



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGIA**



**VIABILIDAD DE *Lactobacillus* spp. EN SOLUCIÓN SALINA 0,9%  
ALMACENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**AUTOR**

**Jorge Mario Leonardo Suárez Rivas**

**TUTORA**

**MSc. Kiralba Sánchez**

**COTUTORA**

**Dra. Elaysa Salas**

**Mérida, Mayo de 2018**



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**



**VIABILIDAD DE *Lactobacillus* spp. EN SOLUCIÓN SALINA 0,9%  
ALMACENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS**

**(Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título  
de Licenciado en Bioanálisis)**

**AUTOR  
Jorge Mario Suárez Rivas**

**TUTORA  
MSc. Kiralba Sánchez**

**COTUTORA  
Dra. Elaysa Salas**

**Mérida, Mayo 2018**

## INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE GRÁFICOS.....	xi
INDICE DE TABLAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
Alcances de la Investigación.....	7
Limitaciones de la Investigación.....	7
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
Trabajos Previos.....	8
Antecedentes Históricos.....	10
Bases Teóricas.....	12

<i>Definición de probiótico.....</i>	12
<i>Criterios para que un microorganismo sea denominado probiótico.....</i>	12
<i>Microorganismos utilizados como probióticos.....</i>	13
<i>Mecanismos de acción ya aplicaciones clínicas de los probióticos.....</i>	15
<i>Generalidades de Lactobacillus spp.....</i>	17
<i>Métodos de conservación bacteriana.....</i>	19
<i>Viabilidad de Lactobacillus en diferentes matrices.....</i>	22
<b>Definición de Términos.....</b>	<b>25</b>
<b>Operacionalización de variables.....</b>	<b>26</b>
<b>Sistema de Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>30</b>
<b>Tipo de Investigación.....</b>	<b>30</b>
<b>Diseño de Investigación.....</b>	<b>30</b>
<b>Población y Muestra.....</b>	<b>31</b>
<i>Unidad de investigación.....</i>	<b>31</b>
<b>Sistema de Variables.....</b>	<b>31</b>
<b>Procedimiento.....</b>	<b>32</b>
<b>Diseño de Análisis.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>36</b>

<b>Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>    Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>    Recomendaciones.....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOHEMEROGRAFIA.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 1: Características de las cepas en estudio.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 2: Instrumento de Recolección de resultados.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 3: Análisis estadístico ANOVA.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 4: Gram de Subcultivo LB04.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 5: Cultivo de LB04.....</b>	<b>55</b>

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA



VIABILIDAD DE *Lactobacillus* spp. EN SOLUCIÓN SALINA 0,9%  
ALMACENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Autor: Jorge Mario Suárez

Tutora: MSc. Kiralba Sánchez  
Cotutora: Dra. Elaysa Salas

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de las cepas *Lactobacillus plantarum* Lb04 y *Lactobacillus acidophilus* Lb05 y la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, en solución salina fisiológica (SSF, 0,9%). Para ello se inoculó una concentración 1 (escala McFarland) en tubos con SSF y almacenados a temperatura ambiente y otro lote a 4°C durante 7 días. Los conteos se realizaron diariamente a partir de la dilución 10<sup>6</sup> hasta 10<sup>8</sup> en agar MRS, las placas se incubaron a 35°C durante 24-48 horas en microaerobiosis. A los 7 días se obtuvieron contajes en SSF, para Lb04 de 5,20 ± 2,28 x 10<sup>7</sup> y 2,88 ± 1,69 x 10<sup>8</sup> UFC/ml, a T.A. y 4°C respectivamente; así mismo, para Lb05 los contajes fueron de 2,66 ± 1,63 x 10<sup>8</sup> a T.A y 2,85 ± 1,69 x 10<sup>8</sup> UFC/mL en refrigeración. Los resultados indican una disminución en la viabilidad de ambas cepas en SSF entre 1 a 3 ciclos logarítmicos, pero manteniendo sus niveles superiores a 10<sup>7</sup> UFC/. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los contajes de colonias entre Lb04 y Lb05 almacenados a T.A. y a 4°C. La solución salina fisiológica representa una alternativa como vehículo para la administración de lactobacilos probióticos y como método de preservación a corto plazo.

**Palabras clave:** probióticos, *Lactobacillus*, preservación, solución salina fisiológica.

## DEDICATORIA

A Dios todopoderoso quien siempre va en primer lugar guiándome para lograr mis metas, siempre escuchando mis oraciones y plegarias.

A mi mamá Miriam Del Carmen y a mi papá Juan Ramón, quienes siempre han estado allí en las buenas y en las malas, para apoyarme en todos los sentidos, para animarme a seguir adelante, para no desfallecer a pesar de todas las dificultades y obstáculos que se me presentaron en el camino.

A mis tías Fanny Coromoto Rivas Montilla y Aleida María, porque son mis segundas madres, porque siempre han estado allí también para apoyarme en todo lo que necesito para superarme, siempre inspiraron en mí ese espíritu de superación de trabajo y de lucha constante.

A mis hermanos Eduardo, Fernando y en especial a Jesús y Juan José que en estos momentos se encuentran fuera de nuestro país Venezuela, y a quienes espero ver muy pronto, por siempre apoyarme en mis estudios, por su preocupación y apoyo incondicional.

A mis cuñadas Rosa Gil y María Antonietta, porque me han acompañado en este camino y también han sido un apoyo importante para mí en todo momento.

Muy especialmente a mi sobrina Bárbara Isabella, princesa hermosa quien es motivo de inspiración para que siga adelante, eres ese pequeño rayo de luz que llegó a nuestras vidas para cambiarlo y mejorarlo todo, que Dios siempre te bendiga e ilumine.

A Todos aquellos que lucharon por la libertad de mi país y no están presentes físicamente, a Neomar Lander a Juan Pernaletе y todos de nuestros héroes anónimos porque su lucha me inspiró a seguir creyendo en mi país y en su gente.

A mis profesores de mi Facultad de Farmacia y Bioanálisis Escuela de Bioanálisis de la ULA, quienes son parte de este éxito también, especialmente a quien para mí fue mi mejor profesora en mi carrera Profesora María Alejandra Blanco de García, su talento, pasión y amor por nuestra carrera inspira a cientos de estudiantes a forjarse cada día mejor como profesionales de bien.

Finalmente a todos aquellos familiares y amigos que de una forma u otra han contribuido en mi formación profesional.

*...Jorge*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



## AGRADECIMIENTOS

A la Ilustre Universidad de Los Andes, en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por mi formación académica y permitirme formarme como un hombre de bien al servicio de mi país.

A mi país Venezuela porque no existe mejor Nación en el mundo.

A mi tutora MSc. Kiralba Sánchez por su apoyo y enseñanzas durante el desarrollo de esta investigación, por sus conocimientos científicos siempre buscando la excelencia en todos los sentidos.

A los profesores Elaysa Salas y José Manuel Jiménez por su dedicación durante la asesoría de este trabajo...Gracias.

A mis amados padres Miriam y Juan Ramón, les debo la vida y todo lo que soy, gracias por nunca dejar de apoyarme, por brindarme todo su amor, comprensión y ayuda, gracias por orar siempre por mí para que todo saliera bien, por brindarme su bendición hoy y siempre.

A mis amadas tías Fanny y Aleida, mis segundas madres, porque nunca dejaron de creer en mí, gracias infinitas por todo su amor y ayuda.

A mis hermanos Eduardo, Fernando, Jesús y Juan José, gracias por brindarme siempre su apoyo.

A la Lcda. Adriana Rivas por su contribución en el diseño de las figuras del trabajo.

A mis grandes amigos Stephany, Sandra, Dori Jimmy y Edgar, gracias por tantos buenos momentos, espero que nuestra amistad perdure toda la vida.

Finalmente a todos aquellos familiares y amigos que de una u otra forma han contribuido en mi formación profesional.

.....**Gracias**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		pág.
Nº 1	Preparación de suspensiones bacterianas para el estudio.....	33
Nº 2	Determinación de la viabilidad de <i>Lactobacillus</i> spp.....	35

www.bdigital.ula.ve

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO.		pág.
Nº 1	Viabilidad de Lb04 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C por siete días.....	40
Nº 2	Viabilidad de Lb05 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C por siete días.....	40
Nº3	Viabilidad de ATCC 8014 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4 °C por siete días.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		pág.
Nº 1	Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial.....	14
Nº 2	Efectos beneficiosos y aplicaciones terapéuticas de los probióticos.....	16
Nº 3	Operacionalización de la Variable Dependiente.....	26
Nº 4	Operacionalización de la variable independiente: temperatura.....	27
Nº 5	Operacionalización de la variable independiente: tiempo.....	27
Nº 6	Operacionalización de la variable interviniente: muerte bacteriana.....	28
Nº 7	Operacionalización de la variable interviniente: Contaminación.....	28
Nº 8	Promedio y logaritmo del conteo de colonias de la cepa Lb 04.....	37
Nº 9	Promedio y logaritmo del conteo de las colonias de la cepa Lb 05.....	38
Nº 10	Promedio y logaritmo del conteo de las colonias de la cepa ATCC 8014.....	38

## INTRODUCCIÓN

*Lactobacillus* spp. forma parte de la microbiota habitual del ser humano, estos microorganismos contribuyen en el mantenimiento del equilibrio químico en ciertas áreas específicas, como es el caso de la mucosa vaginal donde proveen un pH ácido, para evitar que bacterias patógenas colonicen y produzcan enfermedades. De igual forma, al ser suministrados viables, bien sea como monocultivo o cultivo mixto, pueden ejercer efectos favorables para el hospedero, mejorando las propiedades de la microbiota indígena en el tracto gastrointestinal.

En la literatura se refieren datos sobre el uso milenario de las bacterias ácido-lácticas (BAL); no obstante, la investigación científica de los efectos saludables de los microorganismos probióticos data del siglo XX. Desde entonces, numerosos grupos de investigación a nivel mundial, se han enfocado en indagar sobre las propiedades probióticas de diferentes géneros bacterianos y micóticos, entre estos *Lactobacillus*.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO, por sus siglas en inglés) define a los probióticos como microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero (FAO, 2002). Los efectos fisiológicos pueden originarse mediante dos mecanismos: por efecto directo de las células vivas sobre el nicho ecológico o indirectamente a través de los metabolitos producidos por estos microorganismos.

