



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS
AISLADAS DE UNA MUESTRA DE KÉFIR DEL
ESTADO DE HIDALGO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PAULINA ITZEL CALVARIO YÁÑEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., AÑO 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: GLORIA DÍAZ RUIZ

VOCAL: FRANCISCO RUÍZ TERÁN

SECRETARIO: KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ

1er. SUPLENTE: ALEIDA MINA CETINA

2° SUPLENTE: ELSI IDELI JUÁREZ ARROYO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUSTENTANTE:

PAULINA ITZEL CALVARIO YÁÑEZ

RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT/UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN-223917 “Combinando la microbiología y bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

ÍNDICE

Abreviaturas y

símbolos.....1

Resumen.....3

Introducción.....4

Antecedentes

1. Kéfir.....6

1.1 Proceso de elaboración.....7

1.2 Microbiota característica del kéfir.....8

2. Bacterias ácido-lácticas.....8

2.1 Ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas y el proceso de
fermentación.....9

2.2 Clasificación de BAL según el proceso
fermentativo.....10

2.3 Producción de metabolitos
funcionales.....11

3. Probióticos y los beneficios del consumo del
kéfir.....13

3.1 Beneficios en la salud.....13

3.2 Efecto nutricional del kéfir.....14

3.3 Efecto antimicrobiano.....14

3.3.1 Bacteriocinas.....15

4. Microorganismos patógenos y de cavidad oral, impacto
en la salud.....16

4.1 *Streptococcus*
mutans.....18

4.2 *Streptococcus oralis*.....20

4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i>	22
4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4.5 <i>Escherichia coli</i>	23
4.6 <i>Salmonella</i> Typhimurium	25
4.7 <i>Bacillus cereus</i>	26
4.8 <i>Enterococcus faecalis</i> (conocido anteriormente como <i>Streptococcus faecalis</i>)	26
Justificación	29
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Metodología	31
Resultados y discusión	40
Conclusiones	93
Perspectivas	94
Referencias	95
Anexos	105

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BAL Bacterias ácido-lácticas

BHA Agar cerebro corazón

BHI Infusión cerebro corazón

mL Mililitros

μL Microlitros

GRAS Generalmente reconocido como seguro

ADP Adenosín difosfato

ATP Adenosín trifosfato

NADH Nicotinamida adenina dinucleótido

REDOX Reducción-oxidación

Th1 Linfocitos T helper 1

ETA Enfermedades transmitidas por alimentos

Gbps Proteínas de unión a glucano

CDC Centro de control y prevención de enfermedades

DO Densidad óptica

HPr Proteína que contiene histidina

kDa Kilodaltons

°C Grados Celsius

UFC Unidades formadoras de colonias

% Porcentaje

RNA Ácido ribonucleico

mm Milímetros

g Gramos

CO₂ Dióxido de carbono

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

pH Potencial de hidrógeno

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos

nm Nanómetros

rRNA Ácido ribonucleico ribosomal

rpm Revoluciones por minuto

et al Y otros

M Molaridad

K Potasio

RESUMEN

A lo largo de los años, se ha observado que existen alimentos que surgen a partir de un proceso de fermentación, los cuáles poseen una microbiota característica que influye de manera benéfica en aquellas personas que lo consumen.

El kéfir es una bebida fermentada que tiene origen en el Cáucaso, la cual se obtiene al fermentar leche con gránulos de kéfir (cultivo iniciador). El proceso de esta bebida en su mayoría resulta ser casero y consiste en dejar fermentar por 24 horas a temperatura ambiente. Este producto posee una gran variedad de bacterias entre las cuales predominan los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, mientras que para las levaduras predominan los géneros, *Saccharomyces* y *Candida*, interaccionando entre sí mediante simbiosis.

Se ha observado que las cepas BAL aisladas de alimentos fermentados, presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas a partir de metabolitos que se forman en el proceso de fermentación, resultando de interés aislar y estudiar estas cepas.

El objetivo de este trabajo fue conocer el comportamiento de 10 cepas de BAL aisladas de una muestra de kéfir proveniente del estado de Hidalgo, determinando características morfológicas, evaluando condiciones para su mejor crecimiento, estudiando el metabolismo de carbohidratos, evaluando actividades enzimáticas; lipolíticas, xilanolíticas, proteolíticas y amilolíticas, así como la determinación de la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y de cavidad oral por producción de metabolitos de origen proteico después de la fermentación y finalmente estudiando la sobrevivencia de las mismas en sobrenadantes de BAL con tratamiento térmico y ajuste de pH (6.5-7).

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo, Elie Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel, y profesor en el Instituto Pasteur en París) postuló que las bacterias BAL eran beneficiosas para la salud, además de ser capaces de promover la longevidad. Metchnikoff sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante se podrían suprimir al modificar la microbiota intestinal, reemplazando a los microorganismos proteolíticos, los cuales producen sustancias tóxicas como fenoles, indoles, amoníaco y metabolitos derivados de la digestión proteica, así mismo diseñó una dieta utilizando una leche fermentada que poseía una bacteria a la que bautizó “Bacilo búlgaro” (Guarner *et al.*, 2017).

Por lo que, en la actualidad para tener una buena alimentación, se debe considerar la ingesta de alimentos funcionales, pues su función aparte de su efecto nutricional, es proporcionar componentes que tienen un impacto benéfico en la salud, como son los prebióticos y probióticos.

Los prebióticos son carbohidratos de cadena corta presentes en tejidos vegetales cuya característica principal es que no son metabolizables por las enzimas digestivas del ser humano, sin embargo, al llegar al intestino son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos probióticos. Los probióticos son microorganismos de forma bacilar o cocobacilar, Gram (+), no esporulados que tienen la capacidad de degradar algunos carbohidratos produciendo compuestos de menor peso molecular como el ácido láctico, propiónico, fórmico, acético, CO₂, diacetilo, H₂O₂, entre otros que contribuyen a mejorar procesos digestivos, eliminar microorganismos patógenos, mantener equilibrio inmunológico, etcétera.

Para considerar a los microorganismos como probióticos, deben cumplir con ciertas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el

alimento que lo contiene o al que se le adiciona, así como su tránsito a través del estómago e intestino delgado, además de su adherencia en las mucosas del intestino grueso. A continuación, se enlistan dichas características (Salazar *et al*, 2003):

- Viabilidad durante el proceso y almacenamiento del alimento
- Estabilidad frente a los ácidos gástricos y bilis
- Adherencia a la mucosa intestinal
- Producción de sustancias antimicrobianas

Dentro de los productos fermentados con actividad probiótica, se encuentra el kéfir, esta es una bebida fermentada de fácil digestión, conocida por ser fuente de probióticos como se mencionó con anterioridad, el nombre se deriva de la palabra turca *kef* o *keif* que significa buena sensación y/o sabor agradable. El consumo de esta bebida se ha incrementado por sus efectos nutricionales y terapéuticos en ciudades de Europa, Japón y Estados Unidos. Las principales características sensoriales de esta bebida son que posee cierta acidez y viscosidad, ligeramente carbonatado y con concentraciones pequeñas de alcohol (Arslan, 2015; Leite *et al.*, 2015; Falcão *et al.*, 2018).

El surgimiento de los gránulos que daban origen a dicha bebida fue por la fermentación del cuajar extraído del estómago de animales lactantes, encargado de modificar la leche para su digestión. Se observó que luego de repetidas fermentaciones sin lavar el cántaro se comenzaba a formar un residuo “vivo” de forma esférica que quedaba adherido a las paredes del recipiente, ofreciendo la posibilidad de fermentar la leche sin necesidad del cuajo del mamífero, y es así que los gránulos de kéfir nacieron por la adaptación de la microbiota del estómago del animal lactante en el medio exterior, asociándose a microorganismos de la propia leche y produciendo un soporte de polisacárido capaz de replicarse al ser cultivado rutinariamente en leche (Boldrini, 2009).

ANTECEDENTES

1. Kéfir

En la **Tabla 1** se muestra la composición química típica del kéfir, cabe mencionar que en cuanto al contenido de CO₂ y etanol se han reportado concentraciones de 1.98 g/L y 0.48% respectivamente, el contenido de dióxido de carbono (201.7-277.0 mL/L) se encuentra positivamente correlacionado con la concentración (10-100 g/L) de los granúlos de kéfir (Arslan, 2015).

Tabla 1. Composición química del kéfir (Arslan, 2015).

Componente	Contenido (%)
Humedad	89-90
Lípidos	0.2
Proteína	3.0
Carbohidratos	6.0
Cenizas	0.7
Ácido láctico	1.0
Etanol	1.0

El kéfir es un producto láctico fermentado que se obtiene a través de un proceso de fermentación de la leche, en el cual existe una asociación simbiótica de las BAL y levaduras dentro de un complejo de proteínas y exopolisácaridos, llamado gránulo de kéfir (Bourrie *et al.*, 2016).

El kéfir se elabora a partir de gránulos de kéfir o bien de un consorcio madre de dichos gránulos, los cuales son insolubles en agua, son pequeños, con textura gelatinosa, blanquecinos-amarillentos, poseen forma y tamaño irregular con diámetros que van de los 3 a los 35 mm, los cuales tienden a

precipitar en el fondo del medio de fermentación, su composición es básicamente de caseína y una matriz de polisacáridos, siendo el kefirán el que se encuentra en mayor proporción (Silva *et al.*, 2009; Arslan, 2015).

En el ámbito microbiológico, los gránulos poseen bacterias ácido-lácticas y levaduras. Los géneros bacterianos que se encuentran comúnmente son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*, mientras que dentro de las especies se encuentran *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir* y *Lactobacillus parakefiri*. Los microorganismos aislados que tienden a dominar tanto en los gránulos como en la leche de kéfir son: *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subespecie *pseudopantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefir* y *Lactobacillus brevis*, siendo parte de un 37 a un 90 % del total de la población, dentro del grupo de las levaduras, las cuales viven en simbiosis con estas, se encuentran *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida* (Arslan, 2015; Bourrie *et al.*, 2016).

1.1 Proceso de elaboración

Desde que se conoció el consumo de esta bebida, hace 100 años aproximadamente, la elaboración del kéfir se ha llevado a cabo por la transferencia de los gránulos de kéfir de un lote de leche fermentada a leche fresca, incubando a temperatura ambiente, la fermentación de los gránulos se lleva a cabo por los componentes de la leche (Bourrie *et al.*, 2016; Figueroa, 2017).

La fuente láctea utilizada para elaborar el kéfir normalmente es de origen vacuno, sin embargo, es posible utilizar leche de otras fuentes como lo son de cabra, oveja, búfalo e inclusive fuentes de origen vegetal como la bebida de soya. La concentración de aminoácidos libres en la leche es limitada, por lo que las bacterias ácido-lácticas llevan a cabo su crecimiento por la producción

de peptidasas así como de sistemas de transporte de aminoácidos y péptidos específicos (Parra, 2010; Bourrie *et al.*, 2016).

Durante el proceso de fermentación el único exopolisacárido formado es el kefirán. Gran proporción del gránulo se encuentra disuelto en fase líquida lo que contribuye a la reología y textura del producto final (Bourrie *et al.*, 2016).

1.2 Microbiota característica del kéfir

Los géneros de bacterias más comunes que se encuentran tanto en el gránulo como en la bebida láctea fermentada son:

- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*
- *Streptococcus*
- *Leuconostoc*

La concentración de las especies presentes en el kéfir incrementa un 30 %, si se utiliza como inóculo una muestra directamente de la bebida del kéfir.

A nivel comercial, es decir, en una escala de producción industrial no es frecuente que se utilicen gránulos para la fermentación, sin embargo, se utilizan otro tipo de cultivos iniciadores que han sido aislados del kéfir o bien del gránulo de éste (Bourrie *et al.*, 2016).

2. Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas son bacilos o cocos Gram (+), los cuáles producen ácido láctico a partir de hexosas, en su mayoría son aerotolerantes ya que carecen de citocromos y porfirinas, de modo que son catalasa y oxidasa negativas. Su crecimiento dependiendo del pH es variado, pues existen bacterias ácido-lácticas que pueden crecer a pH 3, 6 e inclusive 9, sin embargo, en su mayoría las BAL crecen mejor en sustratos con valores de pH cerca de la neutralidad (pH 7.0), además según el metabolismo que realicen

se dividen en homofermentativas y heterofermentativas, en cuanto a la temperatura de crecimiento se dividen en mesófilos y termófilos (Mora y García, 2007; Parra, 2010; Monar *et al.*, 2014).

Algunos cocos del grupo láctico crecen mal en condiciones estrictamente anaerobias, otros crecen a bajas presiones parciales de oxígeno y son microaerófilos, mientras que otras crecen mejor en una atmosfera del 5-10 % de CO₂.

Las BAL tienen requisitos específicos y complejos, por lo que para aislarlos se requieren medios específicos como los son el Agar sangre, Edwards, Jugo de tomate y Rogosa, donde a partir de los azúcares presentes obtienen energía. El género *Lactobacillus* produce como principales productos de fermentación a partir de carbohidratos el lactato, acetato, etanol y CO₂ (Pares y Juárez, 1997).

2.1 Ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas y el proceso de fermentación

La ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas o mejor conocida como la ruta glucolítica, es la ruta que utilizan las bacterias con más frecuencia. Esta ruta representa un sistema de conversión de glucosa en piruvato, dichas reacciones se llevan a cabo en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, comenzando con la activación de la glucosa y formación de glucosa-6-fosfato, la tercera reacción (conversión de fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-difosfato) requiere de utilizar 1 mol de ATP por mol de glucosa.

En la glucólisis, la energía producida es por métodos químicos y electroquímicos, químicamente se genera ATP a partir del ADP y al utilizar una cinasa se utiliza el grupo fosfato de alta energía de uno de los productos intermedios de la ruta metabólica, este tipo de reacción (fosforilación oxidativa a nivel de sustrato), tiene lugar en la conversión del 3-fosfoglicerol-fosfato en 3-fosfoglicerato y en la conversión del ácido 2-fosfoenolpirúvico en piruvato.

Produciendo 4 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, pero dos moléculas de ATP en las reacciones iniciales son consumidas, por lo que la reacción glucolítica de la glucosa en dos moléculas de ácido pirúvico se traduce en la producción neta de dos moléculas de ATP.

La segunda forma de producción de energía es la forma reducida del NADH, que puede convertirse en ATP en presencia de oxígeno, tras una serie de reacciones redox.

En el proceso de fermentación, el ácido pirúvico producido por la glucólisis es convertido posteriormente en diversos productos metabólicos finales, estas moléculas orgánicas son utilizadas como aceptores de electrones para reciclar la forma reducida NADH en la forma no reducida NAD. En las bacterias es frecuente la conversión de ácido pirúvico en ácido láctico en un solo paso, proceso responsable de la transformación de la leche en yogurt y de la col en chucrut (Murray *et al.*, 2006).

2.2 Clasificación de BAL según el proceso fermentativo

El grupo homofermentativo utiliza la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas en la cual, a partir de 1 mol de glucosa, se obtienen dos moles de ácido láctico, siendo este metabolito el que se produce en mayor proporción, aproximadamente del 85 % en comparación con los demás metabolitos. Las bacterias que se encuentran dentro de este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, careciendo de fosfocetolasa. En este grupo se encuentran *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis*.

Por otra parte, el grupo heterofermentativo, produce ácido láctico como metabolito en un 50 % del total de los metabolitos producidos, lo que ocurre en la fermentación es que fermentan 1 mol de glucosa y se obtienen 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol, y 1 mol de CO₂, este grupo de bacterias posee la enzima fosfocetolasa. En este grupo se encuentran *Leuconostoc cremoris*,

Lactobacillus cremoris, *L. fermentum* y *Bifidobacterium bifidum*, que, aunque no es una bacteria ácido-láctica, es una bacteria anaerobia predominante en la microbiota del colon, que presenta este tipo de fermentación produciendo también ácido fórmico (Ellner, 2000; Parra, 2010; Corrales *et al.*, 2015).

