidad reductora de colesterol de cepas probióticas* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Chávez-Valencia, V., Gallegos-Nava, S., y Arce-Salinas, C. A. (2010). Patrones de resistencia antimicrobiana y etiología en infecciones urinarias no complicadas. *Gaceta médica de México*, 146(4), 269-273.

Chery, J., Dvoskin, D., Morato, F.P. y Fahoum, B. (2013). *Lactobacillus fermentum*, a pathogen in documented cholecystitis. *International journal of surgery case reports*, 4(8), 662-664.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85 (3), 193-204 pp.

Cueto, C., Aragón S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria* (1) 45 – 5.

Cueto-Vigil, M., Acuña-Monsalve Y., Valenzuela-Riaño J. (2010). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol* 32 (93): 129-138.

Curbelo, Y., García, Y., López, A. y Boucourt, R. (2005). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39(2).

Dawson P.A., Tian L. y Anuradha R. (2009). Bile acid transporters. Thematic Review Series: Bile Acids. *Journal of Lipid Research* Volume 50.

De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A. y Gobbetti, M. (2006). Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*. 157 (8): 792-801.

Delgado, S. (2005). Microbiótica intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas.

Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.

Durán-Quintana, M., Romero-Barranco, C., García-García, P., Brenes-Balbuena, M., y Garrido-Fernández, A. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa.

Erkkilä, S. y Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*, 55(3), 297-300.

Fabrice A., Brassart D., Grob P., Graf F. and Servin A. (2006). *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48 424–432.

Farnworth ER, Mainville I, Desjardins M, Gardner N, Fliss I, Champagne C.. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Inter J Food Microbiol*. 2007; 116: 174-181.

Feria, M. G., Taborda, N. A., Hernandez, J. C., & Rugeles, M. T. (2017). Efecto de la terapia con probióticos/prebióticos sobre la reconstitución del tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana-1. *Revista médica de Chile*, 145(2), 219-229.

Florez, J., Góngora, C., Pacheco, I., & Ortegón, L. (2014). Análisis de consumo de los alimentos funcionales, exploración de percepción de producto, marca y hábitos de consumo a partir de los cereales light. *Revista Libre*.

Frizzo L. S., Soto L. P., Bertozzi E., Sequeira, G., Marti, I. E. y Rosmini M. R. (2006). Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 5 (1-2).

Galarza, L. J. M. (2012). Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas.

García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. (2014). Evaluación de las propiedades probióticas de bacterias lácticas de origen enológico.

García Gómez, M.J., Del Moral Ventura, S.T., Nuñez Gaona, O., Ramírez Coutiño L.P. y Sachman-Ruiz, B. (2017). Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de suero fermentado de queso con potencial antimicrobiano. *Journal CIM, Coloquio de Investigación Multidisciplinaria, Ingeniería química* 4(2).

Gilliland, S. E., Staley, T. E., y Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *L. acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67, 3045–3051

González-Aguilar G., González-Córdova A. Álvarez-Parrilla E. Vallejo-Córdova B. (2014). Los alimentos funcionales: un nuevo reto para la industria de alimentos., AGT Editor, S. A. Progreso 202 - Planta Alta. Col. Escandón México, 11800, D. F. Primera edición. ISBN: 978-607-7551-37-9.

Guarner F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp.*; 22 (2): 14-9.

Hao Q., Lu Z., Dong B., Huang C., Wu T. (2011). Probióticos para la prevención de infecciones agudas de las vías respiratorias superiores. *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 9. Art. No.: CD006895. DOI: 10.1002/14651858.CD006895*

Hernández-Monzón, A., Torres-Herrera, A. Duarte-Garcia, C. y Rodríguez, D. (2016). Desarrollo de una leche fermentada de cabra con cultivos probióticos. *Tecnología Química, Universidad de Oriente Santiago de Cuba* 16 (3) 321-335.

Hinestroza-Córdova L. I. y López-Malo A. (2008). Técnicas encapsulación de microorganismos prebióticos con polímeros. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 2: 28-35.

Hofmann, A. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal

disease. Arch Intern Med. 159: 12 pp.

Icaza-Chávez, M.E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Rev. Gastroenterol. Méx. 78 (4), 240-248.

FAO/WHO Working Group. (2002). Guideling for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization.

Juárez Estrada A., Maldonado, Gutiérrez Ramírez L.A. y Montoya O. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.58, No.1. p.2601-2609.

Jurado, H. G, Aguirre D., Ramírez C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. Revista mvz córdoba, Volumen 14(2).