La administración de los probióticos requiere de productos adecuados que garanticen la viabilidad de los microorganismos y así poder ejercer sus efectos clínicos y terapéuticos, una de las condiciones requeridas es la concentración microbiana la cual debe ser igual o superior a  $10^6$  UFC/g (Rybka & Kailasapathy, 1995). Desde el punto de vista tecnológico, los lácteos han sido los alimentos más utilizados para la incorporación de probióticos con un alto potencial en el sector de los alimentos funcionales,

entre ellos: el queso, yogurt y la leche, entre otros. No obstante, el 80% de la población sufre o sufrirá de intolerancia a los lácteos o casos de alergia a la caseína de la leche. En virtud de ello, la literatura técnica informa de interesantes investigaciones sobre el uso de otras matrices para la incorporación de los probióticos, que eviten complicaciones gastrointestinales a la mayoría de los consumidores, tal es el caso del uso de jugos de frutas; así mismo, se ha utilizado solución isotónica de glucosa, ampliando cada día más la variedad de matrices que permitan vehiculizar a los microorganismos beneficiosos (Shori, 2016; Lewandowski, 2015).

La solución salina fisiológica 0,9% (SSF) también denominada suero fisiológico, es una sustancia cristaloides estándar, es levemente hipertónica respecto al líquido extracelular y tiene un pH ácido. En el campo médico esta sustancia permite restituir la volemia en personas deshidratadas, o como un medio de administración de ciertos medicamentos. En microbiología es ampliamente utilizada para la realización de suspensiones bacterianas, inóculos estándar para pruebas de susceptibilidad; y en algunos casos para la conservación de especies bacterianas no exigentes como enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa (Cano, Medina, Macías, Álvarez, 2012).

La presente investigación pretende evaluar la viabilidad de dos cepas de *Lactobacillus* probióticas en SSF durante el almacenamiento a diferentes temperaturas por un periodo de tiempo determinado.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

El uso de los microorganismos probióticos, tanto para la prevención de enfermedades como para su tratamiento, está adquiriendo un importante auge en la actualidad. Estos han sido utilizados con diversos fines, principalmente como alternativa al consumo de antibióticos. Se ha descrito su uso en la modulación de la inmunidad en casos de alergias producidas por antígenos alimentarios, en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica y para disminuir el colesterol; de igual modo, se ha utilizado en la prevención del cáncer, la intolerancia a la lactosa, en procesos diarreicos e infecciones urinarias y en la disfunción vaginal (Peña, 2006; Vázquez y col., 2007).

La leche y sus derivados han sido utilizados como los vehículos más populares para la incorporación de organismos probióticos (Sultana y col., 2000). Las bifidobacterias, lactobacilos y estreptococos, son las bacterias viables contenidas en muchos de los productos de consumo masivo como el queso, yogur, kéfir, suero de leche, leche fermentada, helados y otros alimentos; no obstante, los lácteos presentan inconvenientes debido a que algunos de sus componentes como ácidos grasos saturados, contaminantes como estrógenos, pesticidas e insulina han sido relacionados con cáncer; por otra parte, estos productos tienen una vida media corta, además requieren ser almacenados en frío. Sin embargo, la principal limitante para su uso, es el bajo contenido de microorganismos que contienen para obtener un efecto terapéutico. Las bacterias del yogur no son resistentes a los ácidos gástricos, a la bilis y a los antibióticos; en virtud de esto, se requiere una administración de probióticos adecuada en cuanto a su concentración y

asegurar que estos tengan capacidad de resistir el tránsito gastrointestinal (Calderón y col., 2007).

El creciente número de personas con intolerancia a la lactosa, la dislipidemia y el cambio de hábitos alimenticios, refuerzan la importancia del desarrollo de productos probióticos no lácteos. Estas condiciones han permitido el lanzamiento de nuevos productos que contienen cepas probióticas, particularmente bebidas a base de frutas, verduras, cereales y soya (Corbo, Bevilacqua, Petruzzi, Casanova y Sinigaglia, 2014). Sin embargo, existen algunos retos tecnológicos al utilizar estas matrices, por ejemplo la pérdida de viabilidad por efecto del pH, el almacenamiento y el efecto sobre las características organolépticas.

La selección de la cepa y la cantidad adecuada de microorganismos inoculados son aspectos críticos en el desarrollo de productos probióticos. La capacidad para mantenerse vivos en el tiempo es una de las características fundamentales que se requieren para la administración de microorganismos con potencial probiótico ya sea a través de alimentos funcionales como en productos bioterapéuticos. Por lo tanto, existe la necesidad de preservar esta característica en medios no habituales, que sean económicos, accesibles y funcionen como vehículos de microorganismos probióticos tanto en humanos como en animales.

La solución salina fisiológica ha sido ampliamente estudiada por los científicos a nivel mundial; no obstante, su aplicación en el campo de la preservación de microorganismos es muy limitada. La falta de conocimientos sobre la viabilidad de los lactobacilos en solución isotónica de cloruro de sodio y la necesidad de encontrar medios de administración oral diferentes a los lácteos, que involucren a los probióticos y no afecten la salud de seres humanos nos conduce a plantear el siguiente enunciado holopráxico:



¿Cuál es el comportamiento de dos cepas de Lactobacilos probióticos en solución salina fisiológica conservados a temperatura ambiente y a 4°C durante 7 días de almacenamiento?

### **Justificación de la investigación**

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de graves problemas de la humanidad, en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. Particularmente, las especies de *Lactobacillus* funcionan como barrera biológica, poseen la capacidad de producir sustancias naturales como lactocinas, helveticina, nisina y curvacina, que confieren protección al hospedero. También tienen la capacidad de estimular el sistema inmune, generándose macrófagos que modulan la respuesta de las inmunoglobulinas.

Más allá de estas funciones biológicas, el uso biotecnológico de los *Lactobacillus* tiene gran impacto en la industria alimenticia y farmacéutica.

En el ámbito científico, la búsqueda de cepas autóctonas con capacidad probiótica a partir de diferentes nichos ecológicos, ha sido la tarea primordial del Grupo de Probióticos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes; en virtud de ello, este equipo se ha propuesto demostrar la viabilidad de los *Lactobacillus* spp en SSF, lo cual contribuirá con el desarrollo de un método a corto plazo para la preservación de lactobacilos con potencial probiótico; así mismo, de aportar una alternativa al uso de lácteos como matrices habituales para la administración de probióticos.

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Evaluar la viabilidad de *L. plantarum* (Lb04) y *L. acidophilus* (Lb05) en solución salina 0,9% incubados a temperatura ambiente y a 4°C durante 7 días de almacenamiento.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Determinar la concentración de Lb04 y Lb05 en solución salina 0,9% por el método de dilución en agar.
- 2) Determinar el conteo de colonias de Lb04 y Lb05 en solución salina 0,9% almacenado a temperatura ambiente y a 4°C.
- 3) Comparar la viabilidad de Lb04 y Lb05 con respecto a la cepa control, almacenados a diferentes temperaturas en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días.

## **Alcances y Limitaciones**

### ***Alcances de la Investigación***

Hernández, Fernández y Baptista (2010), refieren que el alcance de una investigación está representado por la amplitud y la profundidad del conocimiento que se quiere saber. Al respecto, el presente estudio está sustentado por la profundidad del abordaje del tema sobre los métodos de preservación de microorganismos especialmente de probióticos; en vista de la escasa literatura sobre el tópico los resultados fueron novedosos con un importante aporte científico y clínico.

### ***Limitaciones de la Investigación***

Las limitaciones fueron básicamente de orden económico, dado el alto costo de los insumos utilizados para el desarrollo experimental del estudio. Por otro lado, los constantes cortes de electricidad incidieron negativamente en el avance del trabajo y la pérdida de material.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos previos

De la Cruz y Terán (2013) en Honduras, evaluaron la viabilidad de una cepa probiótica de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como matriz en jugo de guayaba, en los tiempos de 0, 4, 24, 72 y 192 horas. Las pruebas de viabilidad consistieron en almacenar el jugo con las bacterias a una concentración de 8 Log UFC mL<sup>-1</sup> y 8 Log UFC g<sup>-1</sup> con el fin de observar la variación de la concentración de las células bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se demostró que después de 8 días de almacenamiento en el jugo a 4°C, las cápsulas mantuvieron una concentración de bacteria de 7,06 Log UFC g<sup>-1</sup> y que almacenando un grupo por separado durante 15 días, se constató que la vida de anaquel no redujo la concentración bacteriana. El estudio demostró que el uso de técnicas de encapsulación es una alternativa para aumentar la viabilidad a través del tiempo de *L. casei* en el jugo de guayaba; además no genera impacto en la acidez ni en las características sensoriales (textura, color).

Acevedo-Martínez, García-Mahecha, Páramo-Jiménez y Díaz-Moreno (2013) en Colombia, desarrollaron un trabajo con el objetivo de evaluar la viabilidad de *L. rhamnosus* en una bebida no fermentada de mango, con inclusión de inulina almacenada a 4°C durante 8 semanas. La inoculación de la cepa probiótica se realizó directamente del liofilizado sobre el néctar de mango estéril, previo a una dilución en solución isotónica. Durante el tiempo

de análisis, la población bacteriana se mantuvo en el orden de 8 log UFC mL<sup>-1</sup>, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p=0,8028$ ). Con base en estos resultados, es necesario continuar con las mediciones hasta que el microorganismo pierda por completo su viabilidad y se pueda determinar el efecto protector de la inulina sobre la bacteria.

El uso de cultivos de probióticos en la industria avícola para el control de patógenos, ha ganado reciente atención debido al incremento de la restricción de antibióticos como agentes promotores de crecimiento; al respecto, Lourenço, Kuritza, Westphal, Miglino, Pickler, dos Santos *et al.*(2012) en Paraná-Brasil evaluaron el efecto de un probiótico a base de *Lactobacillus* spp. administrado a través del agua de bebida para el control de Salmonella Minnesota en pollos de engorde. Para ello, se administró probióticos desde el primer día del ensayo; mientras que, S. Minnesota se inoculó por vía oral el día 20 desde el inicio del experimento, como grupo control se seleccionaron pollos con solo inóculo del enteropatógeno sin probiótico. Los resultados mostraron que el probiótico fue capaz de reducir de forma significativa la presencia de Salmonella Minnesota en el buche y en el ciego. Este trabajo demuestra que la vía de administración del probiótico resultó un éxito utilizando agua.

Marín, Cortés y Montoya (2009) en Medellín-Colombia, evaluaron la supervivencia de las cepas *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, en los sustratos pulpa de uchuva y solución de glucosa (14% p/p). Para ello inocularon las cepas a una concentración 0,5 (escala McFarland) almacenándola a 4°C durante 15 días. Los conteos se realizaron a partir de la dilución 10<sup>8</sup> en agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe), se incubaron a 37°C durante 72 horas en condiciones de microaerobiosis. A los 15 días se obtienen conteos en pulpa y solución de glucosa, con promedios para *L. plantarum* de  $3,23 \pm 3,35 \times 10^9$  y  $1,64 \pm 1,57 \times 10^9$  UFC/mL; para *L. casei* de

$5,40 \pm 2,36 \times 10^8$  y  $7,34 \pm 7,88 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente. Los resultados indicaron un buen comportamiento de ambas cepas en los sustratos, con niveles superiores a  $10^6$ , criterio considerado en lácteos para definir un alimento como probiótico. El desarrollo de estos alimentos o sustratos representan alternativas para consumo directo de microorganismos probióticos o en soluciones de impregnación, permitiendo de este modo el desarrollo de nuevos productos.