2.3 Producción de metabolitos funcionales

Durante el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas producen ciertos metabolitos que resultan de interés en la industria alimentaria para la inhibición de microorganismos patógenos o bien para las características sensoriales en los alimentos, en la **Tabla 2** se muestran los metabolitos que han sido identificados, el grupo microbiano que lo produce y la funcionalidad que se les atribuye.

Tabla 2. Metabolitos formados por bacterias ácido-lácticas y su funcionalidad (Modificada de Barros, 2008; Parra, 2010).

Metabolito	Grupo formador	Funcionalidad
Ácido propiónico	Heterofermentativo	Utilizado en la industria quesera para formar agujeros en los quesos, además de estar presente en estos y conferir su sabor característico, por otro lado se usa como conservador contra mohos en panificación
Ácido cítrico	Heterofermentativo	Utilizada en industria mantequera y quesera, dicho compuesto proporciona productos aromáticos como la acetoina y diacetilo, que también tienen efecto antimicrobiano, que inhiben levaduras y bacterias Gram (+) y Gram (-).
Ácido láctico	Homo y heterofermentativo	Compuesto clasificado como GRAS, empleado como aditivo alimentario por la FDA. Producto formado a partir de procesos de fermentación natural que ocurre en la mantequilla, queso, cerveza, leches fermentadas, entre otros. Utilizado como acidulante /agente buffer de pH o inhibidor de esporas y células vegetativas de bacterias en una amplia variedad de productos procesados, como dulces, pan, mermeladas, entre otros.
Peróxido de hidrógeno	<i>Lactococcus</i>	Utilizado para alargar vida de anaquel de la leche y queso cotagge.
Bacteriocinas	BAL	Utilizados como bioconservadores de productos alimenticios, para evitar proliferación de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .
Exopolisacáridos	BAL	Producción segura de EPS funcionales. Utilizados en la producción de yogurt, queso y crema fermentada, su función es actuar como geles, emulsificantes y suspensiones estabilizantes. Como beneficio fisiológico permiten la colonización gastrointestinal por la adherencia de bacterias probióticas.

3. Probióticos y los beneficios del consumo del kéfir

Los probióticos son microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped, éstos pueden intervenir en procesos intestinales de digestión y absorción, al estimular el aumento del volumen de los compartimentos digestivos, superficie de abrasión y tamaño de las microvellosidades, así mismo promueven la renovación de las células que recubren la mucosa intestinal, regulan el tránsito digestivo y motilidad intestinal, por otra parte el uso de probióticos se ha utilizado para modular niveles de respuesta inmune mucosa y sistémico, siendo una alternativa para prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunopatologías, como enfermedades inflamatorias, alergias y desórdenes metabólicos (Carasi, 2014; Pedroso, 2015; Bourrie *et al.*, 2016).

3.1 Beneficios en la salud

Se reportó que en Brasil existía una alta mortalidad en niños, habiendo estadísticas en el año 2005 de 31.5 muertes de cada 1000 nacimientos, por lo que se comenzaron a distribuir gránulos de kéfir a la madres que tuvieran a pequeños afectados por enfermedades gastrointestinales, dando la indicación de adicionar 1.2 g de kéfir en una solución de agua con azúcar morena, es decir una concentración de 10 g/L y proporcionar a los pequeños 24 horas después de la fermentación, obteniendo mejoras en su salud (Silva *et al.*, 2009).

El kéfir actúa sobre el sistema digestivo y promueve la protección contra caries. En el estómago actúa como gastroprotector en úlceras contribuyendo en erradicar a *Helicobacter pylori*, incrementa la inmunidad del intestino, la actividad de enzimas y la absorción de nutrientes. Protege también contra infecciones por *Giardia intestinalis* (Falcão *et al.*, 2018).

Lactobacillus kefiranofaciens aminora la colitis y produce efectos antiasmáticos en alergias a la ovoalbúmina (asthma mice), por otro lado *Lactobacillus kefiri* atenúa respuesta proinflamatoria de células epiteliales del intestino por *Salmonella* Typhimurium, además de que tienen la capacidad de secretar productos y proteínas de superficie que actúan en contra de la adherencia de *Salmonella enterica* serovar (Enteritidis) a células CaCo-2, así mismo presenta efectos contra las toxinas de clostridios en células Vero.

Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en el mundo, siendo el principal riesgo la presencia de colesterol sérico, se ha observado que la leche y aún más, la leche que se encuentra fermentada podría reducir los niveles de colesterol sérico (Bourrie *et al.*, 2016).

3.2 Efecto nutricional del kéfir

En el ámbito nutricional, el kéfir incrementa el valor biológico de las proteínas de la leche, así mismo promueve la síntesis de vitaminas del complejo B, además de ser fuente importante de calcio, fósforo y potasio, mientras que los gránulos de kéfir son capaces de reducir niveles de colesterol de la leche a través del proceso de fermentación a 24 °C por 20 y 48 horas de almacenamiento. Los granúlos del kéfir pueden reducir niveles de colesterol presentes en leche hasta un 62 % (Londero, 2012; Pretell y Urraca, 2012; Bourrie *et al.*, 2016).

3.3 Efecto antimicrobiano

Además de que las bacterias ácido-lácticas proporcionan sabor y textura, e incrementan el valor nutrimental de los alimentos como se mencionó con anterioridad, desde hace tiempo se han utilizado en la industria alimentaria como bioconservadores ya que producen bacteriocinas y otras sustancias con acción antimicrobiana, lo cual contribuye a prevenir el deterioro de los alimentos (González *et al.*, 2003).

La proteólisis de las proteínas de la leche genera péptidos con propiedades biológicas con actividades antimicrobianas, antioxidantes, antihipertensivas, antitrombóticas e inmunomoduladoras.

Dependiendo la fuente de dónde proviene la leche, existe gran influencia en cuanto a productos y propiedades que aporta el kéfir, por ejemplo:

- El kéfir que se obtiene a partir de la leche de bovino posee 29 péptidos bioactivos derivados de α 1, α 2, β y κ caseínas, clasificados como funcionales, con ciertas propiedades demostradas como antimicrobianas, antihipertensivas, opioide y antioxidante.
- El que se obtiene a partir de la leche de vaca, búfalo o cabra posee actividad antioxidante y un incremento de compuestos bioactivos durante la fermentación, los cuales son capaces de inhibir a *S. aureus* y *B. cereus*.
- En el kéfir obtenido de leche de oveja, hay presencia de 4 péptidos bioactivos a partir de α 2 caseína y de la pepsina con actividad antimicrobiana (Falcão *et al.*, 2018).

3.3.1 Bacteriocinas

Las BAL producen péptidos antimicrobianos, tales como bacteriocinas que son péptidos sintetizados en el ribosoma, como resultado de la expresión de los genes que lo codifican, las cuales inhiben el crecimiento de un amplio rango de microorganismos patógenos a través de ciertos mecanismos, presentando un gran espectro de actividad, también existe una variación entre su tamaño y estructura.

Las bacteriocinas son producidas por bacterias Gram (+) como las bacterias ácido-lácticas, las cuáles se dividen en tres clases:

Clase I: Constituido por lantibióticos, péptidos pequeños (< 4kDa), modificados de manera postraducciona, estables al calor, como la lantionina y las nisinas producidas por *Lactococcus lactis*.

Clase II: Péptidos de bajo peso molecular (< 10 kDa), que no han sido modificados, termoestables, como las pediocinas, producidas por *Pediococcus acidolactici* y *L. plantarum*.

Clase III: Son proteínas de alto peso molecular (>30kDa), lábiles al calor. Producidas por *Lactobacillus helveticus*.

También se ha visto que las bacteriocinas son:

- Seguras para su consumo, al ser digeridas completamente por el tracto gastrointestinal.
- Poseen un alto potencial como antimicrobiano, pues resulta ser 10^3 o 10^6 veces mayor su efecto contra microorganismos que otros antimicrobianos, incluyendo antibióticos convencionales.
- Son estables al calor y a pH ácidos, además llegan a presentar termorresistencia, lo que les permite mantener su actividad después de ciertos tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización.

Estas se producen en la fermentación, sin embargo, presentan bajos rendimientos y por ende, se presentan limitaciones para su purificación (Ramos *et al.*, 2012; Bedard *et al.*, 2018).

4. Microorganismos patógenos y de cavidad oral, impacto en la salud.

Las ETA's se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva, dentro del cuadro sintomático se presenta diarrea y vómito, sin embargo, también se puede presentar choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otras.

La mayoría de las infecciones causadas por alimentos, son por bacterias, las más frecuentes son *Salmonella* y las cepas ETEC (Enterotoxigénica) y EPEC (Enteropatogénica) de *Escherichia coli*.

Las ETA's representan un importante problema de salud debido al surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos vulnerables y el aumento de la resistencia a antibióticos por microorganismos patógenos, por lo que la incidencia de estas enfermedades, resulta ser un indicativo directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, se ha demostrado que la contaminación de estos ocurre durante el proceso, ya sea por empleo de materia prima contaminada, manipulación de la misma por un portador, presencia de vectores (como roedores, cucarachas o plagas en general) y contaminación cruzada (González y Rojas, 2005).

En cuanto a la etiopatogenia de la caries dental, según Miller, el factor más importante era la capacidad de un gran número de bacterias de producir ácidos a partir de los carbohidratos que son consumidos en la dieta. Paul Keyes, en 1960, estableció teórica y experimentalmente que dicha etiopatogenia obedece a una interacción simultánea de tres elementos o factores principales, estos son factor "microorganismo" que en presencia de un factor "sustrato" que logra afectar a un factor "diente", de modo que, la caries dental es un proceso dinámico de desmineralización y remineralización debido al metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, como consecuencia es que hay pérdida de minerales, en ciertas ocasiones se llega a observar cavidades en los dientes. El proceso ocurre cuando existe biopelículas (placa bacteriana). Además de esta enfermedad, la presencia de periodontitis ocurre por el desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se encuentra de forma normal, llevándola a una patología. Al existir un cambio en el medio dentro de la biopelícula, se favorece la proliferación de especies patogénicas. Los principales microorganismos relacionados con la caries dental son aquéllos que participan en el desarrollo inicial de la enfermedad y en la progresión de las lesiones establecidas.

En el desarrollo inicial de la enfermedad, se ha demostrado que *S. mutans* está relacionado con la biopelícula de placa cariogénica y se asocia con el

comienzo de la enfermedad, al mismo tiempo hay un incremento en la saliva de estos microorganismos antes de formar la caries dental. *Streptococcus sobrinus* es la segunda especie de importancia. En cuanto a la progresión de lesiones establecidas, se incluyen *Lactobacillus* spp. y otros microorganismos que son capaces de sobrevivir y proliferar en medios ácidos como *Candida albicans*, dichos microorganismos se ven favorecidos por las condiciones del medio que se promueven por estreptococos del grupo *mutans* (Negroni, 2009; Marquino y Santos, 2010).

4.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es un coco Gram (+), que se encuentra agrupado en cadenas, no móvil, catalasa (-), productor rápido de ácido láctico con la capacidad de cambiar el pH del medio en donde habita de 7.2 – 4.2.

Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina. Existen varios subtipos dependiendo las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas, las cuales son c, e, f y k, la variación de estos tiene que ver también en la composición y enlaces de los polisacáridos de la pared celular, el serotipo predominante en la cavidad oral es el c (Ojeda *et al.*, 2013).

Entre los factores de virulencia que *S. mutans* presenta, destacan:

Acidogénesis: Rápidamente los carbohidratos son metabolizados por vía glucolítica, de modo que se alcanza el pH crítico de desmineralización de 4.5-5.5. *S. mutans* presenta distintos mecanismos enzimáticos para el transporte de carbohidratos al interior de la célula, estos sufren un proceso de fermentación y producción de ácidos, principalmente ácido láctico.

Acidofilia: La acidificación de la biopelícula, producto de la fermentación de los carbohidratos favorece el crecimiento de *S. mutans* y al mismo tiempo inhibe el de microorganismos comensales como *S. sanguinis*, *S. gordonii*, y *S. oralis*, debido a la presencia de la bomba translocadora de protones H⁺ que posee *S. mutans* en su membrana celular, denominado F0 F1 ATPasa, la cual

funciona para mantener el pH intracelular por debajo de pH 7.5. También posee un sistema enzimático que le permite utilizar aminoácidos para convertir protones H⁺ en aminas.

Síntesis de polisacáridos extracelulares: *S. mutans* produce y segrega al medio tres tipos de enzimas, exoenzimas, denominadas glucosiltransferasas (Gtfs, Gtf B, Gtf C, Gtf D), catalizadores de mutanos y dextranos.

Metabolismo de polisacáridos intracelulares: La célula almacena glucógeno, que, ante la falta de ingreso de carbohidratos por vía exógena con la dieta, puede metabolizarse por la acción de glucogenofosforilasa, ante un incremento de productos intermediarios de la glucólisis.

Síntesis de proteínas, lectinas, que ligan el glucano (Gbps): *S. mutans* produce por lo menos cuatro tipos distintos de Gbps (Gbps A, Gbps B, Gbps C y Gbps D), proteínas extracelulares, normalmente asociadas a su pared celular, importantes para el acúmulo de *S. mutans* en presencia de sacarosa al formar un puente que une a las superficies celulares de los microorganismos a la matriz extracelular de polisacáridos.

Adhesinas: Presenta adhesinas de superficie de la familia de adhesinas Spa también llamada antígeno I/II (SpaP, Pac o P1).

Proteína asociada a pared celular (Wap A): Permite la adherencia a caras libres de las piezas dentarias y participar en la adherencia dependiente de la sacarosa.

Bacteriocinas: Produce ciertas bacteriocinas, llamadas mutacinas, que participan en el proceso de competencia microbiana (Negróni, 2009).

Entonces, *Streptococcus mutans* es conocido por ser un microorganismo cariogénico, habitante en la microbiota oral, constituyendo la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo *viridans* como bacteriemia y endocarditis, cabe mencionar que la caries dental es una enfermedad de alta prevalencia en humanos (Porte *et al.*, 2009; Ojeda *et al.*, 2013).

La superficie dental es un hábitat natural, indispensable para *S. mutans*, además del tropismo por la biopelícula, su adaptación se ve reflejado por la síntesis de glucanos, fijación de compuestos y porque adapta su acidez, es por ello que comienza la competencia en el nicho ecológico, presentando relación con un sistema de regulación de quorum sensing (mecanismo bacteriano de comunicación intercelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular) y el proceso de respuesta de tolerancia al ácido. Resulta de importancia tener cuidado también en válvulas cardiacas, aparatos prostéticos, criptas amigdalinas, senos nasales, pasajes respiratorios terminales y lesiones infecciosas en la piel, ya que *S. mutans* es un microorganismo oportunista.

Streptococcus mutans lleva a cabo la fermentación de carbohidratos como la sacarosa, glucosa y fructosa residuales en los dientes, a partir de los cuáles se obtienen como metabolitos el ácido láctico, propiónico, acético y fórmico, estos en la placa se direccionan al esmalte poroso, en dónde ocurre una disociación de los ácidos y por ende liberación de protones que disuelven los minerales del esmalte generando calcio y fosfato, ocurriendo la desmineralización (Marquino y Santos, 2010; Ojeda *et al.*, 2013).

4.2 Streptococcus oralis

Los estreptococos del grupo *viridans* se han considerado como patógenos oportunistas menores, que son asociados principalmente a la caries dental. Con el paso de las décadas dichas bacterias han emergido como patógenos significantes en pacientes inmunocomprometidos y con neoplasias hematológicas.

Inclusive bacteriemias primarias en grupo de pacientes susceptibles son asociadas con complicaciones secundarias, que incluyen la endocarditis infecciosa, síndrome de dificultad respiratoria y shock estreptococal, teniendo como resultado valores de mortalidad arriba del 30%.