Jurado-Gámez H, Calpa-Yama F, Chaspuengal-Tulcán A. (2014). Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus* [In vitro determination of the probiotic *Lactobacillus plantarum* action on *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from *Cavia porcellus*. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. 61(3): 241-257.

Kainulainen, V., Reunanen J., Hiippala K., Guglielmetti S., Vesterlund S., Palva, A. and Satokaria R. (2013). BopA Does Not Have a Major Role in the Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Intestinal Epithelial Cells, Extracellular Matrix Proteins, and Mucus. Applied and Environmental Microbiology. Volume 79 Number 22.

Kenneth C., Charles E. (2006). Wine Microbiology Practical Applications and Procedures Springer Science y Busines Media, 394 p.

Kizerwetter-swida, M. and Binek M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. Polish Journal of Microbiology, Vol. 54, (4): 287-294.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. y Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 41: 103–125 pp.

Kozak, A. (1968). Contribución de la industria de alimentos balanceados para animales a la solución del déficit alimentario mundial. Universidad de Buenos Aires, Facultad de ciencias económicas. 344 p.

Laurencio-Silva, M., Arteaga, F., Rondón-Castillo, A.J., Ormaza, J., Pinto, J., Pazmiño, D. y Macías I. (2016). Potencial probiótico *in vitro* de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes de la vagina de vacas lecheras. Pastos y Forrajes, 40 (3): 206-212.

León, V., Totosa T., Guerrero A., Pérez -Chabela I. (2006). Efecto de bacterias ácido-lácticas termoresistentes en salchichas cocidas Ciencia y Tecnología Alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México; vol. 5 (2), 135-141 pp.

León, Á. M., Montoya, O. I., Motato, K. E., Granda, D. M., Caro, C. A., Restrepo, J. M. y Quinchía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae*, 13(2).

López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., y Prada-Quiroga, C. F. (2016). Resistance genes in gram negative bacilli: Impact on public health in Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190-202.

Lozada, A. E. (2001). The potential of the manipulation of intestinal flora by dietary means on human health. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 21(3), 106-114.

Macfarlane G.T., Gibson G.R. Drasor B.S. y Commings J.H. (1995). Metabolic significance at the colonic microflora. *Gastrointestinal and Oesophageal Physiology* 249-274 pp.

Macfarlane S. y Dillon J.F. (2007). Microbial biofilm in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1187-1196.

Mantilla, L., y Burgos P. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Manzano, C.A., Estupiñán G., Elpidia Poveda E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Rev Chil Nutr Vol.* 39, (1).

March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3): 182-188.

Martínez-López, V., Moral-Ventura, S.T.D., Sachman-Ruiz, B., Ramírez-Coutiño, L. P. y García-Gómez, M.D.J. (2016). Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado. *Nova scientia*, 8(17): 326-339.

Microbiología 671. (2008). Escala McFarland, Laboratorio clínicologo y biomédico de microbiología clínica. blog.

Montes, M. y García-Arenzana J.M. (2006). Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25: 14-20.

Monteagudo Mera, A. (2011). Selección *in vitro* de microorganismos con potencial probiótico.

Morales-Pérez, M., y García-Milian, A. J. (2017). Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. *Horizonte sanitario*, 16(2), 93-101.

Moreno, L. (2012). Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Grupo en Ciencia y Tecnología Apícola AYNI. 109 p.

Muñoz, S. (2011). Aislamiento, identificación y caracterización de *Lactobacillus paracasei* CNCMI-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, obtenidos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Universidad de Granada, España. 249 p.

Noriega, L. Gueimonder M., Borja Sánchez, Margolles A., Reyes-Gavilán C. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidase activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 94: 79-86.

Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C., Granzella L., Montonati M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos Functional foods: Fiber, Prebiotics, Probiotics and Simbiotics. *DIAETA* (25): 121.

Pagliari, D., Piccirillo, C. A., Larbi, A., y Cianci, R. (2015). The interactions between innate immunity and microbiota in gastrointestinal diseases. *Journal of immunology research*.

Park, Y., Hamidon F., Rajangan C., Pong Soh K., Yuen Gan C., Soon Lim T., Nadiah W., and Tze Liong M. (2016). Application of Probiotics for the Production of Safe and High-quality Poultry Meat. *Korean J. Food Sci. An.* Vol. 36, (5), pp. 567~576. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.5.567>

Parra-Huertas R. (2010) Bacteria ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias Agropecuarias, volumen 8 (1).

Parra R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1): 4967-4982.

Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., y Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat science*, 67(2), 309-317.