Por su parte, Vergara (2007) en Chile, evaluó la viabilidad de *Lactobacillus casei*. (*L. casei*-01) en jugo de pera, el cual fue inoculado con *L. casei*, almacenado a temperatura ambiente, aplicándole mediciones de pH, acidez y recuento microbiológico los días 0,1,2,3,4,7,9,11,14,16,18,21,23 y análisis sensorial los días 0,3,7,10,14,17,21,24. La determinación la población de *L. casei* en UFC/mL fue realizada mediante el recuento en placas Petri con agar MRS, hasta el momento en que se presentó un crecimiento menor a  $10^4$  UFC/mL. Para el análisis sensorial el jugo de pera fue evaluado por 10 panelistas no estrenados; el nivel de aceptabilidad, se realizó utilizando una escala hedónica de 9 puntos. Los resultados obtenidos en este estudio, revelaron que la viabilidad de *L. casei* en jugo de pera durante 23 días fue mayor a  $1 \times 10^7$  por lo cual el jugo se puede considerar una buena matriz para los consumidores y por lo tanto un producto probiótico. *L. casei* sobrevivió en el jugo de pera en condiciones de pH bajo durante 23 días a temperatura ambiente variable (17-22 °C). Finalmente en las pruebas sensoriales realizadas por los panelistas, los resultados fueron aceptables hasta un periodo de 14 días.

### **Antecedentes Históricos**

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en Paris) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL)

ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microbios útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium*, productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, indoles, y amoníaco. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria a la que denominó “bacilo búlgaro.” (Organización Mundial de Gastroenterología, OMGE, 2008)

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped (OMGE, 2008)

A finales del siglo XIX con el desarrollo de los medios de cultivo para la propagación microbiana y la aplicación de técnicas de aislamiento se logró la obtención de cultivos puros, los cuales fueron mantenidos en medios sólidos a base de caldo nutritivo y extracto de malta. Años más tarde, Will en 1.907 logró preservar levaduras en sacarosa al 10% durante 8 años. Entre los años 1.909-1.911 Shackel y Hammer desarrollaron los primeros métodos de liofilización para bacterias, empleando suero y leche como protectores (Gil-Loyzaga, 2011).

Con el advenimiento de los antibióticos hacia la década de los ´40, la industria farmacéutica estimuló el desarrollo de técnicas más avanzadas en liofilización y crio-conservación, los cuales permitían el mantenimiento de los cultivos por 10 a 20 años. Para 1.950 se descubrió las propiedades crioprotectoras del glicerol, dimetilsulfóxido y sacarosa. (catedras.quimica.unlp.edu.ar/.../III-conservaciondecultivos.ppt)

Este gran avance tecnológico permitió el desarrollo de las colecciones de microorganismos, de tal manera que para 1.911 nace la colección de bacterias en *el National History Museum of New York*, este fue el antecesor de la mayor colección de microorganismos conocido hoy en día como *The American Type Culture Collection*, reconocidas por las siglas ATCC, fundado en 1.925 (catedras.quimica.unlp.edu.ar/.../III-conservaciondecultivos.ppt)

## **Bases Teóricas**

### ***Definición de probiótico***

El término probiótico deriva del latín *pro* que significa “a favor de” y del griego *bio* “vida” y hace referencia a la capacidad de ciertos microorganismos de actuar “a favor de la vida”. Este término se aplica a ciertos microorganismos que administrados en cantidades apropiadas generan un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero. La FAO y la OMS (Organización Mundial de la Salud) definen el término probiótico como: “Microorganismos vivos que ingeridos en las cantidades adecuadas confiere un beneficio saludable al huésped” (FAO y OMS, 2001).

### ***Criterios para que un microorganismo sea definido como un probiótico***

En pocos años los probióticos han evolucionado desde productos pioneros, como *Lactobacillus acidophilus*, hasta la gran variedad que existe actualmente como varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidus*, *Streptococcus thermophilus* e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* y *Candida pintolopesli*. Muy interesante parece también la idea de añadir a los probióticos cepas no patógenas de *E. coli* que compitan con su homólogo patógeno. La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos beneficiosos sean demostrados, que la cepa sea de



origen humano y segura para su uso, que sea estable al ácido y la bilis y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como también excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos y colabore en la formación de una microbiota normal y equilibrada (Amores, Calvo, Maestre y Martínez, 2004).

Otros aspectos importantes a considerar es que estos microorganismos deben estar debidamente depositados en una colección de cultivo internacional reconocido y ser perfectamente caracterizados a nivel de género, especie y cepa. Ser seguros para el hospedador, determinado mediante ensayos “in vitro” y/o en animales de experimentación si es necesario. Estar viables en el momento de su consumo, aunque se ha reconocido que las células no viables pueden mediar algunos efectos beneficiosos a nivel fisiológico (Ramos-Cormenzana, Fuentes, Ferrer-Cebrian, & Monteoliva-Sánchez, 2005; Saulnier, Spinler, Gibson & Versalovic, 2009).

Algunos criterios propuestos para la selección de microorganismos probióticos con aplicaciones comerciales se muestran en la Tabla 1.

### ***Microorganismos utilizados como probióticos***

Dentro del grupo de las bacterias potencialmente probióticas han sido descritos géneros como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus* y *Saccharomyces*. De estos, el género *Lactobacillus* describe con mayor número de especies con efecto probiótico (FAO y OMS, 2001; Rodríguez, 2008).

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos, se encuentran las BAL, que agrupan una gran cantidad de géneros y especies, siendo los siguientes los principales microorganismos probióticos comercializados en el mundo: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B.*

*longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. essensis*, entre otros (Shah, 2001; citado por Tintori, 2005).

**Tabla 1. Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial**

Criterio	Propiedad
<b>Seguridad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Origen</li> <li>Patogenia e infectividad (ausencia)</li> <li>Factores de virulencia – toxicidad, actividad metabólica y</li> <li>propiedades intrínsecas como la resistencia a los antibióticos</li> </ul>
<b>Tecnológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cepas genéticamente estables</li> <li>Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento</li> <li>Buenas propiedades sensoriales</li> <li>Resistencia a fagos</li> <li>Producción a gran escala</li> </ul>
<b>Biológico/Funcional</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tolerancia al ácido y a los jugos gástricos</li> <li>Tolerancia a la bilis</li> <li>Adhesión a la mucosa</li> <li>Efectos beneficiosos sobre la salud validados y documentados</li> </ul>
<b>Fisiológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmuno-modulación</li> <li>Actividad antagonista frente a patógenos gastrointestinales</li> <li>como <i>Helicobacter pylori</i> o <i>Candida albicans</i></li> <li>Metabolismo del colesterol y de la lactosa</li> <li>Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas</li> </ul>

**Fuente:** Vasiljevic y Shah (2008).

## Mecanismos de acción y aplicaciones clínicas de los probióticos

Los probióticos han demostrado su potencial para reducir la intensidad y duración de las diarreas. Tanto *L. acidophilus* como *B. bifidum* han demostrado ser inhibidores de muchos de los patógenos transmitidos por los alimentos. En el campo de la ginecología también se ha introducido el uso de probióticos como opción terapéutica para prevenir infecciones que pueden desencadenar complicaciones gineco-obstétricas. El uso de lactobacilos para tratar infecciones del tracto genitourinario se remonta a 1915, cuando Newman, inyectó directamente estos microorganismos en la vejiga urinaria para tratar la cistitis (Martin, Soberón, Vázquez, Suarez, 2008). En un estudio piloto llevado a cabo por Ueharaa, Mondena, Nomotob, Reiko y Hiromi (2006), las pacientes con infecciones urinarias recurrentes fueron tratadas con supositorios intravaginales de *L. crispatus*, observándose una disminución notable de las infecciones recurrentes, pudiéndose evidenciar la efectividad y seguridad de implementar este tipo de probiótico en estos casos.

La influencia de los probióticos sobre la respuesta inmunitaria se empezó a investigar a principios de la década pasada, observándose que ciertas cepas bacterianas presentaban propiedades inmunomoduladoras en los seres humanos. Algunos probióticos, estimulan la inmunidad innata y adquirida, regulan reacciones de hipersensibilidad, inducen la inmunidad secretora, con el aumento de la producción de IgA secretora, lo cual genera una gran variedad de aplicaciones desde el punto de vista terapéutico (Castro y Rovetto, 2006).

Los mecanismos para la inhibición de patógenos atribuidos a los lactobacilos y bifidobacterias incluyen: la producción de sustancias inhibitoras / antimicrobianas tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, antibióticos y ácidos biliares desconjugados;

además actúan como antagonistas competitivos, es decir, compiten por sitios de adhesión y nutrientes

Otra de las aplicaciones importantes de los probióticos es en la intolerancia a la lactosa, algunas personas presentan incapacidad de digerir la lactosa de manera adecuada; esto se debe a la ausencia de beta-galactosidasa en el intestino humano y esto conduce a diversos grados de malestar abdominal. Algunas bacterias del ácido láctico utilizadas como cultivos iniciadores en la leche y en la fermentación, tales como *L. acidophilus* y *B. bifidum* producen beta-D-galactosidasa. Esta enzima hidroliza lactosa, lo que resulta en un aumento de la tolerancia para productos lácteos (Kim, 1983).

En la Tabla 2 se presenta un resumen de los efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos.

**Tabla 2. Efectos beneficiosos y aplicaciones terapéuticas de los probióticos**

<i>Efectos beneficiosos</i>	<i>Aplicaciones terapéuticas</i>
Mantenimiento de la microbiota intestinal normal	Prevención de la infección urogenital Alivio del estreñimiento
Mejora del sistema inmune	Protección contra la diarrea del viajero
Reducción de la intolerancia a la lactosa	Prevención de la diarrea infantil
Reducción de los niveles de colesterol sérico	Reducción de la diarrea inducida por antibióticos
Actividad anticarcinogénica	Prevención de la hipercolesterolemia
Valor nutricional mejorado de los alimentos	Protección contra el cáncer de colon y vejiga Prevención de la osteoporosis

**Fuente:** Lourens-Hattingh (2001).

### **Generalidades de *Lactobacillus* spp.**

*Lactobacillus* spp. es ubicuo en la naturaleza pudiéndose encontrar en alimentos lácteos, vegetales, carnes y sus derivados, bebidas fermentadas, entre otras. Además forman parte de la microbiota habitual de la boca, tracto gastrointestinal y vagina de mamíferos, rara vez este género es considerado patógeno (Delgado, 2005).