En un tiempo, combatir a este microorganismo con penicilina resultó ser buena idea, sin embargo, con el paso del tiempo se ha presentado baja efectividad con dicho antibiótico debido a que han emergido altos niveles de resistencia antimicrobiana por estos microorganismos.

Streptococcus oralis es un agente significativo de endocarditis infectiva y como patógeno en pacientes con mecanismos de defensa atenuados. Los mecanismos de patogenicidad por los cuáles *S. oralis* causa un amplio rango de infecciones aún no están claros, sin embargo, la sialidasa producida por este microorganismo ha sido propuesta como contribución a la patogenicidad de otros microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* y *Vibrio cholerae*.

Las sialidasas bacterianas de adherencia terminal, no reducen los ácidos siálicos de los sialoglicoconjugados, cabe mencionarse que el rol preciso de dicha enzima es desconocido, pero se ha sugerido que estas actúan como determinantes generalizados de virulencia, siendo en este caso la liberación de ácido siálico, que puede exponer sitios de unión de carbohidratos en el organismo invasor y romper con las barreras de defensa en el hospedero. Además, la producción de sialidasa puede ser un factor crítico, en la provisión de ácido siálico libre, una fuente de carbohidratos fermentables para la proliferación bacteriana, como consecuencia secundaria, la eliminación de ácido siálico por estas enzimas conduce a un daño directo al huésped debido al papel central de este azúcar en interacciones celulares y moleculares (Byers *et al.*, 2000).

4.3 *Listeria monocytogenes* y *L. innocua*

Las especies de *Listeria* se encuentran de manera latente en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso y leche no procesada, desechos de mataderos, así como el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos.

Listeria monocytogenes es un cocobacilo Gram (+), psicrótrofo, móvil, no esporulado, anaerobio facultativo, patógeno de origen alimentario en humanos y animales, con amplia distribución en la naturaleza, el principal hábitat de *L. monocytogenes* es el suelo y la materia prima vegetal en descomposición, en la cual crece y sobrevive como saprófito, dada su amplia distribución, posee la oportunidad de contaminar alimentos dentro de los distintos pasos de producción alimentaria, es por ello que esta vía de contaminación, resulta ser la más común para infectar al ser humano.

L. monocytogenes produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriosina O, factor importante de virulencia, se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a bajo pH, con la capacidad de bajar la concentración de hierro, condiciones que se encuentran al interior del fagolisosoma, ocurriendo entonces que al ser fagocitado *L. monocytogenes* fabrica la listeriosina, capaz de fijar al colesterol, rompiendo la membrana del fagolisosoma, pudiendo ser este el principal factor que favorece su supervivencia intracelular.

En personas adultas, la listeriosis invasiva, se manifiesta como bacteriemia o como meningoencefalitis secundaria a una bacteriemia, presentando mortalidad elevada, con hasta 30 %, considerando el tracto gastrointestinal como la entrada principal a dicho microorganismo.

Pacientes de edad avanzada o con alguna patología de base (como SIDA o diabetes mellitus) son más susceptibles, por otro lado, mujeres embarazadas

son propensas a sufrir bacteriemia, produciéndose en el tercer trimestre del embarazo, presentando un cuadro pseudogripal de evolución favorable; es poco probable el deceso de la madre, sin embargo, si no se proporciona un tratamiento adecuado se puede producir una amniosis e infección fatal (Control de calidad SEIMC 1997, Torres *et al.*, 2005).

4.4 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram (+), caracterizados por presentar agrupaciones en forma de racimos de uvas. El género *Staphylococcus*, presenta gran capacidad de adaptación, por lo que especies características de mamíferos, incluyendo roedores de laboratorio son propensas a infectarse.

Durante los últimos años, se ha presentado bacteriemia por *Staphylococcus* en incremento, pues *Staphylococcus aureus* ha aumentado su incidencia, tanto, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones causadas por los alimentos.

Su patogenicidad se relaciona con componentes presentes de la superficie bacteriana, por sus peptidoglucanos, ácidos teicoicos y vitamina A. Además, *S. aureus* es una de las bacterias implicadas en ETA's, dentro de las causas que provocan la enfermedad, se encuentra la capacidad de dicho microorganismo para producir toxinas (Zendejas, 2014).

4.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo

de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda.

Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta, también pueden aparecer fiebre y vómito, la mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (OMS, 2019).

E. coli es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, para determinar el grupo patógeno al que pertenece, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación con variación continua, actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno O es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (**ETEC**), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (**EHEC o VTEC o STEC**), enteroinvasiva (**EIEC**), enteropatógena (**EPEC**), enteroagregativa (**EAEC**) y adherencia difusa (**DAEC**) (Rodríguez, 2002).

E. coli O157:H7 fue reconocido como patógeno en 1982 en una investigación de brote por colitis hemorrágica. *E. coli* O157:H7 dirige una infección por el síndrome urémico hemolítico, caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia y lesión renal.

No fue hasta 1993, que después de un brote multiestatal, *E. coli* O157:H7 vinculado a carne para hamburguesas mal cocinadas, que fueron vendidas a través de una cadena de comida rápida, que *E. coli* O157:H7 llegó a ser reconocida como un importante y amenazante patógeno (Rangel *et al.*, 2005).

4.6 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella es una de las bacterias que con frecuencia da origen a ETA's. La CDC estima que cada año en los Estados Unidos, *Salmonella* da origen a 1 millón de casos de enfermedades causadas por alimentos. En los últimos años, los brotes de salmonelosis han sido vinculados a la contaminación de pepinos, atunes crudos, germinados y muchos otros alimentos (CDC, 2019).

La patogenia desencadenada por *Salmonella* Typhimurium ha sido estudiada a lo largo de 5 años, en los que se ha tenido conocimiento sobre mecanismos de virulencia, dentro de los cuales, de forma exhaustiva, se encuentran cinco islas de patogenicidad de *Salmonella* informadas hasta el momento, las cuáles contribuyen a interacciones con la célula huésped de forma significativa.

Existen determinantes de virulencia adicionales que se están estudiando, tales como las codificadas dentro del plásmido de virulencia pSLT, la presencia de adhesinas, flagelos y aquella mezcla de sustancias extracelulares poliméricas (proteínas, fimbrias, celulosa, polisacáridos capsulares y otros polisacáridos como el lipopolisacárido) que dan lugar a la formación de biopelículas, factores que contribuyen en varias etapas de la enfermedad que desencadena la patogénesis de *S. Typhimurium*.

Las infecciones por *Salmonella* Typhimurium comienzan por la ingesta de alimentos y agua contaminados por éste, el primer obstáculo que tiene que superar es la acidez del estómago dentro del hospedero. Para protegerse del shock por el ácido, *S. Typhimurium* activa su respuesta de tolerancia al ácido, el cual provee una función inducible de pH homeostático para mantener los valores de pH intracelular más altos que los del ambiente extracelular (Fábrega y Vila; 2013; Barreto *et al.*, 2016).

4.7 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un bacilo Gram (+), anaerobio facultativo y móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, formador de esporas resistentes a condiciones adversas del medio, tales como altas temperaturas, deshidratación y radiación, produciendo toxinas que contaminan a una gran cantidad de alimentos.

Capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas desde los 4 a 48 °C y en un rango de pH de 4.9 a 9.3, e inclusive soporta concentraciones de NaCl de hasta 7%. Las esporas producidas son resistentes a bajas condiciones de humedad y a tratamientos térmicos como la pasteurización o procesos de cocción de alimentos, dentro del estómago, también presenta resistencia al ácido clorhídrico, por lo que es un peligro potencial para el ser humano.

Bacillus cereus posee la capacidad de producir toxinas que afectan a los seres humanos, al ser consumidas en alimentos contaminados por el microorganismo en dosis de 10^5 a 10^8 UFC por gramo de alimento. Una de las toxinas que produce es la emética, la cual se caracteriza por causar vómito, las enterotoxinas como la hemolítica, la no hemolítica y la citotoxina K, inducen permeabilidad vascular debido a que forman poros en el intestino delgado y por lo tanto diarrea.

Resulta importante destacar que *Bacillus cereus* presenta diferentes grados de toxicidad de acuerdo con la cepa. Los alimentos que comúnmente se ven contaminados por este microorganismo son harinas, carnes, leches, quesos, verduras, pescados, arroz y sus derivados (Sánchez *et al.*, 2016).

4.8 *Enterococcus faecalis* (conocido anteriormente como *Streptococcus faecalis*)

Los enterococos son cocos Gram (+) ubicuos, que se encuentran en el agua, suelos, alimentos, forman parte de la microbiota normal del ser humano y otros animales, residiendo habitualmente en el tracto digestivo y genital. En los

últimos años se ha incrementado la incidencia de infecciones intrahospitalarias por este microorganismo, siendo causa importante de morbilidad en áreas clínicas y quirúrgicas.

Dentro de sus características fisiológicas, los enterococos resultan ser anaerobios facultativos, catalasa negativos, la mayoría se aglutinan con anticuerpos específicos para el grupo D de Lancefield (la clasificación de los estreptococos de Lancefield se basa en las reacciones serológicas de los carbohidratos de la pared celular de la bacteria, es decir, en la distinta naturaleza antigénica de los polisacáridos de la pared).

Debido a estas características, durante un largo período de tiempo fueron considerados dentro del género de *Streptococcus*, estudios genéticos realizados posteriormente, evidenciaron diferencias con el género, y no fue hasta 1984 que los enterococos constituyeron un nuevo género llamado *Enterococcus*, integrado por múltiples especies.

Las especies de enterococos con gran impacto en el ser humano son (Ortega, 2010; microBIO, 2016):

- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *E. durans*
- *E. avium*
- *E. casseliflavus*
- *E. gallinarum*

E. faecalis es un habitante natural del tracto gastrointestinal, sin embargo, con el tiempo ha atraído la atención de los investigadores porque ha sido identificado como la causa de infecciones periapicales persistentes. La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35 °C, sin embargo, se ha observado crecimiento entre 10 °C y 45 °C.

E. faecalis posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cuál es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado a la membrana citoplasmática de la bacteria que contiene residuos de glicerol, además de poseer gran cantidad de mureína y ácido teicoico. Una de las características principales de este microorganismo es que posee la capacidad de sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias (Pardi *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El consumo de productos fermentados ha cobrado gran impacto en el transcurso de los años, pues el estilo de vida y las costumbres gastronómicas que tenían nuestros antepasados mediante una dieta equilibrada y variada, se han visto modificadas de forma negativa, por lo que se ha presentado un incremento de enfermedades y malestares gastrointestinales, es por ello que es de gran importancia estudiar la microbiota benéfica, con probable actividad probiótica, presente en estos productos. En este caso el kéfir, que es un producto lácteo fermentado, contiene una gran diversidad de microorganismos que aportan beneficios a la salud en todas las personas que lo consumen, además de que es un producto que se elabora de manera sencilla en casa, sin tantos requerimientos específicos dentro de su proceso. Por otra parte, es importante estudiar las características de las BAL presentes en este producto y a sus metabolitos, ya que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición, por lo que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria como aditivos para la conservación de alimentos, los cuales se pueden consumir de forma segura, y ser reconocidos como GRAS.

Además de ampliar el conocimiento sobre este producto pues hay información limitada sobre la caracterización de las cepas que se encuentran presentes y con este proporcionar información para futuras investigaciones.

HIPÓTESIS

Al realizar la caracterización de las cepas BAL aisladas del kéfir, se tendrá conocimiento de las exigencias nutricionales, condiciones óptimas de crecimiento y actividades enzimáticas características de éstas, las cuáles permitirán evaluar la capacidad de las cepas BAL para producir metabolitos con actividad antimicrobiana, tales como metabolitos de origen proteico y ácidos orgánicos, con actividad contra microorganismos patógenos presentes en alimentos y de cavidad oral.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de una muestra de kéfir casero proveniente del estado de Hidalgo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las condiciones óptimas de crecimiento de las BAL en medio MRS y de producción de sustancias antimicrobianas.
- Mediante pruebas de difusión en agar observar efecto de inhibición de sustancias antimicrobianas presentes en cultivos BAL, contra microorganismos patógenos y de cavidad oral, así como evaluar la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *S. oralis*, en sobrenadantes de cultivos de BAL, libres de células, con tratamiento térmico y pH ajustado.
- Observar actividad lipolítica y proteolítica de las cepas BAL , así como la capacidad de hidrolizar el almidón y xilano.
- Conocer el metabolismo de carbohidratos de las BAL e identificar el tipo de fermentación que presentan.

METODOLOGÍA

Se trabajó con 10 cepas BAL aisladas de una muestra de kéfir proveniente de Hidalgo (Anaya y López, 2018), las cuales se conservaron en congelación (-70°C).

Las cepas fueron identificadas mediante comparación de secuencias del gen rRNA 16S, los resultados se muestran en la **Tabla 3**, se indican las claves de las cepas, la especie identificada y su porcentaje de identidad.

Tabla 3. Identificación de bacterias lácticas del kéfir mediante la comparación de secuencias del gen rRNA 16S (Anaya y López, 2018).

Clave cepa	Especie identificada	% de identidad
E1-C	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i>	99
E1-D	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>parabuchneri</i>	99
E2-A	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i> /L. <i>sunkii</i>	99
E2-B	<i>Lactobacillus kefir</i>	99
E2-C	<i>Lactobacillus kefir</i>	99
E2-O	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i>	99
E3-F	<i>Lactobacillus kefir</i>	99
E3-M	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i> /L. <i>sunkii</i>	99
E3-N	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i> /L. <i>parabuchneri</i>	99
E3-P	<i>Lactobacillus kefir</i> /L. <i>otakiensis</i> /L. <i>sunkii</i>	99

Reactivación de bacterias ácido-lácticas y verificación de pureza.

- a) **Reactivación.** Se tomaron 40 μ L del cultivo congelado y se colocaron en 4.5 mL de caldo MRS, incubando a 30 °C por 24 horas, se realizó un segundo pase bajo las mismas condiciones. Dicho procedimiento se realizó con cada una de las 10 cepas a trabajar. Este proceso, se llevó a cabo al inicio de todas las pruebas empleadas con las cepas BAL aisladas del kéfir.
- b) **Verificación de pureza.** A partir de los cultivos obtenidos en la reactivación, se inocularon por estría por agotamiento en cajas con agar MRS cada una de las cepas, incubando en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (uso de gas pack **OXOID AnaeroGen™**) a 30°C por 72 horas. Posteriormente, se describió la morfología de las colonias. Se observó al microscopio en el objetivo 100x. Se anotó la morfología característica e indicó si eran bacterias Gram (+) o Gram (-), así como la agrupación característica (Palao, 2009).

Cinéticas de crecimiento de cepas de BAL en medio MRS a 30 °C y 37°C.

- a) **Experimento 1 (cinéticas empleadas para las cepas E2-B y E2-C).** Posteriormente de la reactivación, se realizó un tercer cultivo utilizando la proporción 40 μ L de cultivo congelado: 4.5 mL de medio MRS, para un volumen de 150 mL de caldo MRS, los medios inoculados se incubaron a 30 °C y 37 °C.
Para evaluar el crecimiento de la bacteria se midió la densidad óptica (espectrofotómetro **Thermo scientific, Geneys 10S UV-VIS**) a 600 nm y pH (potenciómetro **OAKTON®**) al inicio del experimento y posteriormente cada hora por 12 horas, posteriormente cada 24, 36, 48 y 60 horas, experimento que se realizó por duplicado.
- b) **Experimento 2 (repetición de cinéticas de las primeras dos cepas y subsecuentes cinéticas para el resto de las cepas).** Se llevó a cabo la reactivación de las cepas, a excepción de una modificación para el

segundo pase, pues se realizó una variación en cuanto a la cantidad del inóculo, aumentando la proporción a 100µL cultivo congelado: 4.5 mL de caldo MRS. Para obtener el cultivo final, se inocularon 3.33 mL del cultivo anterior en 150 mL de caldo MRS, se incubaron a 30 °C y 37 °C. Para evaluar el crecimiento de las cepas para las cuales se repitió la prueba (E2-B y E2-C) se midió la densidad óptica y pH al inicio de la prueba, posteriormente cada 12, 24, 36, 48 y 60 horas, sin duplicado. Para el resto de las cepas como se mencionó en el experimento 1, el experimento se realizó por duplicado, el pH y densidad óptica, se midieron al inicio de la prueba y cada hora por 12 horas, posteriormente a las 24 y 36 horas.