Pérez, J., Rocha, E., Uzcategui, D., Aranguren, Y. y Machado, E. (2015). Aislamiento, selección y caracterización de cepas del género *Lactobacillus* aisladas de líquido ruminal vacuno en la zona Sur del Lago, Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 7(2), 165-170.

Pieniz, S., R. Andrezza, T. Anghinoni, F. Camargo y A. Brandelli. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB 18s. *Food Control* 37, 251-256.

Prasad, J. Smart H., Gopal J. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8, 993 – 1002.

Prieto, M. (2017). Estudio del potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* C4.

Quicazán, M.C., Sandoval, A. y Padilla, G. (2001). Evaluación de la fermentación de bebida de soya con un cultivo láctico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(2), 92-99.

Rámirez J.C., Rosas P., Velázquez M., Ulloa J.A., Arce F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia los alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año 2. Vol 7.* Recuperado <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/31697/38344>. *Revista MVZ Universidad de Córdoba.* 15, (1), 1944-1953 pp.

Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., & Izquierdo-Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y ciencia*, 25(2), 159-171.

Tabasco-Rentero, R. (2009). Bacterias probióticas en leche fermentada: viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales.

Rivas, F., Garro, O. (2006). Preparación de cultivos iniciadores. Optimización del sustrato de crecimiento. Facultad de Agroindustrias, UNNE. 4 p.

Rivera-García, L., Giraldo A., Agudelo-Laverde, L. (2017). Efecto de dos cultivos probióticos en la elaboración de yogurt a partir de leche en polvo reconstituida (presentación oral). 25 (40), *Revista Alimentos Hoy* -59.

Rodríguez, J. A., Chacón Rueda, Z., Guerrero Cárdenas, B., Otoniel Rojas, J., & López Corcuera, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: Caracterización *in-vitro* como potenciales probióticos. *Revista Científica*, 17(2), 178-185. Recuperado en 10 de diciembre de 2016, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000200012&lng=es&tlng=es.

Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición hospitalaria*, 31(1).

Rodríguez-Guerrero V., Guerrero-Beltrán, J. Probióticos: Resistencia gastrointestinal y microencapsulación. (2010). Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Fundación Universidad de la Américas, Puebla. 48-57.

Rojas-Castro W.N, Chacón-Villalobos A, Pineda-Castro ML. 2007. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agronomía Mesoamericana*. 18(2):221-237.

Ronconi, M.C., Merino, A. V. (2000). Enterococos: Identificación y susceptibilidad antimicrobiana. Área Bacteriología. Instituto de Medicina Regional – UNNE.

Rondón, A. J., Samaniego L. M., Bocourt R., Rodríguez S., Milián G., Ranilla M. J, Laurencio M.y Pérez M. (2008) Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.*, procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus sp.* strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6:1, 56-63, DOI: 10.1080/11358120809487628.

Salminen MK, Järvinen A, Saxelin M, Tynkkynen S, Rautelin H, Valtonen V (2001): Increasing consumption of *Lactobacillus GG* as a probiotic and the incidence of lactobacilli bacteraemia in Finland. *Clin Microbiol Infect*, 7: (Suppl 1) 802.

Sánchez, L. y Tromps J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev. Salud Anim.* Vol. 36 No. 2 : 124-129

Sánchez H. (2007). Efecto de algunos analgésicos y antibióticos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei Shirota*. Registro asignado por la SIP: 20070658

Sánchez, L., Vichi J., Llanes M., Castro E., Soler D., Espinosa I., Kociubinski G.L. y Sanz, Y., Collado, M. y Dalmau J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 64: 74-78.

Sánchez Martínez, J.I. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos.

Saucedo-Briviesca, N., Hernández-Alcántara, A.M., Vázquez-Chávez L.C. y Pérez-Chabelab, M.L. (2017). Características fisicoquímicas y sensoriales de pan fermentado con bacterias lácticas termotolerantes probióticas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, (2): 204-209 p.

Schleifer, K.H., Ludwig, W., 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 461–467 pp.

Serna-Cock, L. y A. Rodríguez-De Stouvenel. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *CYTA - Journal of Food*, 5:1, 54-65 pp.

Simanca, S., Arteaga M., Pérez B., Soto Q., Salcedo M. (2010) Caracterización y estudio de la fermentación espontánea del suero costeño producido en Montería.

Sobarzo, A. O. V. (2007). Estudio de la Viabilidad de *Lactobacillus casei* en Jugo de Pera.

Suárez, M. (2002). Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 40(1), 38-43.