El género *Lactobacillus*, se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos tipo coreineformes. Son microorganismos Gram positivos, anaerobios aerotolerantes pero su crecimiento se ve favorecido en una atmosfera con 5-10% CO<sub>2</sub>; crecen en todos los ambientes con carbohidratos, compuestos proteicos, ácidos nucleicos y vitaminas. El metabolismo puede ser fermentativo y sacarolítico (KandleryWeiss, 1986).

En medio de cultivo con agar, las colonias de *Lactobacillus* son pequeñas (2-5mm), convexas, lisas, con bordes enteros, opacas y sin pigmentos. Algunas especies forman colonias rugosas; otras como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas. Se han diseñado medios ricos ideales para el crecimiento de estos microorganismos; tal es el caso del agar Mann Rogosa Sharpe (MRS), al cual se le puede adicionar sales biliares, cisteína al 0,05% o antibióticos como agentes selectivos (De Man y col., 1960, citado por Contreras, Domínguez, González, 2007).

En su mayoría no presentan actividad proteolítica, tampoco producen indol ni ácido sulfúrico. Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen una pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Respecto a los requerimientos nutricionales son complejos, requieren aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o esterres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Prescott, Harley y Klein, 2004).

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con un desarrollo óptimo entre pH 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 dependiendo la especie y tipo de cepas; de igual forma disminuye notablemente en medios neutros ligeramente alcalinos. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30-40°C). Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido-dismutasas ni catalasas (Bergey, 2001).

En cuanto a la sensibilidad a los antibióticos y drogas se describe en la literatura que los lactobacilos son sensibles a la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram positivas. Raramente son patógenos, en ocasiones puede asociarse a caries dentales y otros procesos infecciosos tales como, abscesos, septicemias y endocarditis bacterianas, provocados por *L. casei* subsp. *rhannosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *L. salivarius* (Bergey, 2001).

Los lactobacilos se ubican en el Phylum *Firmicutes*, Clase III *Bacilli*, Orden II *Lactobacillales*, Género *Lactobacillus* del cual se han descrito más de 200 especies (Bergey, 2001).

Tradicionalmente, *Lactobacillus* spp. se ha ubicado dentro de las BAL, siendo estas clasificadas sobre la base de las propiedades fenotípicas, morfología (cocos o bacilos), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativo o heterofermentativo), temperatura óptima de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes). Así se han definido tres grupos fenotípicos:

1. Lactobacilos homofermentativos que crecen a temperaturas altas (>45°C), como especies representativas encontramos *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *L. lactis* y *L. helveticus*.

2. Lactobacilos heterofermentativos facultativos, como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sakei*.
3. Lactobacilos heterofermentativos obligados, fermenta hexosas a ácido láctico, ácido acético o etanol y dióxido de carbono; una especie representativa de este grupo es *L. kéfir* utilizado en la elaboración del kéfir, otras especies de este grupo son: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. reuteri*.

### **Métodos de conservación bacteriana**

La preservación de bacterias es una etapa crucial para todo laboratorio de investigación, así como para la industria alimenticia y farmacéutica, dado el gran recurso biotecnológico de diversos microorganismos, entre estos las bacterias ácido lácticas reconocidos ampliamente por su uso como probiótico. En el caso de *Lactobacillus* estas bacterias representan un potencial biotecnológico enorme, de tal manera que si guardamos a estos microorganismos, de cierta forma estamos resguardando dicho potencial para futuras generaciones e incluso investigaciones.

El resguardo de las bacterias puede realizarse mediante preservación a corto, mediano y largo plazo. Es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica (Uruburu, 2003; citado por Morales, Duque, Rodríguez, De la torre, Martínez, Pérez, Muñoz, 2010)

Existen diferentes métodos de conservación para los distintos microorganismos, ninguno de ellos es universal por lo que se debe elegir el método que más se ajuste a las condiciones y la infraestructura del laboratorio, además del tipo de microorganismo que se desea preservar.

Para la correcta conservación de los diferentes microorganismos se debe tomar en consideración 3 recomendaciones (García y Uruburu, 2000):

1. Evitar en lo posible contaminación durante el proceso de conservación.
2. Durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan en números elevados.
3. Los microorganismos conservados deben de permanecer genéticamente estables.

La conservación a corto plazo se utiliza cuando los laboratorios no cuentan con suficientes recursos económicos ni con un ultracongelador. El método comúnmente usado es la resiembra continua. Es decir el microorganismo en estudio se siembra en un medio adecuado y una vez crecido se almacena a 4°C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El gran problema de la resiembra continua, es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas domesticadas cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada (Cooper, 2002; citado por Morales y col; 2010).

Para evitar la domesticación y mutación de bacterias, se ha intentado inactivar su metabolismo, mediante técnicas de conservación conocidas como métodos restringidos. Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible en la célula; donde se permite la desecación de bacterias en un soporte inerte y estéril. En este caso las bacterias se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda. (Fages, 1990; Pravakaran y Hoti; 2008, citados por Morales y col; 2010)

Es importante destacar que la desecación en bolitas de alginato es un procedimiento bastante eficaz para preservar bacterias, las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al



aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua, las células son conservadas en tubos estériles, cerrados herméticamente y a una temperatura de entre 4°C y 18°C (Fages, 1990; Pravakaran y Hoti, 2008).

La desecación en sal gorda, es un método usado para halobacterias en el cual, las células se mezclan con una solución de sal y se secan aprovechando la higroscopicidad de la sal; la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por el nivel insuficiente de agua disponible en el medio (García y Uruburu, 2000).

En los métodos de preservación a corto plazo el riesgo de contaminación celular es alto, debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales normales. En el caso específico de desecación, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua razón por la que el número de células viables disminuye notablemente, especialmente para microorganismos sensibles (Potts, 1994).

Las soluciones parenterales tienen una utilidad amplia, ya sea como apoyo en la terapia de reposición hidroelectrolítica, como vehículo para administración de fármacos, en procedimientos de lavados quirúrgicos, lavados oftálmicos, conservación de lentes de contacto, entre otros, por lo que son ampliamente utilizadas en el campo clínico. En microbiología es limitado su uso como medio de cultivo o para la preservación de microorganismos; al respecto, se ha informado que las soluciones glucosadas son eficientes para mantener viables bacterias patógenas a temperatura ambiente; sin embargo, las soluciones salinas, tales como la fisiológica a 0,9%, se consideran inocuas toda vez que carecen de aporte energético en forma de glucosa en solución. Infante, Cano, Medina, Macías y Álvarez (2012) encontraron que la solución salina 0,9% permitió el desarrollo de bacterias con potencial patógeno del género *Klebsiella*.

## ***Viabilidad de Lactobacillus en diferentes matrices***

Históricamente, numerosas sustancias han sido empleadas para vehicular o funcionar como sustrato de los probióticos manteniendo su viabilidad por periodos de tiempo medianos o cortos, lo que ha permitido el desarrollo de productos que hoy en día se conocen como alimentos funcionales, principalmente relacionados al grupo de alimentos lácteos, tendencia que hoy en día está cambiando debido al creciente aumento de personas con problemas de salud relacionados con dichas matrices.

El término alimento funcional (AF) surgió en Japón en la década de los 80's y a partir de entonces ha sido aceptado internacionalmente (Shimizu, 2014) no existe una definición universal, una de las más utilizadas es "aquel alimento convencional, que hace parte de una dieta estándar en cantidades normales, además de aportar un valor nutritivo, ha demostrado tener un beneficio en la salud mediante un efecto fisiológico en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas" En la actualidad, la gama de alimentos funcionales incluye: alimentos para bebés, productos horneados y cereales, productos lácteos, confitería, comidas preparadas, aperitivos, productos cárnicos, pastas para untar y bebidas (Corbo, Bevilacqua, Petruzzi, Casanova, Sinigaglia, 2014). En la industria de alimentos la inclusión de cultivos probióticos se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos como el queso, yogur, helados, entre otros.

La investigación en el desarrollo de soluciones alternativas a los productos probióticos derivados de la leche es una opción en crecimiento dentro de la industria de alimentos, especialmente el diseño de bebidas de frutas y/o vegetales como ingrediente principal es una iniciativa factible (Marín, Cortes y Montoya, 2009).

Las cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* son las más utilizadas en la formulación de nuevos productos probióticos de origen hortofrutícola. Desde el punto de vista del desarrollo tecnológico, la inclusión de diferentes microorganismos para procesos fermentativos es un método biopreservación tradicional para la fabricación de alimentos, que puede ser considerado una herramienta biotecnológica sencilla, relativamente económica y valiosa para mantener o mejorar la seguridad, propiedades sensoriales y la vida útil de productos hortofrutícolas. La información disponible sobre las matrices vegetales como fuente de aislamiento de microorganismos probióticos es menor en comparación con los utilizados en productos lácteos. Adicionalmente es necesario realizar nuevos estudios sobre microorganismos nativos de alimentos vegetales en relación a supervivencia, frente a los desafíos tecnológicos, criterios de fermentación, uso como cultivos iniciadores y relación ecológica (Bernal, Díaz-Moreno y Gutiérrez-Cortés).

Las matrices vegetales son fuentes fundamentales de agua, vitaminas, fibra, minerales y fitoquímicos significativos para la dieta humana y para los cultivos probióticos. Especialmente las bebidas de fruta son consideradas vehículos de inclusión para estos microorganismos debido a las ventajas funcionales que presentan como fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos y su mayor digestibilidad. No obstante, las condiciones ácidas en las bebidas a base de frutas y/o vegetales puede afectar la viabilidad de los microorganismos. Algunos estudios recientes han demostrado que algunas cepas son capaces de crecer y sobrevivir a niveles estables (superior a  $10^7$  UFC/ml) en bebidas de fruta generando un aumento en el consumo como vehículos de inclusión para microorganismos probióticos (Bernal y col., 2017).

En general, de acuerdo con los estudios realizados, el crecimiento y la viabilidad de las bacterias probióticas en lácteos y bebidas de frutas y

verduras depende de la especie y cepa de la bacteria utilizada, el pH y la concentración de ácido láctico y ácido acético del producto final, entre otros factores.

Una técnica usualmente utilizada en la protección de bacterias benéficas consiste en recubrir la bacteria usando biopolímeros funcionales. La microencapsulación es una técnica que consiste en envolver un principio activo con el fin de protegerlo frente a condiciones ambientales deletéreas. Los microorganismos en estado libre pierden completamente su viabilidad a los 180 minutos de exposición a pH gástrico simulado. Por tal motivo, la micro-encapsulación podría ser una técnica útil en la producción de alimentos funcionales manteniendo los niveles terapéuticos de las bacterias probióticas (González, Cuello, Pérez y Morón, 2015).

Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, delgada, e impermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm. Para preparar las microcápsulas existen numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos; siendo la metodología de gelación iónica un proceso desarrollado principalmente para inmovilizar células bacterianas, además no requiere el uso de elevadas temperaturas ni de solventes orgánicos. Dentro de las matrices más empleadas para la microencapsulación se encuentra el alginato y la goma gelana (Rosas-Flores, Ramírez, Salazar-Montoya, 2013).

Las soluciones mixtas o parenterales se definen como preparaciones estériles que contienen uno o más principios activos destinados a administración por inyección, infusión o implantación en el cuerpo. La solución salina 0,9% es ampliamente utilizada en el laboratorio clínico como diluyente y solución de lavado en diferentes procedimientos; específicamente en microbiología la SSF se utiliza en la preparación de suspensiones bacterianas para inocular diferentes pruebas fisiológicas o bioquímicas. Cabe

mencionar que en el área de Micología se ha empleado para la conservación a corto, mediano y largo plazo de diferentes grupos de hongos filamentosos. En la literatura científica son pocos los estudios sobre viabilidad de especies bacterianas en SSF; en este contexto, Infante y col. (2012) demostraron la capacidad de las enterobacterias de mantenerse viables en la solución salina a 0,9%, mostrando un incremento significativo en el conteo bacteriano a lo largo de 24 h de almacenaje a 35°C ( $F = 8,35$ ,  $p = 0,0145$ ). Para la mayoría de los organismos el crecimiento fue mejor que en la solución de dextrosa a 5%.

Con relación a viabilidad de *Lactobacillus* spp. en SSF no se encontraron artículos relacionados en las diferentes bases de datos disponibles.

### Definición de Términos

**Viabilidad:** Es la característica que posee un microorganismo de replicarse o transferir material genético.

**Contaje de colonias:** es una técnica que se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra, las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho y col., 2009).

**Unidades formadoras de colonias:** Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o es capaz de formar la colonia, es decir una UFC (Camacho y col., 2009).

**Conservación:** Es una etapa crucial para el mantenimiento de las características morfológicas de un microorganismo mediante el uso de diferentes técnicas. El corto tiempo de generación de muchos microorganismos y la posibilidad de cambios genéticos, conlleva al concepto de “stock semilla como una estrategia para el manejo de la conservación de cultivos bacterianos a nivel mundial.

**Solución salina fisiológica:** Es una sustancia también denominada isotónica por su similitud con la osmolaridad del plasma (aproximadamente 300mosmol/L) pues no cambia la osmolaridad del plasma y no aumenta el contenido cerebral del agua.

### Operacionalización de las Variables

Tabla 3. Operacionalización de la Variable Dependiente.

Evento	Definición Conceptual	
Viabilidad de <i>Lactobacillus</i> spp.	Un microorganismo es viable cuando es capaz de replicarse o de transferir material genético	
Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores
La viabilidad de los microorganismos se mide a través de la técnica de dilución en agar, donde se observará el crecimiento bacteriano representado en UFC/ml.	Aumento de UFC/ml  Disminución de UFC/ml	Por encima de $1 \times 10^8$  Menor a $1 \times 10^8$

Suárez y Sánchez, 2018

**Tabla 4. Operacionalización de la variable independiente: temperatura.**

<b>Evento</b>	<b>Definición Conceptual</b>	
Temperatura de conservación	Temperatura a la cual se puede mantener viable un microorganismo mediante el uso de diferentes técnicas de conservación bacteriana. Esta se expresa en grados centígrados (°C).	
<b>Definición Operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Se estandarizará la temperatura de almacenaje mediante el uso de termómetro.	Temperatura ambiente (25°C)  Temperatura de refrigeración (4°C)	Crecimiento a T.A.  Crecimiento a 4°C

Suárez y Sánchez, 2018

**Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente: tiempo.**

<b>Evento</b>	<b>Definición Conceptual</b>	
Tiempo de almacenaje	Período determinado durante el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento.	
<b>Definición Operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Se establecerá por días hasta completar 7 días de almacenaje	Día 0 hasta día 7	Contaje de UFC/ml cada día

Suárez y Sánchez, 2018

**Tabla 6. Operacionalización de la variable interviniente: Muerte bacteriana.**

<b>Evento</b>	<b>Definición Conceptual</b>	
Muerte bacteriana	Momento en que un microorganismo pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse	
<b>Definición Operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Se determinó en las placas cultivo	Ausencia de Crecimiento	0 UFC/ml

Suárez y Sánchez, 2018

**Tabla 7. Operacionalización de la variable interviniente: contaminación.**

<b>Evento</b>	<b>Definición Conceptual</b>	
Contaminación	Es la presencia de microorganismos indeseados que puede darse en el laboratorio a casusa de: el Operador  La manipulación, la atmósfera, las superficies, los utensilios o los medios y soluciones.	
<b>Definición Operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Se determinó mediante la observación macroscópica de los cultivos y características microscópicas	Contaminación por Bacterias  Contaminación por Levaduras  Contaminación por Hongos	Morfotipos distintos a Lactobacilos.  Colonias distintas a las descritas en Lactobacilos.

Suárez y Sánchez, 2018



## **Sistema de Hipótesis**

*Hipótesis Nula:* La solución salina 0,9% no permite mantener la viabilidad de *Lactobacillus* spp. a temperatura ambiente ni a 4°C.

*Hipótesis Alternativa:* La solución salina al 0,9% permite mantener la viabilidad de *Lactobacillus* spp a 4°C y a T.A..

www,bdigital.ula.ve

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo investigación**

Según Hurtado (2007) la presente investigación se encuentra dentro del tipo evaluativa ya que su objetivo es evaluar los resultados, el impacto, la efectividad de uno o más programas, propuestas, inventos o planes de acción, que han sido, o están siendo aplicados dentro de un contexto determinado. Este tipo de investigación se diferencia de la confirmatoria en que los resultados que intenta obtener son más específicos y se orientan hacia la solución de un problema concreto en un contexto social o institucional determinado.

#### **Diseño de la Investigación**

El estudio se desarrollará dentro de un diseño de tipo experimental, puesto que el investigador intervendrá sobre las variables independientes o sobre los procesos causales y los modificará de manera intencional y planificada para ver los efectos, pero además hará un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios hayan sido originados por otros factores distintos a las variables independientes (Hurtado, 2007).

## **Población y muestra**

### ***Unidad de investigación***

La unidad de estudio estuvo conformada por 3 cepas de *Lactobacillus* spp. de diferentes orígenes, las características de cada cepa se especifican en el Anexo 1.

- *L. plantarum* ATCC 8014
- *L. plantarum* Lb04
- *L. acidophilus* Lb05

### **Sistema de Variables.**

#### ***Variable Dependiente:***

- Viabilidad de *Lactobacillus* spp.

#### ***Variables Independientes:***

- Tiempo de conservación
- Temperatura de conservación

#### ***Variables intervinientes:***

- Concentración bacteriana
- Contaminación
- Muerte bacteriana

## Procedimiento

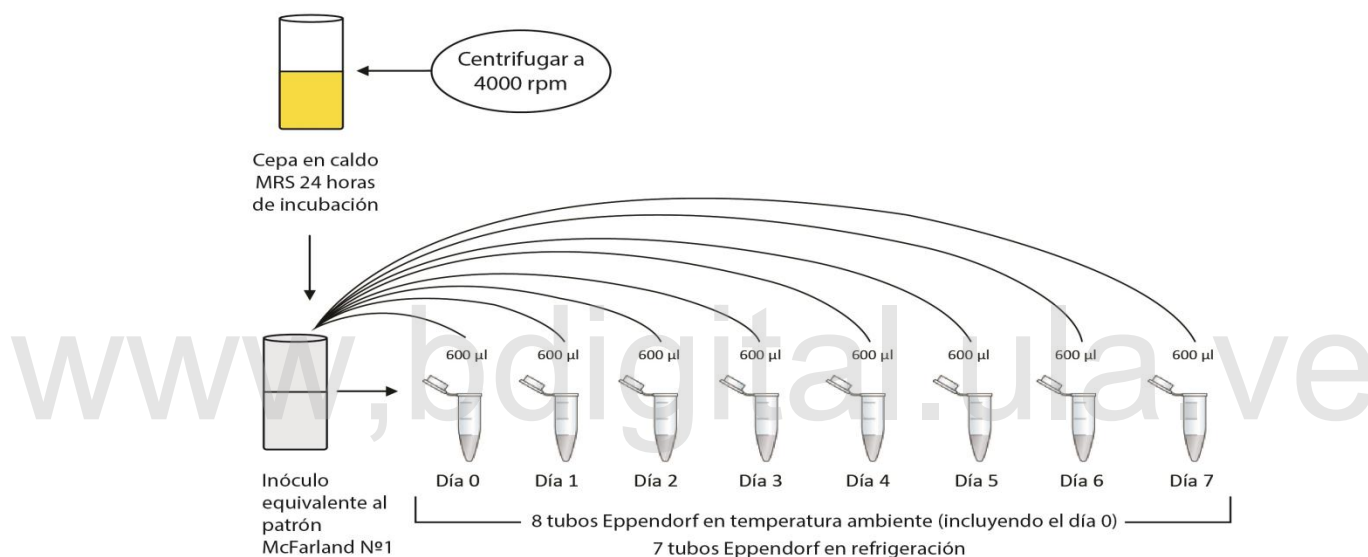
El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “*Prof. Celina Araujo de Pérez*”, adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela; durante el periodo marzo-abril de 2018.

Para llevar a cabo el estudio de la viabilidad de los lactobacilos, se aplicó la técnica de contaje de colonias por dilución en agar (Camacho y col., 2009).

**Primera etapa:** Preparación de las suspensiones bacterianas para el estudio (Figura 1):

1. Las cepas conservadas por liofilización fueron restituidas utilizando caldo MRS, incubados en microaerobiosis, a 35°C por 18-24h.
2. A partir del crecimiento en caldo MRS, cada cepa se repicó en agar MRS, las placas ser incubaron en microaerobiosis, a 35°C por 18-24h.
3. A partir de cada aislamiento se evaluó pureza del microorganismo a través de las características coloniales, tinción de Gram y prueba de la catalasa.
4. De las purezas de cada cepa se inoculó un caldo MRS incubándose bajo las condiciones microaerobiosis, a 35°C por 18-24h.
5. Se dispensó 20 µl de cada cepa pura de *Lactobacillus* spp. en 5 ml de caldo MRS, se incubó en microaerobiosis, a 35°C por 18-24h.
6. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos.
7. Se descartó el sobrenadante de cada tubo, con el sedimento se preparó suspensiones bacterianas en SSF estéril ajustados al patrón Mc Farland 1.