Ensayo de actividad antimicrobiana.

- a) **Obtención de sobrenadantes y liofilización.** Una vez que se llevó a cabo la reactivación, a partir del segundo pase se tomaron 500 µL y se inocularon en 50 mL de caldo MRS, incubando a 30°C por 24 horas. Posteriormente se centrifugó (Centrífuga **Beckman J2-21 M/E**) a 10,000 rpm, 10 minutos a 4°C, se descartaron las células y los sobrenadantes obtenidos se congelaron -70 °C. Una vez congeladas las muestras, se liofilizaron por 24 horas a -59 °C (liofilizador de sobremesa FreeZone de 4.5 litros **Labconco** de 12 puertos). Las muestras liofilizadas se conservaron en congelación hasta su uso.
- b) **Prueba de difusión en agar.** Se prepararon capas (colocadas en cajas Petri) y sobrecapas (tubos de vidrio con rosca) de agar BHI tamponado (**Tabla A.1, anexo A**), considerando que por capa se formaron 6 pozos, distribuidos de la siguiente manera, 4 pozos para sobrenadantes de cultivos de BAL, un pozo para el control (+), clorhexidina al 0.2% y control (-) agua destilada estéril, realizando la prueba por duplicado. Se trabajó con 7 cepas patógenas y 2 de cavidad oral, para su reactivación, en la **Tabla B.1(anexo B)** se muestran las condiciones de trabajo que se siguieron para cada una de las cepas. Es importante mencionar que los

sobrenadantes liofilizados de cultivos de BAL se concentraron 10 veces, es decir los 25 mL de sobrenadantes liofilizados de cada uno de los cultivos de BAL se resuspendieron con 2.5 mL para realizar la prueba con todas las cepas. Se realizó una segunda prueba para *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, en este caso los sobrenadantes liofilizados de cultivos de BAL, volumen original 25 ml, se resuspendieron en 1 ml. Se midió el diámetro de éstos y se reportaron en mm.

Cuantificación de Proteína (Método de Bradford).

Se utilizó el Quick Start™ Bovine Serum Albumin (BSA) Estándar Set (**BIO RAD**), con la cual se obtuvo una curva patrón con BSA (**anexo D**), utilizada para cuantificar la proteína presente en los 10 sobrenadantes obtenidos.

Tratamiento a sobrenadantes de cultivos de BAL con actividad antimicrobiana. Ensayo de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* y *S. mutans*.

a) Tratamiento térmico y ajuste de pH de sobrenadante de cultivo de BAL pH 6.5-7.0. Los sobrenadantes de los cultivos de las cepas E2-A, E2-B y E3-N se obtuvieron y liofilizaron como se mencionó con anterioridad (**inciso a, en apartado de ensayo de actividad antimicrobiana**). La neutralización de 100 mL de cada sobrenadante se realizó con NaOH 1M hasta lograr un pH 6.5-7.0 (potenciómetro **Thermo electron coporation**), posteriormente se aplicó un tratamiento térmico 90°C por 10 minutos, una vez realizados dichos procedimientos se conservaron en congelación a -72 °C hasta el proceso de liofilización.

Para los controles utilizados para cada cepa, se liofilizaron 100 mL de caldo MRS sin inocular, a los cuales se les dio el mismo tratamiento que a los sobrenadantes de los cultivos de BAL.

b) Evaluación de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *S. aureus*. Tal como se describió previamente, para cada cepa, E2-A, E2-B, E3-N y para los controles, se obtuvieron dos lotes de 50 mL de cultivos que fueron liofilizados y resuspendidos con 5 mL de agua destilada estéril cada uno, posteriormente, cada uno se inoculó con 44.4 μ L del cultivo reactivado de *Streptococcus oralis*, *S. mutans* y *Staphylococcus aureus*, las pruebas se realizaron por duplicado.

Los sobrenadantes y controles se incubaron por 24 horas a 37°C. Se tomaron muestras en tiempos 0, 12, 24 y 48 horas. Para cada tiempo evaluado se realizó un conteo de bacterias sobrevivientes en el medio BHA, para lo cual se realizaron las diluciones mostradas en la **Tabla B.2 (anexo B)** para cada cepa en solución salina al 0.8%; por duplicado, posteriormente se inocularon 100 μ L de cada dilución en las placas con BHA y se extendieron con varilla metálica. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 horas para *Streptococcus oralis*, mientras que para *S. mutans* y *Staphylococcus aureus* se incubaron por 24 horas, posteriormente se cuantificaron las colonias y realizó un gráfico de UFC/mL contra el tiempo.

Caracterización de las cepas de bacterias ácido-lácticas.

Luego de la reactivación de cada una de las cepas de BAL y de los controles necesarios, según el tipo de prueba a evaluar, se observaron actividades enzimáticas, lipolíticas, proteolíticas, xilanolíticas y amilolíticas, para las cuales se trabajaron con medios específicos, la composición de estos se muestra en las **Tablas A.2 - A.7 (anexo A)**.

a) Prueba de actividad amilolítica.

Una vez que se tuvieron las placas del medio MRS-almidón, las cepas BAL se inocularon mediante estría por agotamiento, se incubaron en

anaerobiosis utilizando una jarra con gas pack **OXOID AnaeroGen™** a 30 °C por 4 días.

Para esta prueba se utilizó como control (+) a *Streptococcus infantarius* 25124 (Colección de cultivos del laboratorio 324) la cual se incubó en aerobiosis a 30 °C por 4 días.

Posterior al tiempo de incubación, las placas se revelaron con 5 mL de Lugol diluido en agua en una proporción 1:1. Al teñirse el almidón del medio con Lugol, la prueba se consideró positiva al observarse halos sin tinción alrededor de las estrías y colonias aisladas, indicando la hidrólisis del almidón.

Prueba de actividad xilanolítica.

Para esta prueba se utilizaron dos tipos de xilano, xilano de maíz (Cooper, 2018) y el segundo xilano de abedul **SIGMA-ALDRICH**.

Las placas con el medio se dividieron en tres para inocular las cepas mediante estría por agotamiento, se incubaron en anaerobiosis utilizando una jarra con gas pack **OXOID AnaeroGen™** a 30 °C por 4 días, se utilizó nuevamente como control (+) a *Streptococcus infantarius* 25124 (Colección de cultivos del laboratorio 324), la cual se incubó en aerobiosis a 30 °C por 4 días. Para revelar las placas se utilizó rojo Congo al 0.2 %, una vez que se adicionó este en las cajas, se dejó en agitación en un Rotomix (**Type 5080, Barnstead Thermolyne, USA**) durante 10 minutos, posteriormente se retiró el excedente y se realizaron tres lavados con NaCl 1 M en agitación por 10 minutos. Al teñirse el medio con rojo Congo, la prueba se consideró positiva, al haber halos sin tinción alrededor de las estrías y colonias, indicando la hidrólisis del xilano (Méndez, 2017).

b) Prueba de actividad proteolítica.

Para realizar esta prueba se utilizaron tres medios de cultivo distintos, los cuáles fueron agar caseinato de calcio, agar leche descremada y agar caseína, de los cuales se muestra su composición en las **Tablas A.4- A.6 (anexo A)**.

Una vez que se realizó la reactivación de las cepas, las BAL se inocularon mediante estría por agotamiento e incubando a 30 °C en anaerobiosis utilizando jarras con gas pack **OXOID AnaeroGen™**, incubando por 9 días en el caso de la prueba con agar calcio caseinato, mientras que para las pruebas en agar leche descremada y agar caseína la incubación fue por 6 días. El control (+) utilizado de forma general fue la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la cual también se incubó mediante estría por agotamiento, pero se incubó a 37°C en aerobiosis. Se tomó como positiva la prueba cuando se observaron zonas más claras en comparación con la coloración del medio alrededor de las estrías y colonias aisladas, indicando proteólisis positiva.

c) Prueba de actividad lipolítica.

Para esta prueba, se utilizó agar Tributirina, utilizando tres composiciones distintas, que se muestran en las **Tablas A.7 – A.9 (anexo A)**. Posterior a la reactivación, se inocularon las placas mediante estría por agotamiento de cada cepa de BAL en cada uno de los agares antes mencionados, incubando a 30 °C por 7 días en condiciones de anaerobiosis utilizando jarra con gas pack **OXOID AnaeroGen™**. El control (+) utilizado fue una cepa de *Kocuria rhizophila*, la cual se incubó a 37 °C en aerobiosis. La prueba se consideró positiva al observar zonas más claras en comparación de la coloración del medio alrededor de las estrías y colonias aisladas, indicando actividad lipolítica.

Para identificar el tipo de fermentación de cada cepa, así como la producción de gas y los carbohidratos que fermentan, se realizaron, las pruebas que a continuación se mencionan:

a) Prueba para determinar homofermentación o heterofermentación.

Una vez que se realizó la reactivación de las cepas de BAL, se inocularon en el medio M5 mediante estría por agotamiento incubándose en anaerobiosis utilizando una jarra con gas pack **OXOID AnaeroGen™** a 30°C por 5 días.

Como control de microorganismo homoláctico se utilizó *Lactococcus lactis* 54 ch y como control heteroláctico se utilizó *Leuconostoc mesenteroides* 73 (ambas de la Colección de cultivos del laboratorio 324) incubados en aerobiosis, a 30 °C por 48 horas. Las cepas se consideraron como homolácticas al presentar colonias azul-verdosa con vire del medio de azul a amarillo, mientras que las cepas heterolácticas al presentar colonias blanquecinas sin presentar cambio en la coloración del medio, es necesario que se lleve a cabo la reducción de fructosa a manitol para que los resultados que se obtengan sean de acuerdo con las cepas hetero y homolácticas, sin que haya resultados falsos positivos (Zúñiga *et al.*, 1993; Pares y Juárez, 1997; Ramírez y Vélez, 2016).

b) Prueba de producción de gas y fermentación de la lactosa.

Esta prueba se realizó por duplicado, utilizando como controles las cepas *Escherichia coli* 27377 control (+) (Colección de cultivos del laboratorio 324) y como control (-) *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Una vez reactivadas las cepas BAL, a partir del segundo pase, se inocularon 177.8 µL en 10 mL de caldo rojo de fenol con lactosa, se incubó a 30°C en aerobiosis por 7 días; en el caso de los controles, se inocularon 88.8 µL en 10 mL de caldo rojo de fenol con lactosa y se incubaron a 37 °C en aerobiosis por 24 horas. Se consideró la prueba positiva para fermentación

de la lactosa al observar vire del medio rojo a amarillo y prueba negativa al no existir cambio de color en el medio, en cuanto a la producción de gas, se consideró prueba positiva al observar producción de gas dentro de las campanas de Durham y prueba negativa al no haber dicho gas.

c) API 50 CH.

La reactivación de las cepas BAL se llevó a cabo de la forma mencionada anteriormente, con excepción de que el segundo pase se realizó inoculando 88.8 µL en 10 mL de caldo MRS, se incubó a 30°C por 24 horas, posteriormente a dicho tiempo, los 10 mL se trasvasaron a tubos de centrífuga y se centrifugaron (Centrífuga **Beckman J2-21 M/E**) a 12,000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con 10 mL de agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante. A partir de un vial de 2 mL de agua destilada estéril, se tomó un mL y resuspendieron las células, para después homogeneizar con un mL que quedó en el vial. Se tomó una alícuota de este y se adicionó gota por gota en otro vial con 5 mL de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a la del tubo número 2 marcada en la escala de McFarland. Una vez que se alcanzó dicha turbidez y que se cuantificó la cantidad de gotas que permitieron alcanzarla, se adicionó el doble de gotas al medio CH-API, se homogeneizaron y se colocó dentro de los pozos de las tiras API, se colocó el aceite mineral y se incubó a 30 °C por 5 días, pero realizando monitoreo de resultados cada 24 horas, hasta el día final de incubación.

Los resultados observados se registraron en formatos que venían incluidos en el kit API 50 CH, que contenían la clave de los carbohidratos a fermentar. Para registrar los resultados, en cada celda se colocó (+) a las pruebas positivas y (-) a las pruebas negativas, una vez que se tuvieron los resultados de las 10 cepas, se ingresó al sitio de API web <https://apiweb.biomerieux.com> para obtener la identificación de estas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reactivación de bacterias ácido-lácticas y verificación de pureza.

Al realizar la verificación de pureza de las cepas de bacterias ácido-lácticas que fueron aisladas del kéfir (**Tabla 4**), se describió la morfología colonial y microscópica, así como su Gram. En la literatura se describen las características generales de las bacterias ácido-lácticas, siendo cocos y bacilos de longitud variable, Gram (+), no esporulados, sin movilidad, con características fisiológicas uniformes y catalasa negativos (Parra, 2010).

Respecto a las condiciones en las que se incubaron las cepas, se observó que la mejor condición para el crecimiento de las cepas de BAL aisladas del kéfir en agar MRS fue en anaerobiosis e incubadas por 72 horas, esto debido a que las bacterias ácido-lácticas carecen de la enzima citocromo catalasa, teniendo un metabolismo anaerobio, sin embargo, tienen la capacidad de ser aerotolerantes (Parra, 2010).


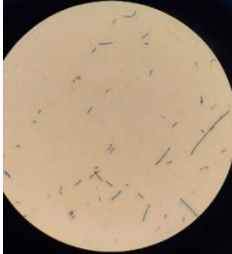

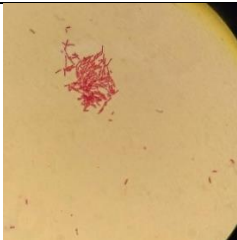
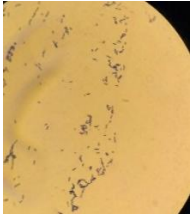

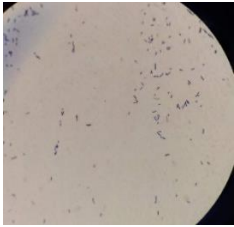
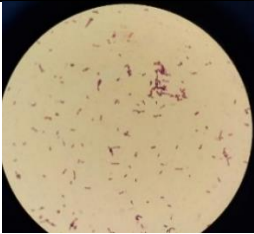
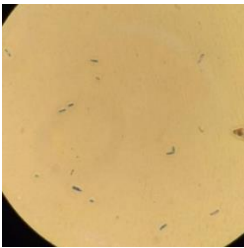
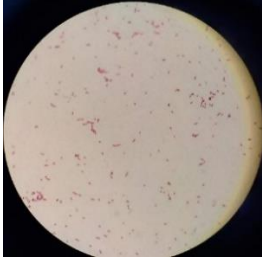
Por lo mencionado anteriormente para realizar las tinciones se consideraron 72 horas de incubación para un mayor crecimiento y mejores observaciones coloniales, asimismo se realizó una segunda tinción de Gram a las cepas aisladas del kéfir, pero en esta ocasión a las 48 horas de incubación (**Tabla 4**).

Tabla 4. Descripción morfológica de colonias y células al microscopio después de la tinción de Gram de cepas de BAL aisladas del kéfir.