Suzuki, N., Higuchi T., Nakajima M., Fujimoto A., Morita H., Yoneda M., Hanioka T., and Hirofuji T. (2016). Inhibitory Effect of *Enterococcus faecium* WB2000 on Volatile

Tannock, G.W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5, 1059-1070.

Toledano, A.M. (2009). *Evaluacion de cultivos iniciadores para su aplicacion en jamon curado* (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).

Tortora. G.J., Funke, B.R., Case C. (2007). Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana, 9 ed. 675-678.

Torres, R. D., Ramírez, C. L., Anzules, J. C., Monzón, A. H. y Borbor, R. S. (2017). Viabilidad de *Lactobacillus paracasei* en co-cultivo con otras bacterias lácticas en leche descremada fermentada de cabra. *Cumbres*, 3(1), 77-83.

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73, 393–398.

Tuncer, Y. (2009). Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24): 7008-7016 pp.

Uribe, M. M. L., Valencia, J. U. S., Monzón, A. H., y Suescún, J. E. P. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 61(1), 4409-4421.

Vaca, R.V. y Pacheco, M.T. (2011). Producción de ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos, 135 p.

Valenzuela M.A. (2010). Sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis clínica bovina en rebaños lecheros de la región de los ríos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 70 p.

Vallejo, M., Marguet R. y Etchechoury V. (2008). Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos, 9 (4).

Vanegas, M.C., González, L. M., y Arévalo, S.A. (2010). Capacidad bactericida de *Bifidobacterium* sp. aislada de leche materna y de heces de neonatos, frente a los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Infectio*, 14(4), 241-247.

Vargas-Uscategui, R., Arenas-Clavijo, A. y Ramírez-Navas, J.S. (2017). The acidification process effect on the Cottage cheese color. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 677-690

Vasek O. M., Hebert E. M., Giori G., Raya R. & Fusco A. J. (2000). Evaluación del estado lisogénico de cepas de *Lactococcus* constituyentes de un fermento mixto para la elaboración de queso artesanal de Corrientes. Laboratorio de Bromatología Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura - UNNE. Campus Universitario. S. M. de Tucumán - Tucumán - Argentina.

Vélez, J. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur. Tesis de magister en biotecnología, aislamiento de cepas nativas de pro-bióticos para su uso en animales, Producción, desarrollo y transformación de productos agropecuarios, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Medellín, Colombia.

Vega-Rodríguez, P., Álvarez-Aguirre, A., Bañuelos-Barrera, Y., Reyes-Rocha, B., y Castañón, H. (2015). Estilo de vida y estado de nutrición en niños escolares. *Enfermería universitaria*, 12(4), 182-187.

Villarreal, F. (2002). Aislamiento y caracterización de lactobacilos intestinales con potencial probiótico. Universidad Nacional del Litoral, 253 p.

Vizoso-Pinto, M.G.; Franz, C.M.A.P.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.H. (2006). *Lactobacillus* sp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology* 109(3): 205-214.

Vrese M y Marteau P. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr*; 137: S803–S811.

Vrese, M. y Marteau P.R. (2016). Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *The Journal of Nutrition*. Paris, France.

Wood, B. J.B. ed. (1992). *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science London, England.

Waldir, E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., y Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2): 271-276.

Wilches Flórez, A. M. (2005). Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas

productoras de exopolisacáridos (EPS). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 3(2).

Xingyang C., Yunjia S., Shanshan G., Xin Y., Hongyan C. y Junwei G. (2017). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China Against Enteropathogenic Bacteria. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin, China. Probiotics and Antimicrobial Proteins.

Yadav, R., Puniya, A. K., & Shukla, P. (2016). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. *Frontiers in microbiology*, 7, 1683.

Zamora, L. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangra de matadero. Tesis doctoral. Universitat de Girona. España.

Zamudio, K., Zavaleta, A. (2003). Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Ciencia e Investigación* 6 (1):30–35.

Zarate, G., González, Pérez-Chaia S., Oliver A. (2000). Effect of bile on the h-galactosidase activity of dairy propionibacteria. *Lait* 80, 267 – 276.

Zea, J. M. V. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur.

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W. y Mao, S. (2015). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *J. Sci. Food Agric.* 95 (5):1072-1079.

Zhang Q., Wang G., Liu X., Tian F. (2016). Immunomodulatory Effects of Different Lactic Acid Bacteria on Allergic Response and Its Relationship with *In vitro* Properties. *PLoS ONE* 11(10): e0164697.doi:10.1371/journal.pone.0164697.

Zotta T, Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Reale A, et al. (2014) Assessment of Aerobic and Respiratory Growth in the *Lactobacillus casei* Group. *PLoS ONE* 9(6): e99189. doi:10.1371/journal.pone.0099189.