8. Luego se procedió a leer la densidad óptica de cada suspensión de lactobacilos a 540 nm. Se registraron las lecturas.
9. De cada suspensión bacteriana se dispensó 300 µl en 14 tubos eppendorf, esto con el fin de almacenar 7 muestras a temperatura ambiente y los otros 7 en refrigeración (4 °C).
10. Se realizó el conteo de colonias correspondientes al día cero (0) para determinar las UFC/ml iniciales.



**Figura 1. Preparación de las suspensiones bacterianas para el estudio.**

**Segunda etapa:** determinación de la viabilidad de *Lactobacillus* spp. Diariamente por espacio de siete días, se realizó el conteo de colonias por el método de dilución en placa a partir de cada uno de los tubos eppendorf conteniendo la suspensión bacteriana correspondiente a cada cepa de *Lactobacillus* spp, tanto del tubo almacenado a T.A. como a 4°C (Figura 2).

- 1) Se dispensó 900µl de solución salina fisiológica en 8 tubos eppendorf debidamente rotulados con el nombre de la cepa, número de dilución y temperatura a la cual se incubó.

- 2) Se inoculó 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana contenida en el tubo del día 1 a TA en la serie de tubos para la realización de las diluciones seriadas correspondientes (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ ), lo mismo se hizo a partir de la muestra almacenada a 4°C.
- 3) Las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  fueron sembradas por extensión sobre superficie en agar MRS, utilizando una varilla de vidrio en forma de L. La siembra se realizó por duplicado para cada dilución.
- 4) Las placas fueron incubadas en microaerobiosis, a 37°C por 24-48 horas.
- 5) El recuento de las placas se llevó a cabo en un contador de colonias, tomando en cuenta aquellas donde se observara un número de colonias entre 25-250.
- 6) Los resultados se registraron en una tabla de recolección de datos diseñada para tal fin (Anexo 2).

www.bdigital.ula.ve

### **Diseño de análisis**

El diseño de análisis se fundamentó en un enfoque cuantitativo; los resultados fueron analizados a partir de ANOVA, utilizando el método LSD (mínimas diferencias significativas) como método de comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). El análisis de varianza se efectuó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

PROCEDIMIENTO N° 2

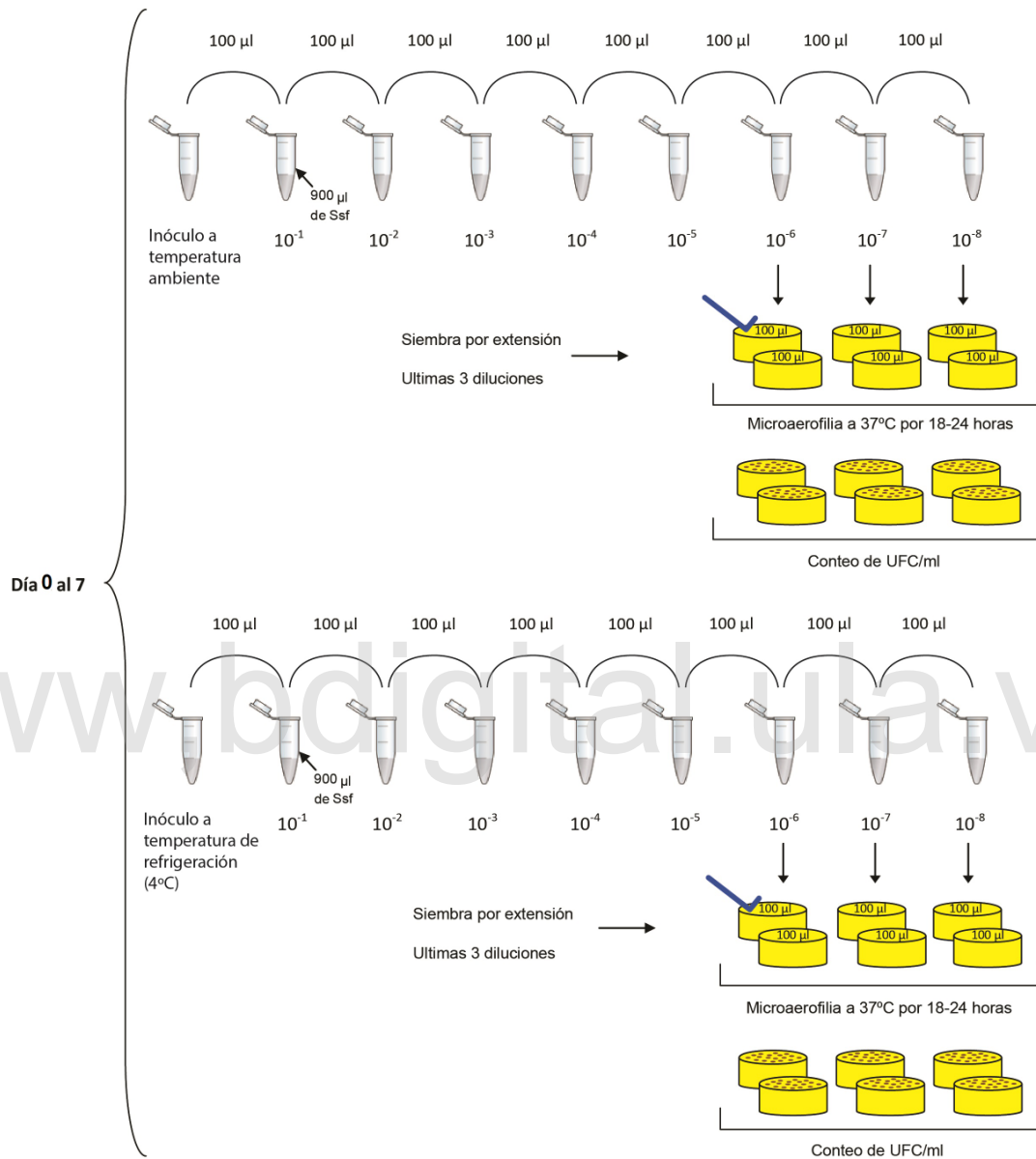


Figura 2. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus* spp.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Resultados

Todas las cepas conservadas en liofilización fueron reactivadas exitosamente en caldo MRS, manteniendo uniformidad en las características fenotípicas, como: tipo colonial, morfología microscópica y reacción al Gram (Anexo 4).

En cuanto al estudio de la viabilidad de *Lactobacillus* spp. en solución salina fisiológica se encontraron los siguientes resultados:

#### 1. Contaje de colonias:

1.1 Cepa Lb04: En la Tabla 8 se presentan los promedios de las UFC/ml de la cepa Lb04 durante 7 días de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración; se puede observar que a los 7 días se obtienen conteos promedios de  $5,2 \pm 2,28 \times 10^7$  y  $2,88 \pm 1,69 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente. En el transcurso del tiempo se observa disminución de la densidad poblacional hasta de 3 ciclos logarítmicos.

1.2 Cepa Lb05: En la Tabla 9 se presentan los promedios de las UFC/ml de la cepa Lb05 durante 7 días de almacenamiento, a



temperatura ambiente se obtuvieron conteos promedios de  $2,66 \pm 1,63 \times 10^8$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  se registró un conteo de  $2,85 \pm 1,69 \times 10^8$  UFC/ml. En el transcurso del tiempo se observa disminución de la población bacteriana alrededor de 1 ciclo logarítmico, considerando el crecimiento inicial y final del tratamiento.

1.3. ATCC 8014: En la Tabla 10 se presentan los promedios de las UFC/ml de la cepa 8014, se puede observar que a los 7 días se obtienen conteos promedios de  $1 \pm 1 \times 10^8$  UFC/ml a T.A. y de  $5,2 \pm 2,28 \times 10^7$  UFC/ml a  $4^{\circ}\text{C}$ . En el transcurso del tiempo se observa disminución de la densidad bacteriana entre 2 a 3 ciclos logarítmicos.

**Tabla 8. Promedio y logaritmo del conteo de colonias de la cepa Lb04**

Día	$\bar{X}$ TA	Log de $\bar{X}$ TA	$\bar{X}$ $4^{\circ}\text{C}$	Log de $\bar{X}$ $4^{\circ}\text{C}$
0	1,56E+10	9,993	1,56E+10	-
1	8,24E+09	9,915	2,27E+09	9,355
2	2,65E+09	9,423	1,50E+09	9,176
3	4,68E+08	8,670	5,62E+08	8,749
4	2,85E+08	8,454	1,56E+08	8,193
5	5,95E+08	8,774	1,10E+08	8,041
6	3,00E+08	8,477	8,30E+07	7,919
7	5,20E+07	7,716	2,88E+08	8,459

$\bar{X}$ : promedio; TA: temperatura ambiente; Log: logaritmo base 10

**Tabla 9. Promedio y logaritmo del contaje de colonias de la cepa Lb05**

Día	$\bar{X}_{TA}$	Log de $\bar{X}_{TA}$	$\bar{X}_{4^{\circ}C}$	Log de $\bar{X}_{4^{\circ}C}$
0	2,02E+09	9,305	2,02E+09	-
1	8,42E+08	8,925	9,22E+08	8,964
2	5,45E+08	8,736	1,80E+09	9,255
3	2,02E+08	8,305	4,16E+08	8,619
4	5,44E+08	8,735	9,10E+07	7,959
5	4,43E+08	8,646	1,42E+09	9,152
6	1,30E+09	9,114	4,00E+06	6,602
7	2,66E+08	8,424	2,85E+08	8,454

$\bar{X}$ : promedio; TA: temperatura ambiente; Log: logaritmo base 10.