CEPA	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	GRAM	GRAM
			48 h	72 h
E1-C	Colonias grandes, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos pequeños.	(-)	(-)
E1-D	Colonias grandes, redondas, cremosas y blanquecinas.	Cocobacilos, agrupados en cadenas cortas y largas.	(+)	(-)
E2-A	Colonias grandes y otras pequeñas, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos gordos agrupados en duplas.	(+)	(-)
E2-B	Colonias pequeñas, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos agrupados en cadenas.	(+)	(+)
E2-C	Colonias grandes, redondas, cremosas, blanquecinas y convexas.	Cocobacilos, agrupados en cadenas cortas y largas.	(+)	(-)
E2-O	Colonias pequeñas, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos cortos, agrupados en cadenas cortas y largas	(+)	(-)
E3-F	Colonias grandes, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos, agrupación en cadenas	(-)	(-)
E3-M	Colonias redondas, pequeñas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos, agrupados en duplas.	(+)	(+)
E3-N	Colonias pequeñas, redondas, blancas, cremosas y convexas.	Cocobacilos cadenas cortas y largas.	(+)	(-)
E3-P	Colonias pequeñas, redondas, blanquecinas, cremosas y convexas.	Cocobacilos en cadenas cortas y largas.	(+)	(-)

En la morfología colonial de las cepas aisladas en los tiempos 48 y 72 horas no hubo diferencia en las observaciones, en cuanto al color entre las cepas (blanquecinas), y a la forma (redondas), no se observaron variaciones, sin embargo, en cuanto al tamaño de las colonias aisladas, las cepas asignadas como Gram (-) tenían colonias grandes, mientras que las Gram (+) fueron colonias pequeñas. Ahora bien, la morfología microscópica fue en todos los casos cocobacilos, observados tanto en cadenas cortas y largas, de modo que al existir homogeneidad tanto en las colonias y en las células que se observaron al microscopio, es un indicativo de la pureza de las cepas **(Tabla 4)**.

Tabla 5. Imágenes observadas al microscopio (objetivo 100x) después de realizar tinción de Gram a las cepas con 48 horas de incubación.

Cepa	Imagen al microscopio	Cepa	Imagen al microscopio
E1-C		E2-O	
E1-D		E3-F	
E2-A		E3-M	
E2-B		E3-N	
E2-C		E3-P	

Cinéticas de crecimiento de cepas de BAL en medio MRS a 30 °C y 37°C.

Al realizar las cinéticas de crecimiento de las cepas E2-B y E2-C, con base en el procedimiento empleado para el **experimento 1**, se observó que con dichas condiciones el crecimiento de las cepas fue lento, incluso se comenzó con valores de absorbancia de 0.015 a 0.050, y dado que a la hora 24 comenzaba la fase exponencial como se muestra en las **Figuras 1 y 2**, se decidió incrementar el tiempo de incubación hasta 60 horas, pudiéndose observar una curva de crecimiento característica, es decir presentando las 3 fases en el crecimiento la fase lag de 0-12 horas, la fase exponencial de 12-36 horas y la fase estacionaria de 48-60 horas.

En cuanto al decremento del pH para ambas cepas fue lento hasta el monitoreo a las 12 horas de incubación, pero cuando se realizó el monitoreo a la hora 24, para la cepa E2-B (**Figura 1**), se observó que a 37°C hubo una caída de pH evidente incluso mayor a la observada a 30°C, los valores alcanzados a las 60 horas de monitoreo entre ambas temperaturas de incubación no tuvieron variación e incluso se observó que llegaron al mismo valor de pH final.

En la cepa E2-C (**Figura 2**), a 37 °C a la hora 24 se observó mayor decremento de pH en comparación con 30 °C, sin embargo, a partir de la hora 36 a 37°C el pH tuvo poca variación, obteniendo un pH final mayor en comparación con el obtenido a 30 °C, además de que la tendencia en la disminución de este parámetro fue mayor a esta temperatura.

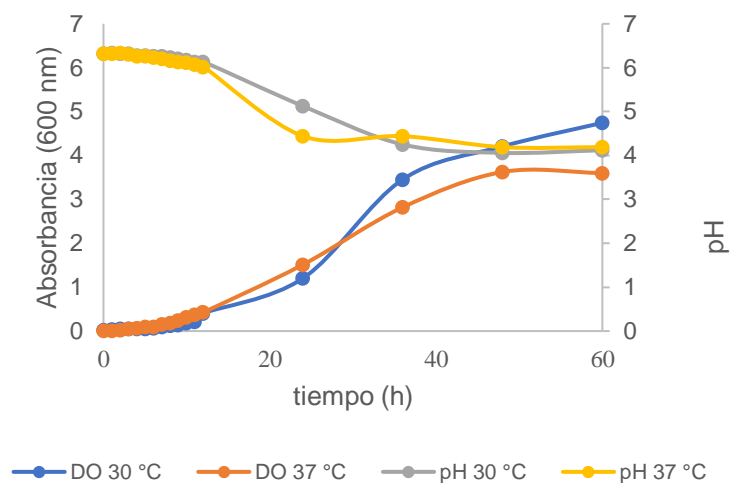


Figura 1. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-B, 30 y 37°C. Se presentan los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 - 0.15.

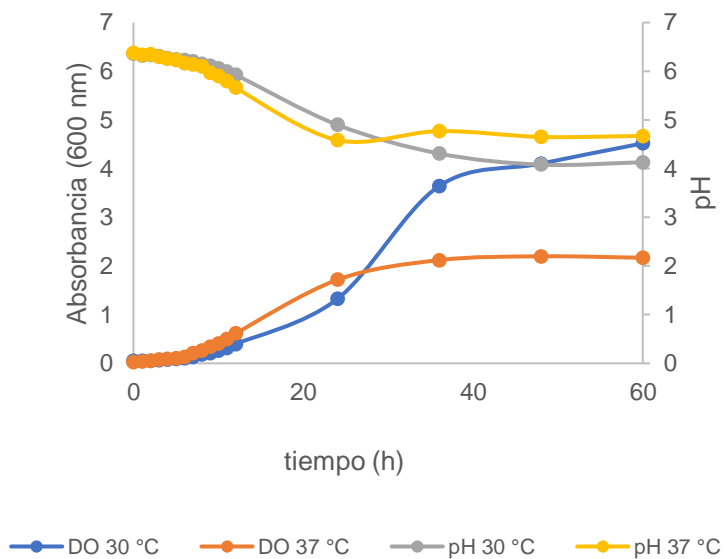


Figura 2. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-C, 30 y 37°C. Se presentan los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00-0.29.

Observando los resultados anteriores, se decidió repetir el experimento con las mismas cepas, incrementando el inóculo en los caldos MRS, con base en la proporción mencionada en la metodología en la sección del **experimento 2**, así como la modificación en los tiempos de monitoreo y la temperatura a evaluar, por lo que solo se realizó la incubación a 30 °C.

En este experimento se observó un incremento de poco más del doble en la densidad óptica en el transcurso de los monitoreos, por otra parte, en cuanto a los valores de pH medidos, no fueron mayores a los obtenidos en el primer experimento, por lo que incrementar el inóculo no fue un factor que acelerara su crecimiento, es decir, que se observara la fase exponencial antes de las 12 horas de incubación y una reducción de pH final menor a 4.0.

Para la cepa E2-C (**Figura 3**) la fase estacionaria comenzó a la hora 36 y continuó hasta la hora 48. El pH se mantuvo sin variación a partir de la hora 36, esta cepa presentó gran producción de gas

En el caso de la cepa E2-B (**Figura 4**), la fase estacionaria se alcanzó después de las 36 horas de incubación y hasta las 48 horas. A la hora 60 se observó un decremento en la densidad óptica. Durante toda la fermentación se observó que la cepa presentó gran producción de gas.

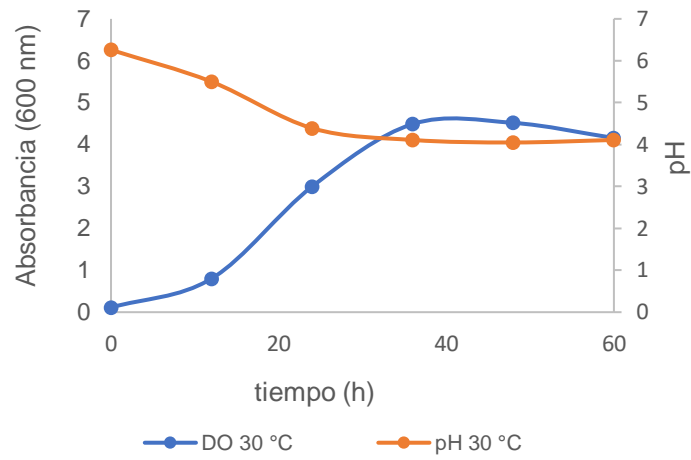


Figura 3. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-C, 30 °C. Aumento del inóculo inicial.

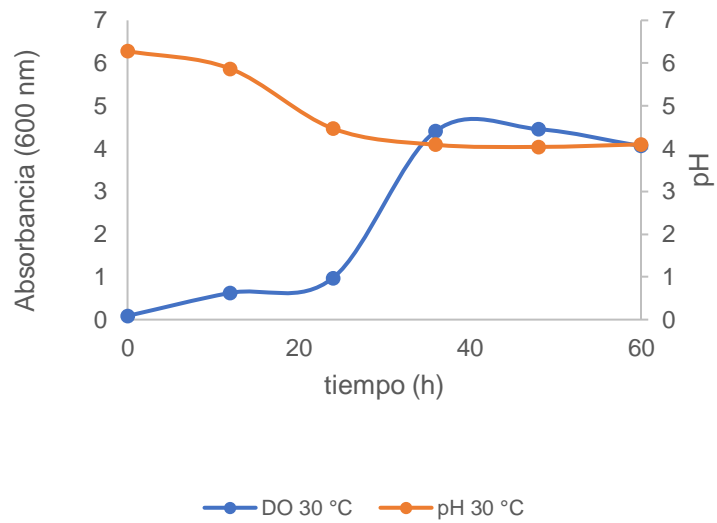


Figura 4. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-B, 30 °C. Aumento del inóculo inicial.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió continuar con las cinéticas de crecimiento de las 8 cepas restantes con las condiciones establecidas para el experimento **2**, modificando el tiempo de monitoreo de 0 a 36 horas de crecimiento (**Figuras 5 -12**).

A 37°C, las cepas mostraron comportamientos distintos, pues en las cepas E1-C, E1-D y E3-M se observó una meseta después de las 24 horas de incubación, por otro lado, las cepas E2-A, E2-O y E3-N después de dicha hora mostraron una curvatura indicando el inicio de la fase estacionaria, las cepas E3-F y E3-P mostraron tendencia exponencial después de esta hora.

Se observó un crecimiento característico de las cepas en cada temperatura evaluada, pues a 30 °C se mostró la fase exponencial de la hora 12 a 36, mientras que a 37 °C dicha fase se observó de la hora 12 a 24, además en esta se obtuvieron valores menores de densidad óptica que a 30°C al final del monitoreo (**Figuras 5-12**).

En cuanto a la disminución de pH el comportamiento fue similar, siendo característico para todas las cepas aisladas de este kéfir con origen Hidalgo, si bien algunas cepas disminuían más el pH del medio en períodos de tiempo más cortos, el pH final del medio siempre oscilaba en un rango de 4.0-5.0, esto en función de la temperatura de incubación, pues a 37 °C se obtuvieron valores de pH de 4.4 a 5.0 al haber transcurrido 36 horas de incubación, mientras que a 30 °C los valores obtenidos oscilaban de 4.0- 4.3 (**Figuras 5-12**).

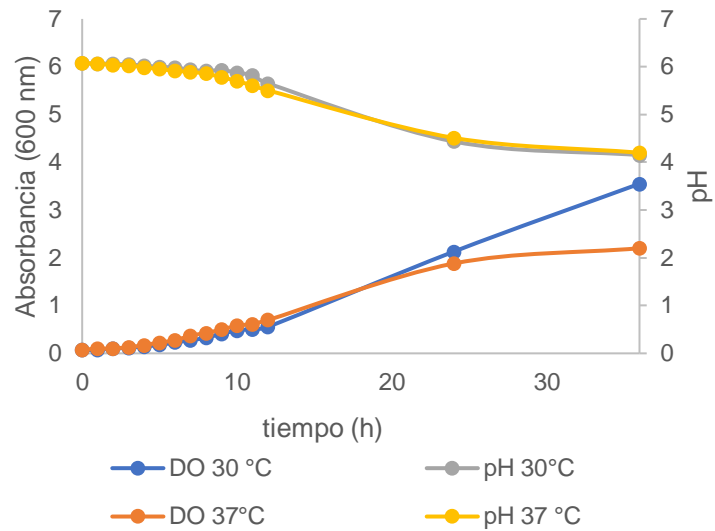


Figura 5. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E1-C, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.0 -0.78.

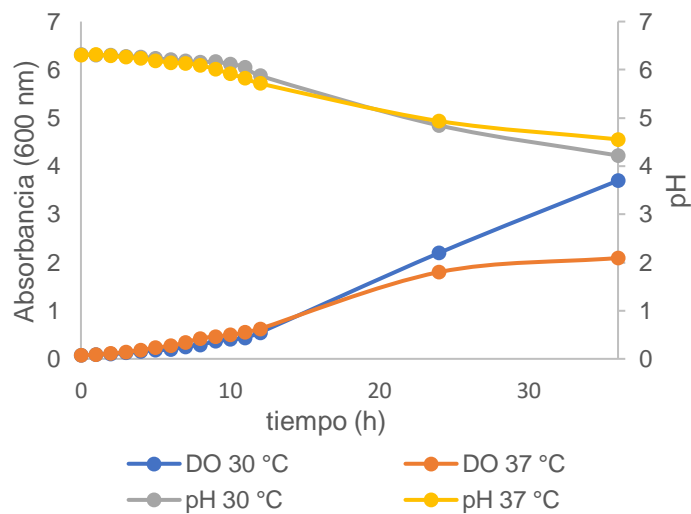


Figura 6. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E1-D, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.22.

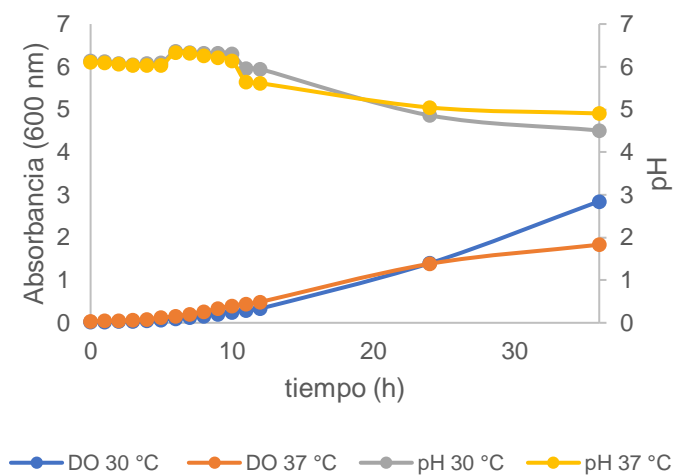


Figura 7. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-A, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00-0.157.

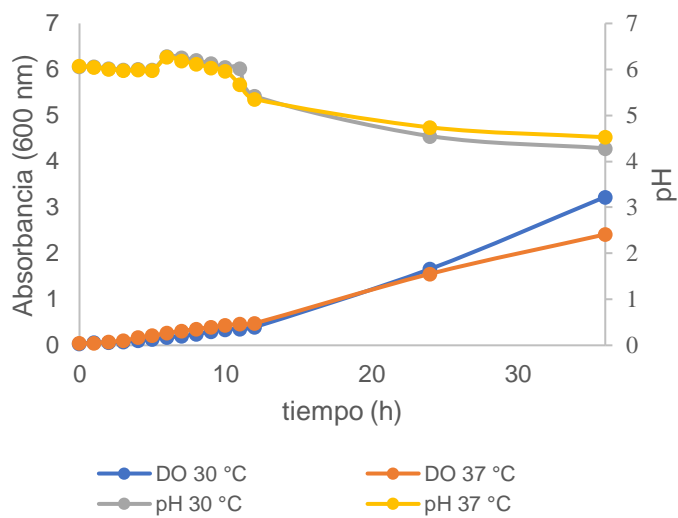


Figura 8. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E2-O, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.791.