Anexo I. Composición, preparación y marca de los medios de cultivos utilizados

Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)

Medio de cultivo enriquecido para el aislamiento de Lactobacilos
Marca: DIBICO® S.A. de C.V.

Fórmula: Gramos por litro de agua destilada

Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Dextrosa	20.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Fostato disódico	2.0
Peptona proteosa N° 3	10.0
Polisorbato (Tween 80)	1.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05

pH final 6.5 ± 0.2

Para uso exclusivo de Laboratorio
Conservar bien cerrado, protegido de la humedad y de la luz.
“Agente de diagnóstico”

Método de preparación

Rehidratar 55g del medio en un litro de agua destilada. Reposar de 10 a 15 minutos. Agitar frecuentemente hasta completa disolución. Distribuir en tubos de ensaye o matraces. Esterilizar a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. No Sobreesterilizar.

Base de Agar GC

Medio de cultivo enriquecido con sangre o hemoglobina y suplemento nutritivo

Agente de Diagnóstico de uso "*In Vitro*"
Para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete
Marca: MCD Lab, S.A. de C.V.
Contenido 450 g

Fórmula para 1 litro de agua purificada:

Mecla de Peptonas	15.0 g
Almidón de Maíz	1.0 g
Fostato Dipotásico	4.0 g
Fosfato Monopotásico	1.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g

pH final 7.2 ± 0.2

Ajustada y/o suplementada para alcanzar requerimientos óptimos
Altamente Higroscópico
Conservar cerrado en lugar fresco y seco a una temperatura entre 275-303
(2 - 30°C)

Método de Preparación

Suspender 7.2 g del medio en 100 mL de agua purificada para obtener una base de doble concentración, mezclar y dejar reposar durante 5 minutos. Calentar con agitación frecuente hasta completa disolución del polvo y hervir durante 1 minuto. Por otro lado, preparar 100 mL de solución de hemoglobina al 2%, adicionando gradualmente agua a 2 g de hemoglobina seca para obtener una solución uniforme. Esterilizar ambas en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar las soluciones a una temperatura entre 45-50°C y agregar los demás ingredientes, dependiendo del medio que se desee preparar. Homogenizar y vaciar en placas Petri estériles.

Se recomienda probar el desarrollo microbiológico en cepas control.

Sector de Salud
Clave 080 610 1085

Anexo II. Patrón de turbidez: Escala McFarland

Uso

Los patrones de McFarland se utilizan como patrones de turbidez, en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0.5 de McFarland tiene una aplicación especial en la preparación de inóculos bacterianos para la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobianas.

Principios del procedimiento

Las normas de turbidez se preparan mezclando productos químicos que generan precipitación, para formar una solución de turbidez reproducible. Los patrones de turbidez se preparan añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario que produce la formación de un precipitado de sulfato de bario suspendido.

Reactivos

Escala estándar de turbidez McFarland No. 0.5

Fórmula aproximada por 100 mL de agua

Ácido sulfúrico , 0,36 M99.5 mL
Cloruro de bario , 0,048 M.....0.5 mL

Ácido sulfúrico:

100 mL ——— 1g H₂SO₄

55 mL ——— X

X= 0.550 g H₂SO₄.

Cloruro de bario:

100 mL ——— 1.175g Cl₂Ba

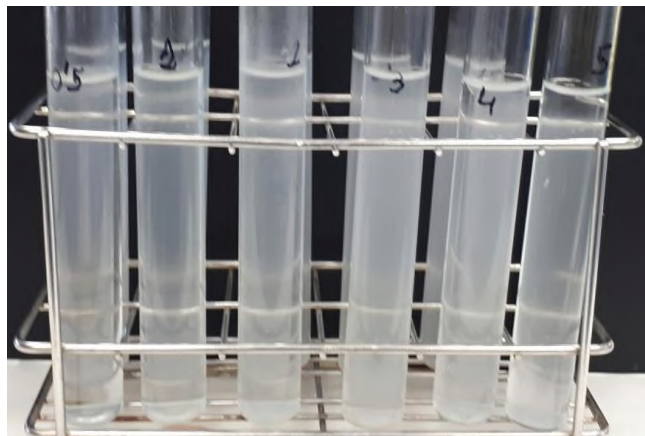
5 mL ——— X

X= 0.058 g BaCl.

Tabla de preparación escala McFarland (Microbiología 671, 2018).