**Tabla 10. Promedio y logaritmo del contaje de colonias de la cepa 8014**

Día	$\bar{X}_{TA}$	Log de $\bar{X}_{TA}$	$\bar{X}_{4^{\circ}C}$	log de $\bar{X}_{4^{\circ}C}$
0	1,52E+10	10,182	1,52E+10	-
1	7,68E+09	9,885	3,13E+09	9,495
2	1,52E+09	9,182	2,06E+09	9,313
3	1,70E+08	8,230	2,04E+09	9,308
4	7,52E+08	8,876	1,26E+08	8,100
5	2,39E+08	8,378	5,95E+08	8,774
6	1,00E+08	8,000	1,00E+06	6,000
7	1,00E+08	8,000	5,20E+07	7,716

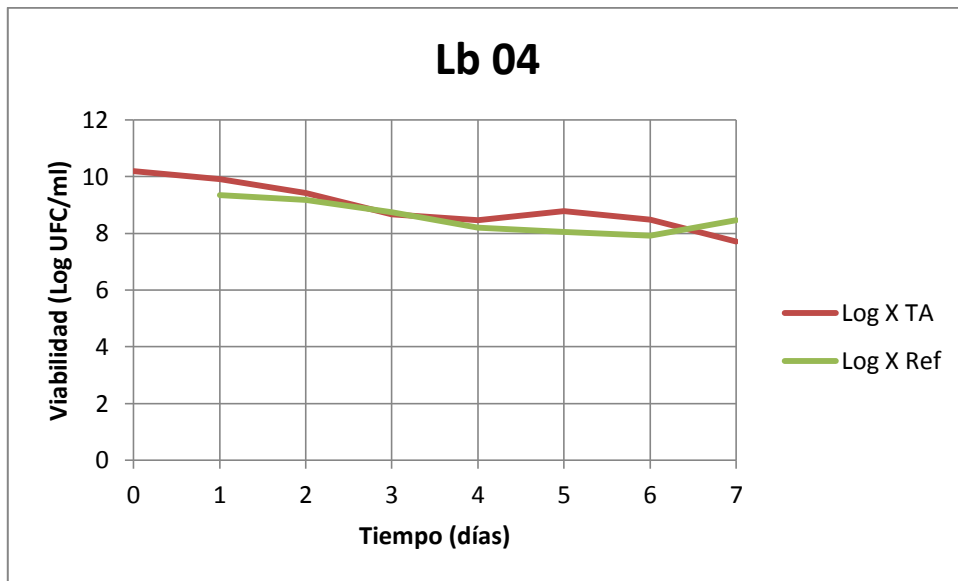
$\bar{X}$ : promedio; TA: temperatura ambiente; Log: logaritmo base 10.

## 2. Viabilidad de *Lactobacillus* spp. en solución salina 0,9%:

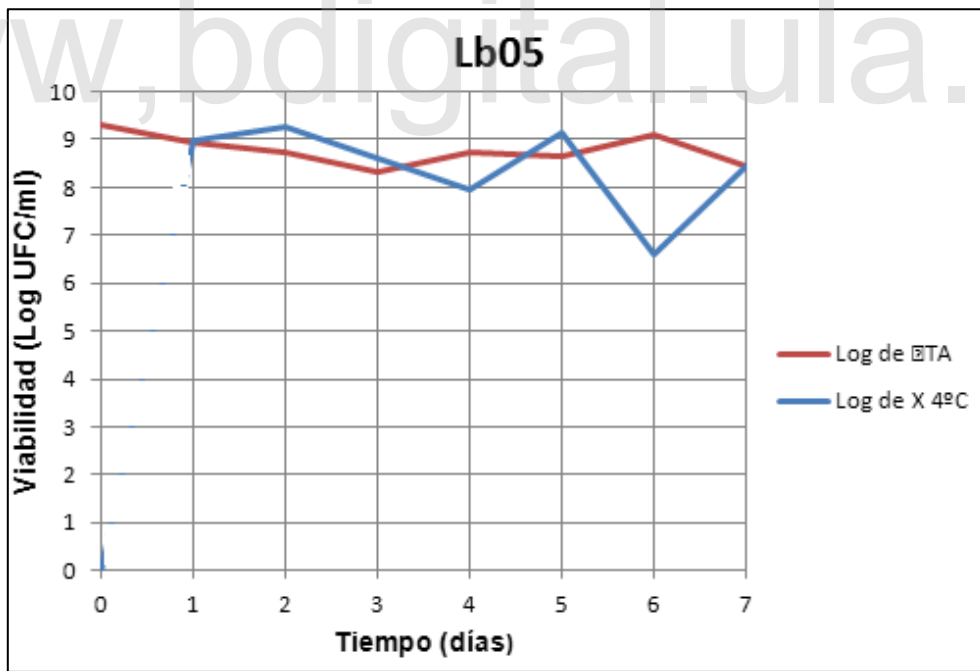
2.1. Cepa Lb04: En el Gráfico 1 se muestran los resultados de la viabilidad de Lb04 a lo largo del período de almacenamiento a T.A. y a 4°C; de acuerdo al análisis no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $F=0,663$ ,  $p=0,738$ ) en la viabilidad de Lb04 a T.A., comparado con la cepa control. Los resultados en refrigeración no se pudieron comparar debido a fallas técnicas. Sin embargo, se observa que la cepa mostro un comportamiento uniforme sin diferencias significativas entre los dos tratamientos de temperaturas aplicados.

2.2 Cepa Lb05: En el Gráfico 2 se muestran los resultados de la viabilidad de Lb05 a lo largo del período de almacenamiento tanto a T.A. como a 4°C; según el análisis se observó diferencias significativas ( $F= 1572,458$ ;  $p=0,019$ ) en la viabilidad de Lb05 a T.A. comparado con el control. Con respecto, a la viabilidad en refrigeración de Lb05 no se observó diferencias estadísticas ( $F= 18,414$ ;  $p=0,177$ ). Al final del periodo de almacenamiento se observó diferencias entre la viabilidad a T.A. y la refrigeración, dado posiblemente por una falla técnica durante el experimento.

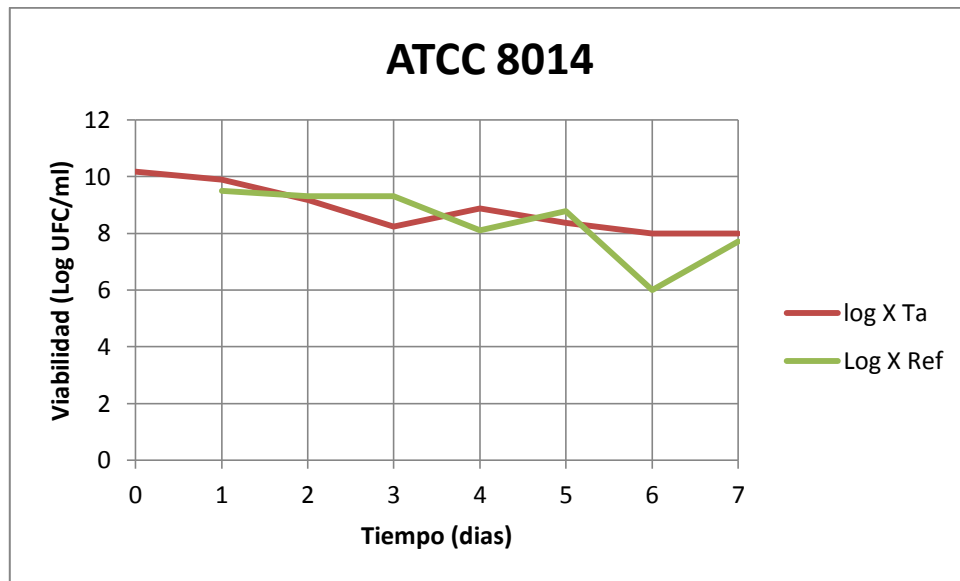
2.3 Cepa ATCC 8014: En el Gráfico 3 se presenta la viabilidad de la cepa control; a lo largo del período se observó un comportamiento uniforme entre los dos tratamientos hasta el día 6 cuando se manifiesta una disminución significativa del crecimiento bacteriano ( $F=1190,007$ ;  $p=0,02$ ) que no se corresponde con el desarrollo mostrado a T.A.



**Gráfico 1. Viabilidad de Lb04 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C por siete días.**



**Gráfico 2. Viabilidad de Lb05 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C por siete días.**



**Gráfico 3. Viabilidad de ATCC 8014 en solución salina fisiológica durante su almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C por siete días.**

www.bdigital.ula.ve

## Discusión

El presente trabajo sobre viabilidad de Lb04 y Lb05 arrojó resultados inéditos e interesantes por su aplicabilidad en el campo de la preservación de microorganismos a corto plazo. Los hallazgos indicaron un buen comportamiento de ambas cepas en SSF almacenados durante 7 días, con niveles superiores a  $10^7$  UFC/ml, criterio considerado en lácteos para definir un alimento como probiótico (FAO/WHO, 2001).

Los productos que contienen probióticos, deben almacenarse en refrigeración para mantener una alta viabilidad (Shori, 2016); en este estudio aunque no se encontró ningún efecto desfavorable sobre la viabilidad de Lb04 y Lb05 almacenados a T.A. y a 4°C; no obstante, se presentó en ambas cepas una disminución en los recuentos realizados bajo los dos tratamientos de incubación. Tanto el control como la cepa Lb05 mostraron un punto de inflexión alrededor del día 6 de almacenamiento en refrigeración, al analizar este comportamiento se observaron diferencias significativas en el conteo bacteriano, siendo probable que los cambios bruscos de temperatura incidan en la viabilidad del microorganismo. Al respecto, es importante mencionar que durante la realización del ensayo se sucedieron constantes cortes en la electricidad (factor que no se pudo controlar) que afectaron los equipos eléctricos del laboratorio.

Jaskari (1998), encontró que los recuentos realizados de *Lactobacillus plantarum* en quesos refrigerados disminuyeron igual que en el control, pero aun así permanecía una cantidad viable.

En algunos productos funcionales la tendencia en el recuento de células viables tiende a disminuir en el transcurso del almacenamiento, es por ello que se destaca la importancia de lograr un alto recuento de microorganismos probióticos el día cero de elaboración del producto (Gutiérrez y Gómez,

2008; Bernal y col., 2017); en este sentido se corrobora que la concentración inicial del microorganismo seleccionada (comparable al patrón 1 McFarland, D.O. a 540nm= 0,270-0,335) para este ensayo fue adecuada.

Por otra parte, muchos alimentos funcionales tienen una vida media corta, ya que influye el tiempo de expiración del producto (Vergara, 2007); en este sentido la SSF, no presenta problemas de deterioro en vista de que no contiene sustratos fermentables, ni hidrolizables.

La literatura señala que una de las características que más se afecta durante el proceso de conservación de microorganismos son la morfología y las propiedades tintoriales del microorganismo (Bergey, 2001); en el presente trabajo ambas cepas mantuvieron estables estas características fenotípicas a lo largo del estudio, como lo evidencia el estudio morfológico realizado.

Bajo las condiciones de este ensayo, los hallazgos encontrados confirman que la SSF puede ser utilizada para la preservación de lactobacilos probióticos por siete días, sin menoscabo de su viabilidad por efecto de la temperatura, siempre y cuando no se exponga a cambios bruscos de la misma. El análisis estadístico permitió rechazar la hipótesis nula propuesta.