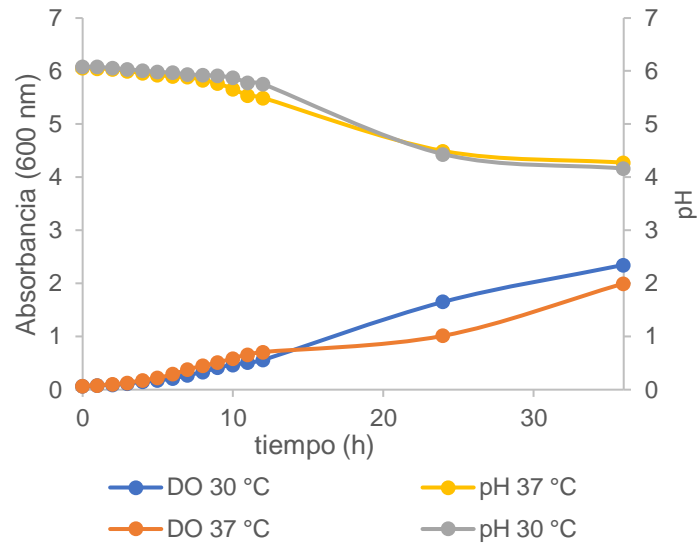


Figura 9. Densidad óptica y pH MRS de la cepa E3-F , 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.494.

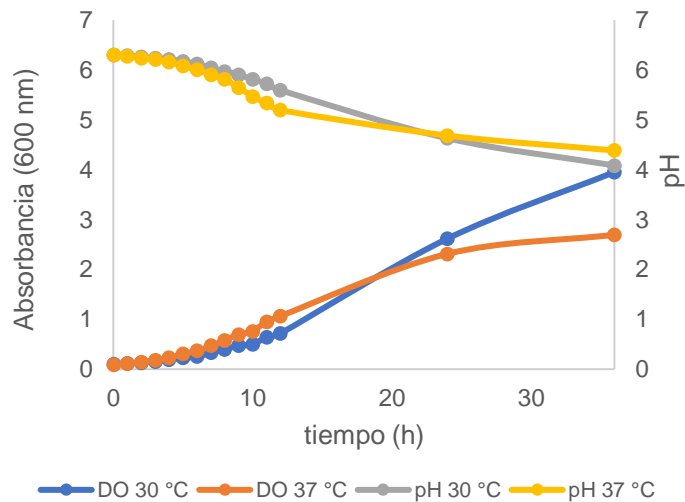


Figura 10. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E3-M , 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.104.

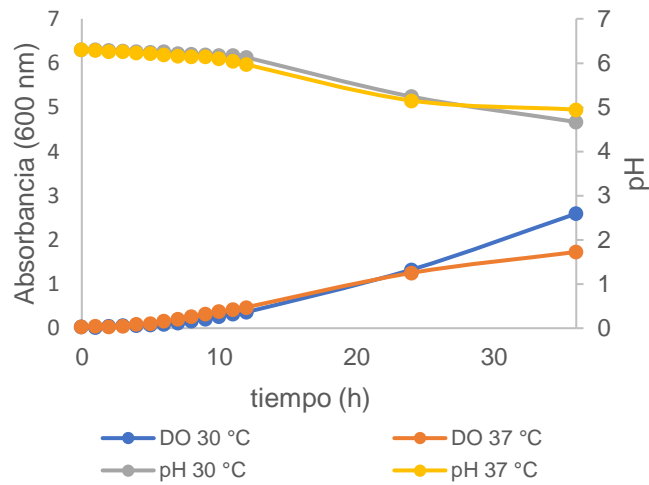


Figura 11. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E3-N, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.065.

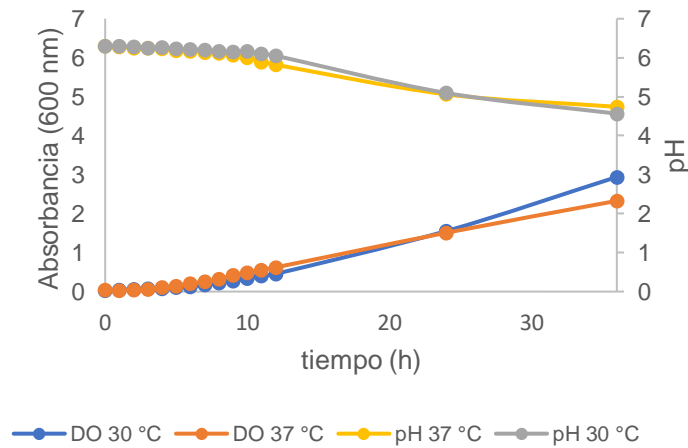


Figura 12. Densidad óptica y pH del medio MRS de la cepa E3-P, 30 y 37 °C. Se muestran los promedios de los resultados que se realizaron por duplicado, con desviaciones estándar de 0.00 -0.156.

Existen múltiples factores que afectan el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas en un medio de fermentación, los requerimientos nutricionales y la temperatura de incubación resultan ser los más importantes, pues existe una temperatura óptima de incubación en la cual se observa una velocidad de crecimiento mayor, la cual dependerá de las características de cada microorganismo (Parra, 2010). Para las 10 cepas de BAL se observó que la mejor temperatura de crecimiento fue de 30 °C, ya que la DO obtenida fue mayor que a 37°C. A 30°C se espera haya mayor producción de metabolitos de origen proteico similares a bacteriocinas y ácidos orgánicos porque a dicha temperatura las BAL tuvieron buen crecimiento y su fase logarítmica se extendió por mayor tiempo de incubación, en general de 12-48 horas, mientras que al estar en consorcio dentro de los gránulos de kéfir y ser fermentadas en leche, hay reportes que indican que a las 48 horas de incubación, se alcanza la fase estacionaria, en la que se sabe las bacterias se mantienen en latencia, debido probablemente a la simbiosis de las bacterias y levaduras que con mayor velocidad utilizan tanto las proteínas y carbohidratos presentes en el kéfir, mientras que el tiempo de incubación para la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana reportado es de 144 horas (6 días de incubación) para obtener dicho efecto (Silva *et al.*, 2009).

Ensayo de actividad antimicrobiana. Prueba de difusión en Agar.

a) Cuantificación de proteína en sobrenadantes liofilizados.

Se cuantificó la proteína presente en los sobrenadantes mediante la técnica colorimétrica de Bradford, considerando que la proteína cuantificada hace referencia a la cantidad de metabolitos de origen proteico que produce cada cepa de bacterias ácido-lácticas. En la **Tabla 6** se muestra la concentración promedio de proteínas para cada cepa, la cual fue medida por duplicado, mostrando que la cepa E2-C es la cepa con la mayor concentración de proteína (117.36 µg/mL) de las BAL estudiadas.

Tabla 6. Determinación de proteína por el método de Bradford en los sobrenadantes liofilizados de BAL.

Cepa	Concentración de proteína (µg/mL)	Desviación estándar
E1-C	109.20	0.145
E1-D	93.29	0.035
E2-A	103.11	0.084
E2-B	95.09	0.002
E2-C	117.36	0.018
E2-O	116.81	0.065
E3-F	111.69	0.064
E3-M	108.23	0.083
E3-N	97.30	0.194
E3-P	69.77	0.052

Cuantificar la proteína presente en los sobrenadantes nos dio una idea de la presencia de metabolitos de origen proteico y de el efecto de los sobrenadantes en las pruebas de difusión en agar contra microorganismos patógenos, con base en los resultados obtenidos (**Tabla 6**) las cepas con mayor concentración de proteína (mayor de 100 µg/mL) E2-C, E2-O, E3-F, E1-C y E3-M tendrán mayor efecto en la inhibición de micrororganismos patógenos.

Sin embargo, el medio de cultivo MRS es rico en proteínas, por la presencia de peptona, extracto de carne y extracto de levadura en su composición

(**Tabla A.11, anexo A**), por lo que dentro de la concentración determinada se encuentra el equivalente de proteínas perteneciente a estos, por tal motivo se sugiere realizar otro tipo de técnicas para identificar incluso el tipo de metabolitos de origen proteico con los que se está trabajando, por ejemplo, la precipitación selectiva de proteínas con sulfato de amonio, para concentrar y purificar las mismas e inclusive métodos de separación por cromatografía, HPLC, para posteriormente determinar su peso molecular en una SDS-PAGE y con ello iniciar su caracterización (Monroy *et al.*, 2009).

Posteriormente se llevó a cabo la prueba de difusión en agar de las cepas de BAL.

b) Ensayo de difusión en agar.

En la **Tabla 7** se muestran los resultados el efecto antimicrobiano de las cepas BAL, sobre las cepas *Streptococcus oralis*, *S. mutans* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 7. Resultados de la actividad antimicrobiana de cepas de BAL. Pruebas de difusión en Agar en medios tamponados.

Microorganismo a inhibir Sobrenadante a probar	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm)		
E1-C	15.5	19.0	-
E1-D	17.5	19.5	-
E2-A	16.0	16.0	12.5
E2-B	15.5	18.5	10.5
E2-C	-	17.0	-
E2-O	16.0	18.0	-
E3-F	-	19.5	-
E3-M	-	18.0	-
E3-N	16.5	16.5	10.0
E3-P	-	19.5	-

* La prueba se realizó por duplicado obteniendo una desviación estándar de 0.15.

Como se observa en la **Tabla 8**, *Streptococcus oralis*, bacteria presente en la cavidad oral, fue inhibida por los sobrenadantes obtenidos de las 10 cepas estudiadas tanto en el medio tamponado como en el no tamponado, indicando que los metabolitos formados por las BAL, de origen proteico y ácidos orgánicos previenen su crecimiento. En la **Figura 13** se observan los halos de inhibición en medio tamponado, en su mayoría los halos de inhibición fueron cercanos a 20 mm, también se describe el control positivo (clorhexidina 0.2%). Se ha reportado que el consumo de kéfir tiene un gran efecto protector sobre la desmineralización *in vitro* del esmalte dental debido a la presencia de caseinofosfopéptidos (CPP) (Koch *et al.*, 2015) cuestión que, probablemente, puede tener relación con la inhibición de dicho microorganismo.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana, mediante prueba de difusión en agar para *Streptococcus oralis*.

Cepa	Medio tamponado			Medio no tamponado		
	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
E1-C	19	1.41	7.44	16	1.41	8.84
E1-D	19.5	0.71	3.63	18	0.00	0.00
E2-A	16	1.41	8.84	16	1.41	8.84
E2-B	18.5	0.71	3.82	17.5	0.71	4.04
E2-C	17	0.00	0.00	16.5	0.71	4.29
E2-O	18	0.00	0.00	17	0.00	0.00
E3-F	19.5	0.71	3.63	18	1.41	7.86
E3-M	18	0.00	0.00	17.5	0.71	4.04
E3-N	16.5	0.71	4.29	17	0.00	0.00
E3-P	19.5	0.71	3.63	16	0.00	0.00

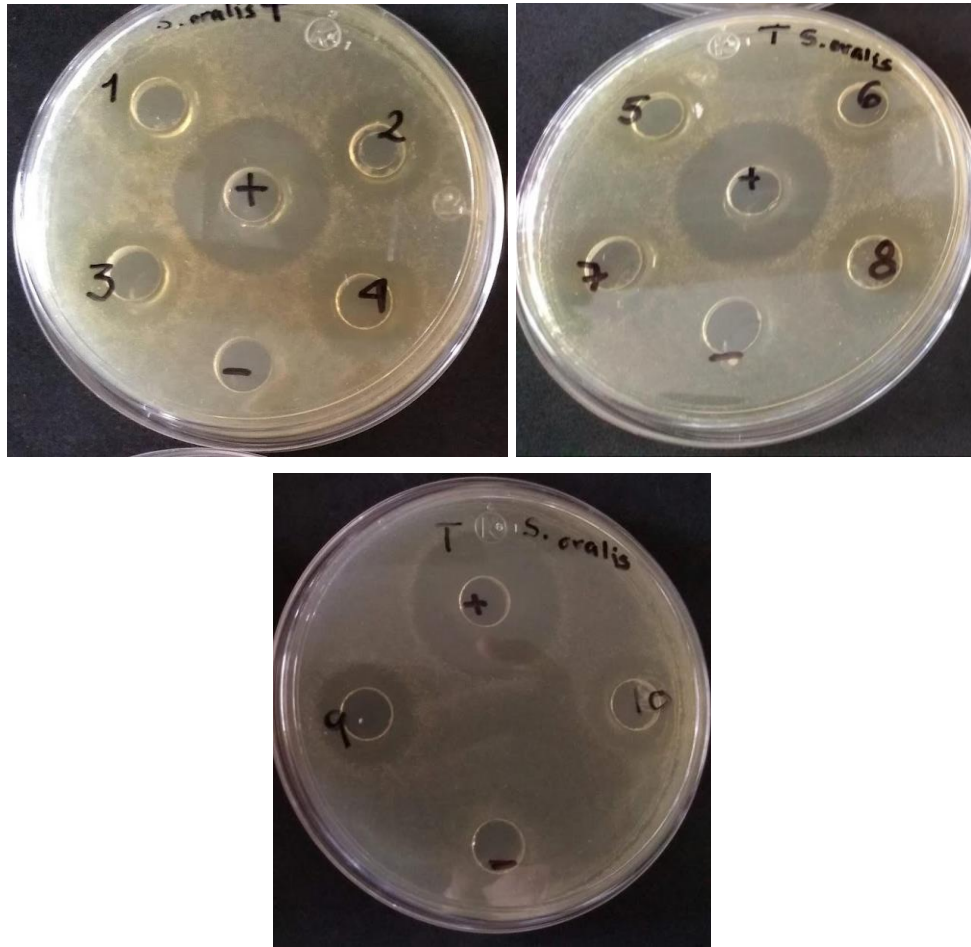


Figura 13. Prueba de difusión en Agar BHI tamponado, control positivo clorhexidina 0.2% (+) y control negativo agua destilada (-). Halos de inhibición formados por los sobrenadantes tratados de BAL sobre el césped de *Streptococcus oralis*.

La segunda bacteria de cavidad oral, *Streptococcus mutans* presentó inhibición por los sobrenadantes de 6 cepas tanto en medio tamponado como en el no tamponado (**Tabla 9**), pero en este caso el halo formado no se observó por completo sin crecimiento, pues se observaban algunas colonias dentro del mismo, suceso que también se observó para la cepa patógena de *Staphylococcus aureus*, acción observada por los sobrenadantes de 3 cepas (E2-A, E2-B y E3-N) en medio tamponado y no tamponado (**Tabla 10**), siendo los valores de los diámetros de halos de inhibición 12.5 mm, 10.5 mm y 10.0

mm respectivamente, menores en comparación con los medidos para *Streptococcus mutans* y *S. oralis* (Tabla 7).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana, mediante prueba de difusión en agar para *Streptococcus mutans*.

Cepa	Medio tamponado			Medio no tamponado		
	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
E1-C	15.5	0.71	4.56	21	1.41	6.73
E1-D	17.5	2.12	12.12	20	0.00	0.00
E2-A	16	1.41	8.84	20.5	0.71	3.45
E2-B	15.5	0.71	4.56	11	12.73	115.71
E2-O	16	1.41	8.84	22.5	3.54	15.71
E3-N	16.5	0.71	4.29	19	1.41	7.44

Tabla 10. Actividad antimicrobiana, mediante prueba de difusión en agar para *Staphylococcus aureus*.