Número	BaCl ₂ 0.048 M 1.175% (mL)	H ₂ SO ₄ 0.36 M 1% (mL)	Volumen final mL	Número de células	Absorbancia
0.5	0.025	4.975	5	1.5x10 ⁸	0.8
1	0.05	9.95	5	3 x10 ⁸	
2	0.1	9.9	5	6 x10 ⁸	
3	0.15	9.85	5	9 x10 ⁸	0.846
4	0.2	9.8	5	12 x10 ⁸	
5	0.25	9.75	5	15 x10 ⁸	1.040
6	0.3	9.7	5	18 x10 ⁸	1.272
7	0.35	9.65	5	21 x10 ⁸	
8	0.4	9.6	5	24 x10 ⁸	
9	0.45	9.55	5	27 x10 ⁸	
10	0.5	9.5	5	30 x10 ⁸	

Tubos escala McFarland (Microbiología 671, 2018).



Patrones de turbidez (Microbiología 671, 2018).



Anexo III. Análisis estadístico para prueba de Tolerancia a la acidez

Modelo lineal general: viabilidad vs. Cepas, pH

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Cepas	Fijo	7	A12, A3, A4, A5, A6, V12, V6
pH	Fijo	6	2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cepas	6	93.49	15.5815	39.38	0.000
pH	5	107.68	21.5358	54.42	0.000
Error	30	11.87	0.3957		
Total	41	213.04			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.629046	94.43%	92.38%	89.08%

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.629046	94.43%	92.38%	89.08%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	7.9048	0.0971	81.44	0.000	
Cepas					
A12	-2.805	0.238	-11.80	0.000	1.71
A3	1.145	0.238	4.82	0.000	1.71
A4	0.762	0.238	3.20	0.003	1.71
A5	-0.105	0.238	-0.44	0.663	1.71
A6	1.779	0.238	7.48	0.000	1.71
V12	0.695	0.238	2.92	0.007	1.71
pH					
2	-3.219	0.217	-14.83	0.000	1.67
3	-0.233	0.217	-1.08	0.291	1.67
4	-0.133	0.217	-0.61	0.544	1.67
5	0.538	0.217	2.48	0.019	1.67
6	1.438	0.217	6.63	0.000	1.67

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{viabilidad} = & 7.9048 - 2.805 \text{ Cepas_A12} + 1.145 \text{ Cepas_A3} + 0.762 \text{ Cepas_A4} - 0.105 \text{ Cepas_A5} \\ & + 1.779 \text{ Cepas_A6} + 0.695 \text{ Cepas_V12} - 1.471 \text{ Cepas_V6} - 3.219 \text{ pH_2} - 0.233 \text{ pH_3} \\ & - 0.133 \text{ pH_4} + 0.538 \text{ pH_5} + 1.438 \text{ pH_6} + 1.610 \text{ pH_7} \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	viabilidad	Ajuste	Resid	Resid est.	
5	7.800	6.464	1.336	2.51	R
25	7.200	8.338	-1.138	-2.14	R

Residuo grande R

Medias

Término	Media ajustada	Error estándar de la media
Cepas		
A12	5.100	0.257
A3	9.050	0.257
A4	8.667	0.257
A5	7.800	0.257
A6	9.683	0.257
V12	8.600	0.257
V6	6.433	0.257
pH		
2	4.686	0.238
3	7.671	0.238
4	7.771	0.238
5	8.443	0.238
6	9.343	0.238
7	9.514	0.238

Comparaciones para viabilidad

Comparaciones por parejas de Tukey: Cepas

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepas	N	Media	Agrupación
A6	6	9.68333	A
A3	6	9.05000	A
A4	6	8.66667	A B
V12	6	8.60000	A B
A5	6	7.80000	B
V6	6	6.43333	C
A12	6	5.10000	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
7	7	9.51429	A
6	7	9.34286	A B
5	7	8.44286	B C
4	7	7.77143	C
3	7	7.67143	C
2	7	4.68571	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo IV. Análisis estadístico para prueba de Tolerancia a sales biliares

Modelo lineal general: Viabilidad vs. Cepas, Sal de bilis

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Cepas	Fijo	7	A12, A3, A4, A5, A6, V12, V6
Sal de bilis	Fijo	4	0.5, 1.0, 2.0, 3.0

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cepas	6	163.91	27.318	12.56	0.000
Sal de bilis	3	36.56	12.185	5.60	0.007
Error	18	39.14	2.175		
Total	27	239.61			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.47468	83.66%	75.49%	60.47%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	5.279	0.279	18.94	0.000	
Cepas					
A12	-4.329	0.683	-6.34	0.000	1.71
A3	-0.654	0.683	-0.96	0.351	1.71
A4	3.096	0.683	4.54	0.000	1.71
A5	2.446	0.683	3.58	0.002	1.71
A6	-1.604	0.683	-2.35	0.030	1.71
V12	1.771	0.683	2.59	0.018	1.71
Sal de bilis					
0.5	1.479	0.483	3.06	0.007	1.50
1.0	0.707	0.483	1.46	0.160	1.50
2.0	-0.821	0.483	-1.70	0.106	1.50