En la literatura científica disponible no se consiguieron estudios similares para comparar nuestros resultados, por lo tanto se recomienda seguir los estudios de viabilidad de Lactobacilos en diferentes medios o sustratos, que resulten económicos, accesibles y que no ocasionen daños a las células bacterianas, con el fin de utilizarlos ya sea como vehículos de cepas probióticas o para su preservación.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

1. Las cepas *L. plantarum* (Lb04) y *L. acidophilus* (Lb05) permanecieron viables y en contajes de colonias superiores a  $10^7$  UFC/ml en SSF durante el almacenamiento a T.A. y a 4°C por espacio de 7 días.
2. Las evaluaciones de los recuentos indican que la SSF es un vehículo adecuado para la administración de microorganismos probióticos, pues permite la sobrevivencia de estos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores.
3. Los cambios bruscos de temperatura afectaron significativamente la viabilidad de *L. acidophilus* (Lb05) y la cepa control.
4. La SSF resultó útil para la preservación a corto plazo de *L. plantarum* (Lb04) y *L. acidophilus* (Lb05).



## Recomendaciones

- Evaluar la viabilidad de lactobacilos en SSF por un espacio de tiempo más amplio.
- Evaluar las características fisiológicas y la capacidad probiótica de las cepas sometidas a almacenamiento en SSF.
- Dar a conocer los hallazgos de este estudio en el campo farmacéutico e industrial.
- Realizar estudios de viabilidad a cada cepa de *Lactobacillus* spp. que se requiera preservar en SSF.

www.bdigital.ula.ve

## BIBLIOHEMEROGRAFIA

Acevedo, E; García, M; Páramo, M y Díaz; C (2016). Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* en néctar de mango (*Mangifera indica* Tommy Atkins). *Agronomía Colombiana* 34 (1supl). doi: 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58125

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

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Garrity, G.M. y otros (eds.). Springer. 2001 (volumen 1).

Bernal, C., Díaz-Moreno C, Gutiérrez-Cortés, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Rev. chil. nutr.*, 44 (4)

Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B., Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. (2ª ed.). México, Facultad de Química, UNAM.

Castro, L., Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Med*, 37(4):308-314.

Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, Casanova FP, Sinigaglia M. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2014; 13(6):1192-1206.

Contreras, M. E; Domínguez, R; González, A (2007) Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera. Tecnol. Ciencia recuperado de <http://www.imiq.org/documentos/8102007133343.pdf>

De la Cruz, A; Terán, A (2013). Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba (Tesis de pregrado). Escuela de Agricultura Panamericana, Zamora, Honduras.

Fages J (1990) An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculants for crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:473-478.

FAO/OMS (2001). Guía para la Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la leche en polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina.

Frank J, Hassan A. Starters cultures and their use. En: Elmer M, Steele J. (editores). New Cork: Marcel Dekker, INC. 1998

Fuller, R.1989. Probiotics in man animals. *Journal Applied Bacteriology.* 66: 365-378.

García López M. D. y Uruburu Fernández F (2000). La conservación de cepas microbianas. Valencia (España) Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia). En: E-mail: [cect@uv.es](mailto:cect@uv.es). <http://www.uv.es/cect>.

Gil-Loyzaga, P. E. (2001). Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Recuperado de <https://books.google.co.ve/books?id=nQ9ZBQAAQBAJ&pg=PA103&d>

Gutiérrez, A.; Gómez J.; Arias, L.; Tangarife B. (2008). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Revista Lasallista de Investigación*, 4 (2): 37-42.

Infante, V; Cano, A; Valdovinos, H; Alejandro E. Macías & Álvarez, J (2012). *Solución salina como medio de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales*. *Revista de investigación clínica*, 64(2), 120-125.

Kim, H. S., & Gilliland, S. (1983). *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *Journal of Dairy Science*, 66, 959–966.

Lewandowski CM. *Advances in Fruit Processing Technologies*. Vol. 1, The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference. 2015, p 1689-1699.

Lourens-Hattingh, A & Viljoen, B (2001). Yogurt as probiotic carrier food *Internacional Dairy Journal* 11, 1-17.

Lourenço, M; Kuritza, L; Westphal, P; Miglino, L; Pikler, L; Dos Santos, M; Kraieski, A y Santin, E (2012). *Lactobacillus* spp. en el agua de bebida para el control de Salmonella Minnesota en pollos de engorde. Recuperado de <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11643/articulos-aves-archivo/lactobacillus-spp.-en-el-agua-de-bebida-para-el-control-de-salmonella-minnesota-en-pollos-de-engorde.html>

Martín, R.; Soberón, N.; Vazquez, F. y Suarez, J. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 26(3):160-167.

Marin, Z; Cortéz, R y Montoya, O (2009). Evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 16(2) ,210-217.

Moscote-Salazar, L; &Alvis-Miranda, H (2015). Fluidoterapia en Neurotrauma. Recuperado de <https://books.google.co.ve/books?idu4gzBgAAQBAJ&A34&dq=solucion+salina+fisiologica+historia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewiZsc2N3uraAhWE3YMKHYY6BJgQ6AEIJTAA#v=onepage&q=solucion%20salina%20fisiologica%20historia&f=f> lse

Morales Y, Duque E, Rodríguez O, De la torre J, Matinez D, Pérez R, Muñoz J (2010) Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* A.C Vol. 14. N°2 Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/235901617\\_Bacterias\\_Preservadas\\_una\\_Fuente\\_Importante\\_de\\_Recursos\\_Biotecnologicos](http://www.researchgate.net/publication/235901617_Bacterias_Preservadas_una_Fuente_Importante_de_Recursos_Biotecnologicos)

OMGE (2008). Guías prácticas de la OMGE Probióticos y prebióticos. Milwaukee USA.

O'Sullivan, D, (1996). Metabolism of bifidogenic factors by gut flora and overview. *Bulletin FIL/IDF* 313: 23-30.

Prescott, L.; Harley, J y Klein. D. (2004). *Microbiología*. (5ªed). Madrid, España: McGraw- Hill.

Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Ferrer-Cebrian, R., & Monteoliva-Sanchez, M. (2005). Probiotics and biotherapy. *Recent Research Developments in Microbiology* 9 (1), 97-127.

Rodríguez, M. (2008). “Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora”. Tesis doctoral no publicada, Universidad autónoma de Barcelona, Barcelona.

Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E., Salazar-Montoya, J. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydr Polym.* 98(1):1011- 7. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.06.077.

Rybka, S., a Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 50(2), 51–57

Saulnier D., Spinler J, Gibson G.R. & Versalovic J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 135–141.

Shimizu M. (2014). History and Current Status of Functional Food Regulations in Japan. Second Edi. *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World: Second Edition*. Elsevier Inc; 257-263.

Shori AB. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Biosci* 2016; 13: 1-8.

Ueharaa, S., Mondena, K., Nomotob, K., Reiko, Y., Hiromi, K. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus vaginal*

suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 28: 30-34.

Vasiljevic T. & Shah N. P. (2008). Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.

Vergara, A (2007). *Estudio de la Viabilidad de Lactobacillus casei en Jugo de Pera*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. [http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/.../III-conservacion de cultivos.ppt](http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/.../III-conservacion_de_cultivos.ppt)

www,bdigital.ula.ve

## **ANEXOS**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



## Anexo 1

### Características de las cepas en estudio

CEPA	Código de Identificación	Origen	Características probióticas	Fuente
<i>Lactobacillus plantarum</i> 174	Lb04	Queso fresco artesanal	Resistencia a pH 3 y 4/4h, crecimiento en sales biliares, efecto antagónico sobre grampositivos y gramnegativos. Activa respuesta inmune innata y adaptativa. No provoca efectos nocivos a la mucosa intestinal	Salas, (2001)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 14V2	Lb05	Fluido vaginal	Resistencia a pH 3 y 4/4 h, resistencia a en sales biliares 0,30%. Efecto antagónico sobre grampositivos. Activa respuesta inmune innata y adaptativa.	Salas, (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	-	No probiótica	Colección de cepas tipo americanas

## Anexo 2

### Instrumento de recolección de Resultados

Cepa	Dilución	Placa 1	Placa 2	$\bar{X}$ colonias por cepa	UFC/ml
ATCC 8014					
ATCC 8014					
ATCC 8014					
Lb 04					
Lb 04					
Lb 04					
Lb05					
Lb05					
Lb05					

### Anexo 3

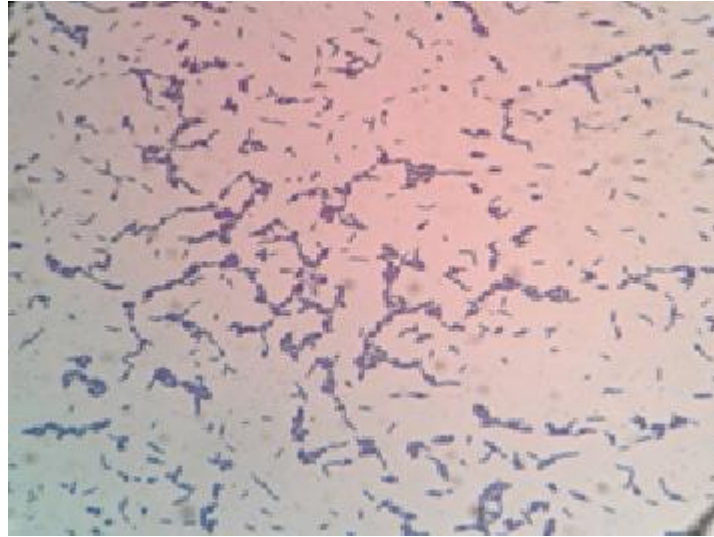
#### Análisis estadístico ANOVA

ANOVA						
		Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	P-Value
Cepa 8014 ref	Entre grupos	21957056390000 000000,000	6	3659509398000 0002000,000	1190,007	,022
	Dentro de grupos	30752000000000 000,000	1	3075200000000 0000,000		
	Total	21960131590000 0000000,000	7			
Cepa Lb04 ref	Entre grupos	18232383550000 0000000,000	6	3038730592000 0000000,000	23365,864	,005
	Dentro de grupos	13005000000000 00,000	1	1300500000000 000,000		
	Total	18232513600000 0000000,000	7			
Cepa Lb05 ref	Entre grupos	43619855000000 00000,000	6	7269975833000 00000,000	18,414	,177
	Dentro de grupos	39480500000000 000,000	1	3948050000000 0000,000		
	Total	44014660000000 00000,000	7			
Cepa Lb04 TA	Entre grupos	20993013750000 00000,000	6	3498835625000 00000,000	,653	,738
	Dentro de grupos	53561250000000 0000,000	1	5356125000000 00000,000		
	Total	26349138750000 00000,000	7			
Cepa Lb05 TA	Entre grupos	19824762540000 0000000,000	6	3304127089999 9998000,000	1572,458	,019
	Dentro de grupos	21012500000000 000,000	1	2101250000000 0000,000		
	Total	19826863790000 0000000,000	7			

Estadístico: Alexis Melo.

#### Anexo 4

#### Gram de subcultivo de LB04



#### Anexo 5

#### Cultivo de LB04