Cepa	Medio tamponado			Medio no tamponado		
	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
E2-A	12.5	2.12	16.97	17.5	0.71	4.04
E2-B	10.5	0.71	6.73	13.0	1.41	10.88
E3-N	5.0	7.07	141.42	12.5	0.71	5.66

Al observar los resultados obtenidos, se decidió concentrar más los sobrenadantes para la prueba de sobrevivencia, esperando tener mayor efecto de inhibición contra *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, puesto que la fuente de carbono utilizada durante la fermentación del kéfir y su concentración, influye en el crecimiento microbiano y por ende en la actividad microbiana observada (Silva *et al.*, 2009).

En cuanto a las demás cepas estudiadas, es decir *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* 108412, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis* (las claves de las cepas se encuentran en la **Tabla C.1 (anexo C)**, no fueron inhibidas por los sobrenadantes de las cepas de BAL tanto en el medio tamponado como en el no tamponado, incluso hubo crecimiento dentro de los pozos.

Puesto que se esperaba inhibir principalmente a *Listeria monocytogenes*, se decidió realizar nuevamente la prueba esperando tener mejores resultados, de modo que, en esta ocasión, los sobrenadantes se concentraron aún más, al resuspender en un volumen menor, sin embargo, nuevamente no hubo inhibición.

Al observar que no hubo inhibición para *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, se sugiere que los metabolitos de origen proteico producidos por las cepas aisladas de kéfir, que permitieron la inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *S. oralis*, no son de clase IIa, pues éstos son péptidos activos contra *Listeria*, algunos ejemplos de éstas son la pediocina PA-1 y la sakacina P (Mondragón *et al.*, 2013; Barón, 2018).

Los sobrenadantes concentrados utilizados para la prueba con *L. monocytogenes*, también se utilizaron para la prueba contra *Bacillus cereus*, en el medio tamponado y no se observó inhibición.

Sin embargo, en el medio no tamponado se presentaron halos de inhibición contra *B. cereus* formados por 8 cepas BAL, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11**, y los halos se observan en la **Figura 14**.

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana del kéfir se debe a la producción de metabolitos como el ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas presentes en extractos sin células (sobrenadantes), los cuales inhiben a diversos microorganismos, entre ellos a *Bacillus cereus*, en este caso al ser un medio no tamponado no se afectan los efectos por los ácidos orgánicos, entre los cuales principalmente se encuentra el ácido láctico, producido en el proceso de crecimiento de las BAL, indicando que los ácidos orgánicos liberados son suficientes para inhibir su crecimiento (Kivanc y Yapici, 2015).



Figura 14. Prueba de difusión en Agar BHI no tamponado , control positivo clorhexidina 0.2% (+) y control negativo agua destilada (-). Halos de inhibición formados por los sobrenadantes tratados de BAL sobre el césped de *Bacillus cereus*.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana, mediante prueba de difusión en agar para *Bacillus cereus*.

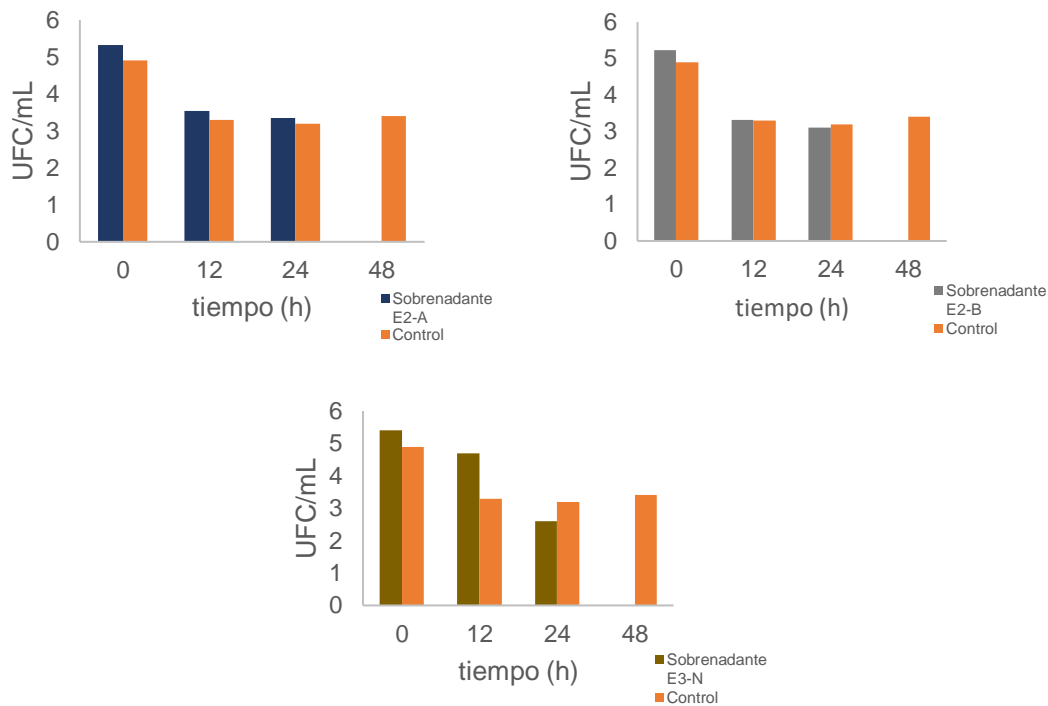
Cepa	Medio no tamponado		
	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
E1-D	20.5	0.71	3.45
E2-A	20.5	0.71	3.45
E2-B	20	0.00	0.00
E2-C	19.5	0.71	3.63
E2-O	19	1.41	7.44
E3-M	20.5	0.71	3.45
E3-N	18.5	3.54	19.11
E3-P	20	1.41	7.07

Tratamiento a sobrenadantes de cepas con actividad antimicrobiana. Ensayo de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* y *S. mutans*.

Se trabajó con los sobrenadantes de las cepas E2-A, E2-B y E3-N puesto que se observó que inhibieron a las 3 bacterias mostradas en la **Tabla 7**. A dichos sobrenadantes se les realizó un ajuste de pH y un tratamiento térmico, para su posterior liofilización. Una vez tratados, se inocularon con *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* para observar su sobrevivencia en contacto directo con las probables bacteriocinas. Realizar dichos tratamientos tienen un gran impacto para la prueba puesto que al ajustar el pH del sobrenadante estamos asegurando que el efecto de inhibición sea directamente por el efecto de metabolitos de origen proteico presentes y no por ácidos orgánicos, el tratamiento térmico fue un indicativo del tipo de metabolitos producidos, pues existen metabolitos que son termolábiles, por ejemplo las bacteriocinas de clase III, denominadas bacteriolisinas (Beristain *et al.*, 2012; Mondragón *et al.*, 2013).

En la **Figura 15** se muestra la sobrevivencia que presentó *S. oralis* al ser inoculada de forma directa en los tres sobrenadantes y en el control (procedimiento empleado para todas las cepas).

De forma específica, los comportamientos observados en cada sobrenadante son los siguientes: en cuanto a *S. oralis* en el sobrenadante E2-A, la disminución de la cuenta de viables del tiempo 0 a 12 hora fue grande, de 5.32 a 3.54 UFC/mL, mientras que de la hora 12 a la 24 no hubo gran diferencia entre la disminución, pues ésta fue de 3.54 UFC/mL a 3.35 UFC/mL, en el sobrenadante E2-B, fue similar a la que se tuvo en el sobrenadante E2-A, finalmente en el sobrenadante E3-N no hubo gran diferencia entre el decaimiento de su crecimiento entre la hora 0 y 12, sin embargo, de la hora 12 a 24, disminuyó de 4.7 a 2.6 UFC/mL (**Figura 15**).



FiFigura 15. Prueba de sobrevivencia de *Streptococcus oralis* en sobrenadantes tratados de cepas de BAL. Disminución de crecimiento de *S. oralis* en el transcurso del tiempo hasta la hora 24, en las barras color azul es el efecto observado en el sobrenadante E2-A, en las barras grises el observado en sobrenadante E2-B y en las barras café el observado en el sobrenadante E3-N. En las barras naranjas se muestra el efecto observado en el control.

Tanto en el control como en lo sobrenadantes, se observó que la sobrevivencia de *S. oralis* disminuyó conforme transcurrió el tiempo de incubación, sin embargo, en el control se observó crecimiento de *S. oralis* hasta la hora 48 del monitoreo, mientras que en los sobrenadantes hasta la hora 24, indicando su límite de sobrevivencia. En los sobrenadantes probablemente se encuentren presentes metabolitos de origen proteico producidos por las bacterias durante su crecimiento en el medio de crecimiento, teniendo efectos contra la membrana celular de *S. oralis*, por ejemplo, formando poros, pues estos efectos se han observado en las bacteriocinas por la atracción que generan sobre la membrana celular de los microorganismos por fuerzas electrostáticas, ya que las bacteriocinas están cargadas positivamente y tienen la capacidad

de interaccionar con los fosfolípidos de la membrana bacteriana cargada negativamente, aunado a la naturaleza anfipática de las bacteriocinas, factor que favorece su distribución sobre la superficie de la membrana celular bacteriana.

La unión que se da entre dichos metabolitos y el microorganismo diana (*S. oralis*) favorece la penetración hacia el interior no polar de la membrana celular, teniendo como resultado formación de poros en esta, permitiendo que el contenido intracelular pierda iones K, moléculas de ATP, en algunos casos aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular, provocando disminución del potencial de membrana y escasa disponibilidad de reservas energéticas, cuestión que lleva a la disminución de síntesis de DNA, RNA y proteínas, camino directo a la lisis de la bacteria (Heredia *et al.*, 2017).

En la **Figura 16** se muestran los resultados obtenidos para *Streptococcus mutans*, mostrando por su comportamiento tanto en el control como en los tres sobrenadantes, que presentó un decremento en el crecimiento hasta la hora 12, sin embargo, a la hora 24 y 48 se observó un incremento en esta, en el control, se presentó el mismo comportamiento, pero con la diferencia de que el incremento de células a las 48 horas fue mayor.

Dicho comportamiento que pareció ser característico, aparenta ser un comportamiento de probable adaptación al medio de crecimiento, en el que durante las primeras horas se adapta para posteriormente crecer con mayor impacto, es importante mencionar que al final de la prueba el medio se observaba más denso, espeso, lo que pudo indicar la formación de polímero por *S. mutans*, pues es probable haya producido dextranos o glucanos, en dónde este último sustrato es utilizado por la bacteria como reserva de nutrientes (Núñez y García, 2010), cuestión que provocó que fuera más difícil distribuirlo en las placas al no ser tan fluido.

Desde hace tiempo se conoce la relación directa que existe entre el consumo de azúcares principalmente sacarosa y la caries dental; esta enfermedad es el resultado del crecimiento de bacterias tales como *Streptococcus mutans* y *S. sanguinis*, que utilizan el disacárido y lo transforman en los ácidos pirúvico, acético y láctico, agentes que disuelven el esmalte de los dientes, probablemente la producción de estos ácidos, provocaron disminución del pH en el medio, los cuales pudieron generar cambios en las moléculas proteicas con acción antimicrobiana.

También se sabe que *Streptococcus mutans* en presencia de azúcares tiene la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares, por ejemplo, con la sacarosa es posible debido a la presencia de dos enzimas, la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF), la GTF sintetiza el glucano a partir de la glucosa, mientras que la FTF fructano a partir de la fructosa. Debido a estos polisacáridos es probable que se evitara el contacto de los metabolitos de origen proteico con la membrana celular de este microorganismo, de modo que tenían el efecto de barrera protectora, pues la síntesis de dextranos (polímeros de glucosa) les sirven de soporte, creando un microambiente adecuado para su desarrollo (Badui,2006; Ojeda *et al.*, 2012; Gamboa, 2014).

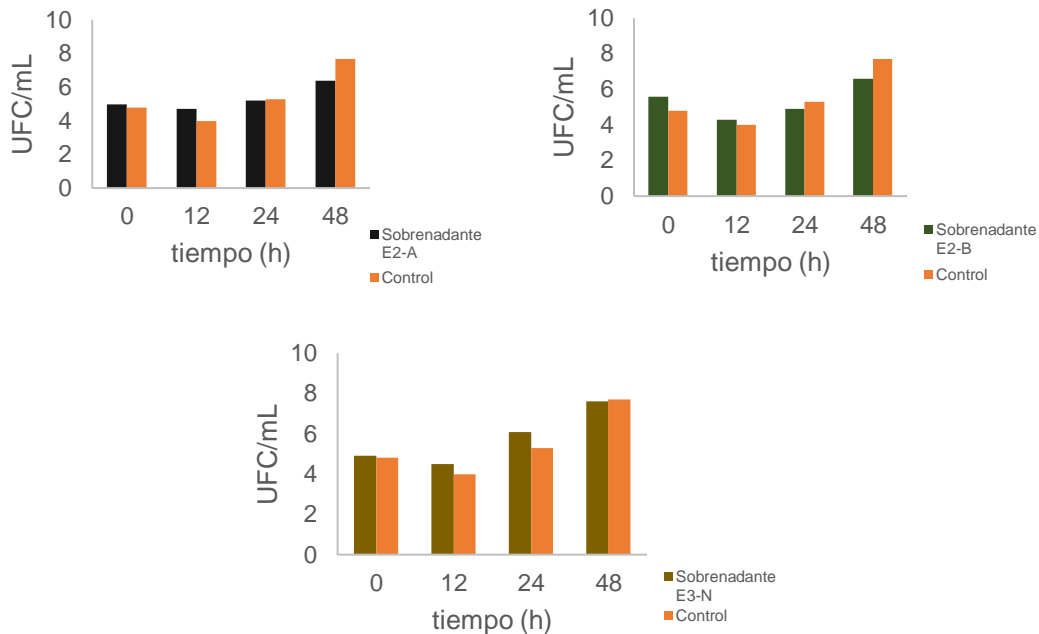


Figura 16. Prueba de sobrevivencia de *Streptococcus mutans* en sobrenadantes tratados de cepas de BAL. Barras de color negro corresponden al sobrenadante E2-A, barras verdes al sobrenadante E2-B y barras café al sobrenadante E3-N. Barra color naranja corresponden al control.

En la **Figura 17** se muestra el comportamiento de la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*, donde se observa variación entre los sobrenadantes, pues en el sobrenadante E2-A hubo una disminución en la cuenta a partir del monitoreo del tiempo 0 y de la hora 12, sin embargo, en las horas 24 y 48 horas se incrementó la cuenta. En el sobrenadante E2-B se observó un decremento en la cuenta del tiempo 0 a la hora 12 y de esta hora a la hora 24, pareciendo que en efecto este sobrenadante evitaría que *S. aureus* continuara sobreviviendo, sin embargo, en el monitoreo de la hora 48 se observó un incremento en la cuenta en placa, es probable que este sobrenadante creara un efecto importante para *S. aureus* en el proceso de adaptación al medio y por ello es que hasta la hora 48, creció con mayor impacto. Por otro lado, en el sobrenadante E3-N se observó un comportamiento peculiar pues en el tiempo 0 a la hora 12 hubo un incremento en la cuenta en placa, indicando que

no existía efecto del sobrenadante sobre *S. aureus*, sin embargo, en la hora 24, disminuyó la cuenta de colonias pareciendo que el efecto del sobrenadante era escaso y que existía probabilidad de evitar la sobrevivencia del microorganismo, pero en el monitoreo de la hora 48 nuevamente se incrementó la cuenta. El comportamiento del microorganismo en el control fue el característico observado en los demás controles, pues se comenzó con cierta cuenta de colonias, existió una disminución en la cuenta a la hora 12, para posteriormente presentar incremento en la cuenta en placa en los tiempos 24 y 48 horas, ya que era medio MRS y no BHI que es el medio utilizado especialmente para microorganismos patógenos por la composición que presenta (**Tabla A.12, anexo A**) ya que a partir de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa obtienen los nutrientes necesarios para vivir (BD, 2013).