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{Viabilidad} = & 5.279 - 4.329 \text{ Cepas_A12} - 0.654 \text{ Cepas_A3} + 3.096 \text{ Cepas_A4} + 2.446 \text{ Cepas_A5} \\ & - 1.604 \text{ Cepas_A6} + 1.771 \text{ Cepas_V12} - 0.729 \text{ Cepas_V6} + 1.479 \text{ Sal de bilis_0.5} \\ & + 0.707 \text{ Sal de bilis_1.0} - 0.821 \text{ Sal de bilis_2.0} - 1.364 \text{ Sal de bilis_3.0} \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Viabilidad	Ajuste	Resid	Resid est.	
4	7.700	5.154	2.546	2.15	R
11	7.000	4.382	2.618	2.21	R
18	0.000	2.854	-2.854	-2.41	R

Residuo grande R

Medias

Término	Media ajustada	Error estándar de la media
Cepas		
A12	0.950	0.737
A3	4.625	0.737
A4	8.375	0.737
A5	7.725	0.737
A6	3.675	0.737
V12	7.050	0.737
V6	4.550	0.737
Sal de bilis		
0.5	6.757	0.557
1.0	5.986	0.557
2.0	4.457	0.557
3.0	3.914	0.557

Gráficas de residuos para Viabilidad

Comparaciones para Viabilidad

Comparaciones por parejas de Tukey: Cepas

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepas	N	Media	Agrupación
A4	4	8.375	A
A5	4	7.725	A B
V12	4	7.050	A B C
A3	4	4.625	B C
V6	4	4.550	B C
A6	4	3.675	C D
A12	4	0.950	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Sal de bilis

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Sal de bilis	N	Media	Agrupación
0.5	7	6.75714	A
1.0	7	5.98571	A B
2.0	7	4.45714	B
3.0	7	3.91429	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo V. Análisis estadística de disminución de pH en leche

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Hora, Término = Cepa

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepa	N	Media	Agrupación
A12	7	19.1114	A
A4	7	13.8798	A B
A5	7	13.2409	A B
A3	7	12.3822	A B
V6	7	11.7433	B
V12	7	11.2041	B
A6	7	2.4383	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Cepa niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
A3 - A12	-6.73	2.26	(-13.72, 0.26)	-2.98	0.066
A4 - A12	-5.23	2.23	(-12.14, 1.68)	-2.35	0.248
A5 - A12	-5.87	2.24	(-12.81, 1.07)	-2.62	0.147
A6 - A12	-16.67	2.59	(-24.68, -8.66)	-6.45	0.000
V12 - A12	-7.91	2.28	(-14.98, -0.83)	-3.46	0.020
V6 - A12	-7.37	2.27	(-14.40, -0.33)	-3.24	0.035
A4 - A3	1.50	2.19	(-5.29, 8.29)	0.68	0.993
A5 - A3	0.86	2.19	(-5.92, 7.64)	0.39	1.000
A6 - A3	-9.94	2.34	(-17.18, -2.70)	-4.25	0.002
V12 - A3	-1.18	2.19	(-7.96, 5.61)	-0.54	0.998
V6 - A3	-0.64	2.19	(-7.42, 6.14)	-0.29	1.000
A5 - A4	-0.64	2.19	(-7.42, 6.14)	-0.29	1.000
A6 - A4	-11.44	2.38	(-18.83, -4.06)	-4.80	0.000
V12 - A4	-2.68	2.20	(-9.49, 4.14)	-1.22	0.884
V6 - A4	-2.14	2.20	(-8.94, 4.66)	-0.97	0.957
A6 - A5	-10.80	2.36	(-18.12, -3.48)	-4.57	0.001
V12 - A5	-2.04	2.19	(-8.83, 4.76)	-0.93	0.966
V6 - A5	-1.50	2.19	(-8.29, 5.29)	-0.68	0.993
V12 - A6	8.77	2.31	(1.63, 15.91)	3.80	0.008
V6 - A6	9.30	2.32	(2.12, 16.49)	4.01	0.004

Anexo VI. Análisis estadístico de porcentaje de acidez respecto al tiempo

Comparaciones para A%

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = A%, Término = Cepa

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepa	N	Media	Agrupación
A6	7	0.880714	A
V12	7	0.475714	B
V6	7	0.405000	B
A5	7	0.401143	B
A3	7	0.396000	B
A12	7	0.390857	B
A4	7	0.365143	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Cepa niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
A3 - A12	0.005	0.102	(-0.309, 0.320)	0.05	1.000
A4 - A12	-0.026	0.102	(-0.340, 0.289)	-0.25	1.000
A5 - A12	0.010	0.102	(-0.304, 0.325)	0.10	1.000
A6 - A12	0.490	0.102	(0.175, 0.804)	4.82	0.000
V12 - A12	0.085	0.102	(-0.230, 0.399)	0.84	0.980
V6 - A12	0.014	0.102	(-0.300, 0.329)	0.14	1.000
A4 - A3	-0.031	0.102	(-0.345, 0.284)	-0.30	1.000
A5 - A3	0.005	0.102	(-0.309, 0.320)	0.05	1.000
A6 - A3	0.485	0.102	(0.170, 0.799)	4.77	0.000
V12 - A3	0.080	0.102	(-0.235, 0.394)	0.78	0.985
V6 - A3	0.009	0.102	(-0.306, 0.324)	0.09	1.000
A5 - A4	0.036	0.102	(-0.279, 0.351)	0.35	1.000
A6 - A4	0.516	0.102	(0.201, 0.830)	5.08	0.000
V12 - A4	0.111	0.102	(-0.204, 0.425)	1.09	0.928
V6 - A4	0.040	0.102	(-0.275, 0.354)	0.39	1.000
A6 - A5	0.480	0.102	(0.165, 0.794)	4.72	0.001
V12 - A5	0.075	0.102	(-0.240, 0.389)	0.73	0.990
V6 - A5	0.004	0.102	(-0.311, 0.318)	0.04	1.000
V12 - A6	-0.405	0.102	(-0.720, -0.090)	-3.99	0.005
V6 - A6	-0.476	0.102	(-0.790, -0.161)	-4.68	0.001
V6 - V12	-0.071	0.102	(-0.385, 0.244)	-0.70	0.992

Nivel de confianza individual = 99.65%

Anexo VII. Análisis estadístico de viscosidad

Comparaciones para Viscosidad

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Viscosidad, Término = Cepa

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Cepa	N	Media	Agrupación
A4	3	722.533	A
V6	3	630.867	B
A5	3	605.333	B C
A6	3	577.600	C
V12	3	452.467	D
A3	3	271.733	E
A12	3	33.533	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Cepa niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
A3 - A12	238.2	11.7	{ 198.3, 278.1}	20.41	0.000
A4 - A12	689.0	11.7	{ 649.1, 728.9}	59.03	0.000
A5 - A12	571.8	11.7	{ 531.9, 611.7}	48.99	0.000
A6 - A12	544.1	11.7	{ 504.2, 583.9}	46.61	0.000
V12 - A12	418.9	11.7	{ 379.1, 458.8}	35.89	0.000
V6 - A12	597.3	11.7	{ 557.5, 637.2}	51.17	0.000
A4 - A3	450.8	11.7	{ 410.9, 490.7}	38.62	0.000
A5 - A3	333.6	11.7	{ 293.7, 373.5}	28.58	0.000
A6 - A3	305.9	11.7	{ 266.0, 345.7}	26.20	0.000
V12 - A3	180.7	11.7	{ 140.9, 220.6}	15.48	0.000
V6 - A3	359.1	11.7	{ 319.3, 399.0}	30.77	0.000
A5 - A4	-117.2	11.7	{ -157.1, -77.3}	-10.04	0.000
A6 - A4	-144.9	11.7	{ -184.8, -105.1}	-12.42	0.000
V12 - A4	-270.1	11.7	{ -309.9, -230.2}	-23.14	0.000
V6 - A4	-91.7	11.7	{ -131.5, -51.8}	-7.85	0.000
A6 - A5	-27.7	11.7	{ -67.6, 12.1}	-2.38	0.277
V12 - A5	-152.9	11.7	{ -192.7, -113.0}	-13.10	0.000
V6 - A5	25.5	11.7	{ -14.3, 65.4}	2.19	0.359
V12 - A6	-125.1	11.7	{ -165.0, -85.3}	-10.72	0.000
V6 - A6	53.3	11.7	{ 13.4, 93.1}	4.56	0.006
V6 - V12	178.4	11.7	{ 138.5, 218.3}	15.28	0.000

Nivel de confianza individual = 99.58%