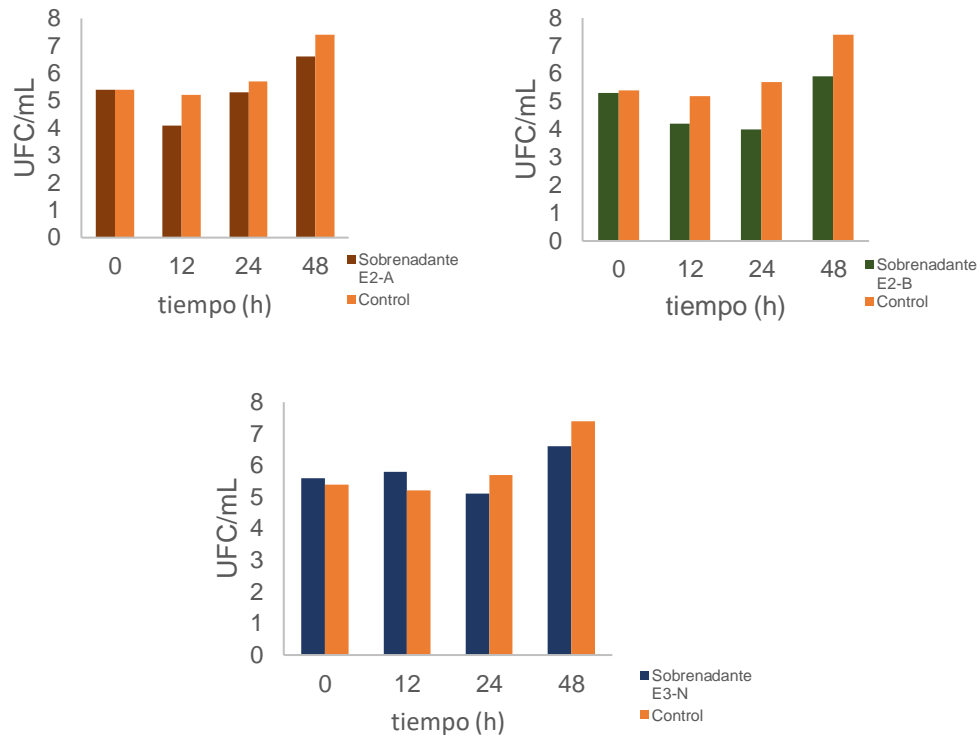


Figura 17. Prueba de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* en sobrenadantes tratados de cepas de BAL. En las barras color café se muestra el efecto obtenido por el sobrenadante E2-A, en las verdes el del sobrenadante E2-B y las barras de color azul el efecto del sobrenadante E3-N. Las barras color naranja muestran el comportamiento del control.

En los matraces donde se estaba realizando la prueba se observó que en las paredes quedaba un poco del medio (sobrenadantes), probablemente ocurría la formación de biopelícula por *S. aureus*, se conoce que dentro de los factores de virulencia presentan componentes en su pared celular y una gran variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Las biopelículas resultan ser una estrategia adaptativa, y que ofrece ciertas ventajas como, la protección de los microorganismos de la acción de agentes adversos incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita la obtención de agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y

posibilita la transferencia de material genético, incrementando sus capacidades de sobrevivencia (Domínguez *et al.*, 2010).

La producción de metabolitos de origen proteico depende del crecimiento y actividad fisiológica de las BAL, presentando una correlación de la biomasa obtenida con la cantidad de dichos metabolitos producidos, por lo que realizar ensayos utilizando otros medios de cultivo y otras condiciones de crecimiento de las cepas BAL, podría favorecer la producción de sustancias antimicrobianas, en la **Tabla 12** se muestran algunos medios que se han utilizado para aislar BAL (Mondragón *et al.*, 2013).

Tabla 12. Medios de cultivo utilizados para aislar BAL (Rodríguez, 2007).

Género de microorganismo	Agar
<i>Lactobacillus spp.</i>	MRS
<i>Lactococcus spp.</i>	M17
<i>Leuconostoc spp.</i>	MSE
<i>Leuconostoc</i>	APT

Caracterización de las cepas ácido-lácticas.

Actividad amilolítica.

Después de 24 horas de incubación el control utilizado (*Streptococcus infantarius* 25124) presentó crecimiento pero con colonias pequeñas, mientras que las cepas de BAL no presentaron crecimiento por lo que se dejaron incubar por dos días más, observando que el control mostraba colonias de mayor tamaño y halos de hidrólisis (**Figura 18a**), mientras que las BAL tuvieron

escaso crecimiento, por lo que se mantuvo en refrigeración a la cepa control, y se incubaron las cepas BAL por 4 días más.

Después de ese tiempo se observó crecimiento de las cepas BAL, sin embargo, no se observó actividad amilolítica a simple vista, por lo que, para confirmar dichas observaciones, se revelaron las placas con Lugol, haciendo aún más visibles los halos de hidrólisis del almidón de *Streptococcus infantarius* 25124 (**Figura 18b**), mientras que en las cepas BAL aún después de revelar, no se observó actividad amilolítica.

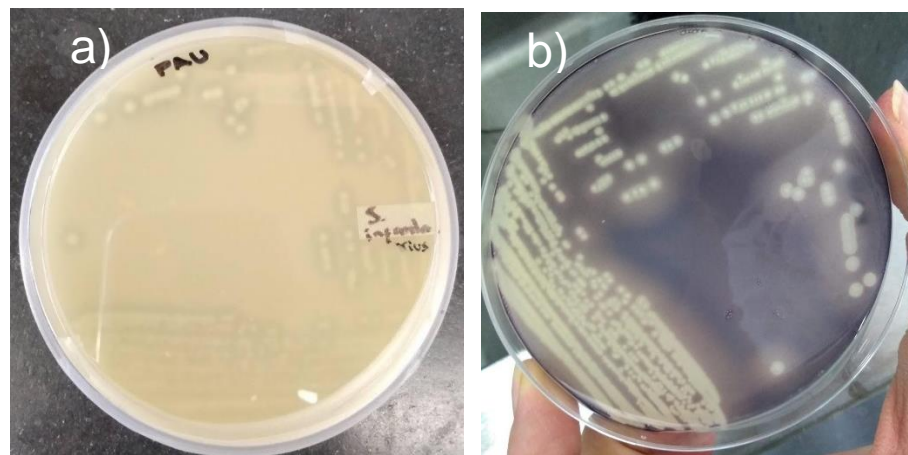


Figura 18. Ensayo de actividad amilolítica. Degradación enzimática del almidón realizada por el control *Streptococcus infantarius* 25124, se muestra la degradación del almidón en el medio MRS-almidón en halos formados sin revelar (a) y los halos en el medio después de revelar con Lugol (b).

Se sabe que el almidón se encuentra conformado por dos polímeros de glucosa, el primero es la amilosa y el segundo la amilopectina, el no presentar actividad amilolítica por las bacterias ácido-lácticas, indica que no sintetizaron amilasas que le permitieran hidrolizar al almidón, cuestión por la que le costó mayor trabajo crecer en el medio MRS-almidón (**véase composición en el anexo A, tabla A.2**), al no tener acceso directo a una fuente de carbono, es probable que utilizaran la peptona pancreática de caseína, extracto de carne y el extracto de levadura como fuente nutritiva, que les aportaba nitrógeno,

carbono, vitaminas y minerales, por ello es que probablemente el tamaño de las colonias también fue pequeño, en comparación con las observadas en el control (Agama *et al.*, 2012; Britania, 2015).

Actividad xilanolítica.

Para esta prueba se utilizaron dos tipos de xilano, de abedul y de maíz. Después de 4 días de incubación, se observó que el control *Streptococcus infantarius* 25124 presentó mejor crecimiento en cuanto a tamaño y cantidad de colonias en el medio de xilano de maíz (**Figura 19a**) así como hidrólisis evidente antes de revelar con rojo Congo al 0.2%, mientras que en el medio con xilano de abedul fue menor su crecimiento (**Figura 19b**) y del mismo modo no existió hidrólisis evidente.

En cuanto a las cepas BAL existió variación entre cepas en su crecimiento, pues las cepas E1-D, E2-A, E2-B, E3-F y E3-M en el medio MRS-xilano de abedul tuvieron mejor crecimiento en cuanto a la cantidad de colonias aisladas, mientras que las cepas E1-C, E2-C, E3-N y E3-P tuvieron mejor crecimiento en el medio MRS-xilano de maíz, en ambos medios, no se observó hidrólisis del xilano.

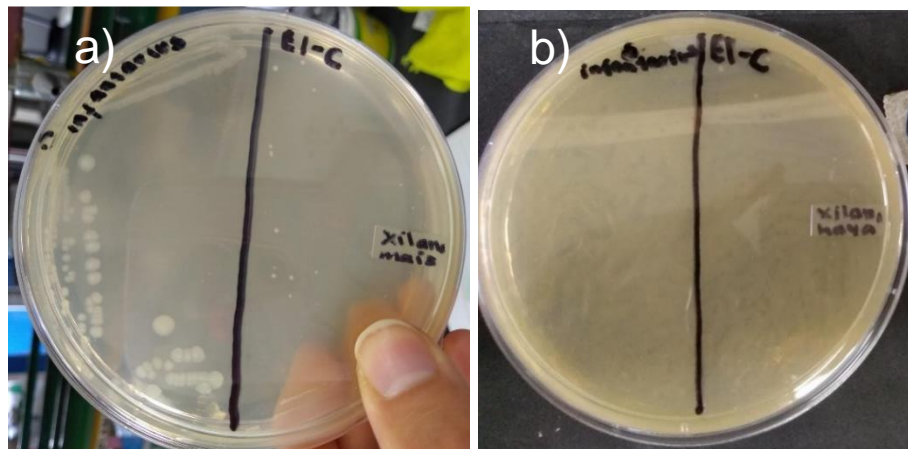


Figura 19. Ensayo de actividad xilanolítica. Degradación enzimática del xilano de *Streptococcus infantarius* 25124 (a) xilano de maíz (b) xilano de abedul

La hemicelulosa es un heteropolímero que comúnmente se encuentra ramificado, de dos a cuatro residuos de carbohidratos, ya sean hexosas (D-manosa, D, glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosa y D-arabinosa). El xilano es el polisacárido hemicelulósico, constituido por una cadena principal de β -(1-4)-xilopiranososa (xilosa); el arabinoxilano tiene residuos de α -1-arabinofuranosa (L-arabinosa) y ácido glucurónico en posición C(O)-2 y/o C(O)-3 sobre la estructura del xilano, dada su composición compleja resultaba ser necesaria la presencia de xilanasas en las BAL para observar hidrólisis en el xilano. Se han caracterizado completamente y patentado un cierto número de enzimas xilanolíticas y la mayoría de estas corresponden a hongos filamentosos, solo se han caracterizado β -xilosidasas y endo-xilanasas de los géneros *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*; existen pocos reportes de estas enzimas en otros géneros de bacterias, sin embargo, en la cepa utilizada como control *S. infantarius* se ha encontrado que tiene actividad xilanolítica sobre el arabinoxilano del maíz (Cooper, 2018).

El que se hayan utilizado fuentes distintas de xilano, probablemente influyen en el crecimiento de las bacterias, ya que la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso dentro de una misma planta, de acuerdo con la edad, tejido y etapa de crecimiento, además la composición y frecuencia de las ramificaciones dependen del origen de la hemicelulosa, pues en las maderas duras (madera de árboles que cambian hojas: álamo, abedul, olmo), la hemicelulosa principal es el xilano, donde entre el 60 y el 70% de los residuos de xilosa están acetilados.

Es importante destacar que la solubilidad de este polisacárido depende de su grado de sustitución o ramificaciones, pues en maderas duras, el xilano está presente en cadenas muy largas de 150 a 200 monómeros, mientras que en maderas suaves u otros materiales vegetales están formados de xilano de cadenas más cortas de 70 a 130 monómeros y con un menor grado de ramificación, cuestión que probablemente influyó para que las BAL crecieran

de mejor forma, asimismo el que no todas las cepas crecieran de la misma forma utilizando un polímero en específico y sin embargo se dividieran las cepas en dos grupos, hace pensar que la cepas que fueron agrupadas por su crecimiento en el medio xilano de abedul pudieran tener relación o inclusive ser la misma especie, relación que deben también presentar la cepas que crecieron en el medio xilano de maíz (Quiroz y Folch, 2011).

Actividad proteolítica.

En la prueba proteolítica en agar calcio caseinato, las colonias de BAL que crecieron fueron pequeñas, sin embargo, no se observó halo de hidrólisis después de 9 días de incubación.

El control, *Pseudomonas aeruginosa* mostró proteólisis en el agar calcio caseinato (**Figura 20**).

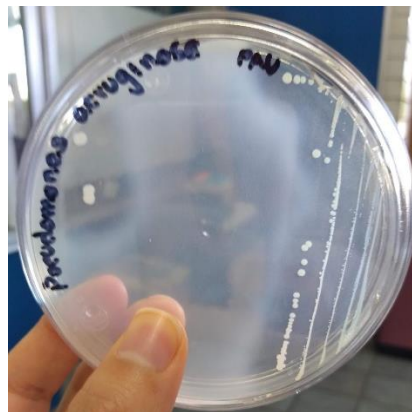


Figura 20. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar calcio caseinato.

En agar leche descremada las cepas BAL tras 7 días de incubación presentaron de forma general un mejor crecimiento, las cepas E3-M y E2-C fueron las que tuvieron mayor crecimiento y las colonias fueron más grandes sin halos de proteólisis (**Figura 21**). Sin embargo, en la cepa E3-M se alcanzó a ver un área del medio más clara, poniéndose de manifiesto su capacidad proteolítica (**Figura 21**).

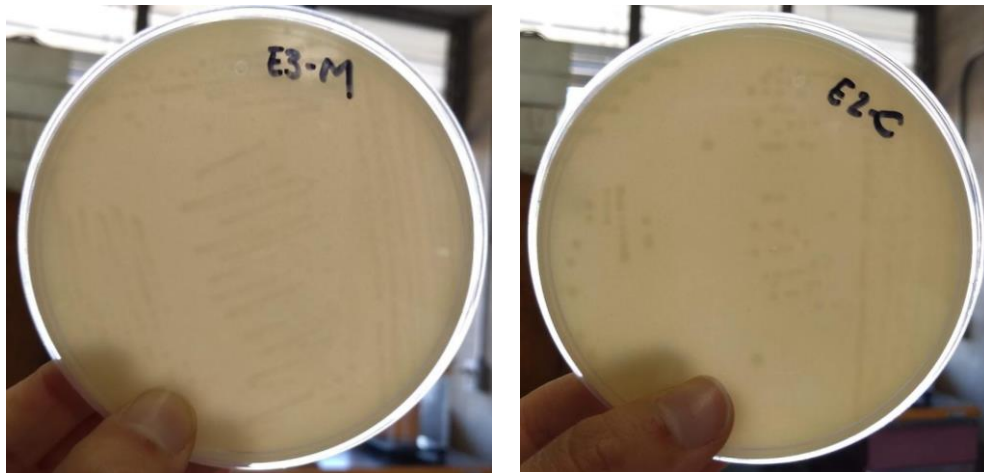


Figura 21. Crecimiento de cepas de BAL en agar leche descremada.

En la **Figura 22** se observa el crecimiento del control *Pseudomonas aeruginosa* inoculada en agar leche descremada mediante diferentes técnicas (picadura, estría y formación de pozos en agar) y sus halos de proteólisis. Se repitió la prueba con agar leche descremada para las BAL en viales, inoculando por picadura, mediante dicha técnica, debido a la gran turbidez del medio no fue posible observar halos por proteólisis, sin embargo cabe recalcar que la cepa E3-M tuvo bastante crecimiento en la parte superior de la picadura y el medio fue proyectado por formación de gas después de 4 días de incubación, al quinto día la cepa E1-C presentó el mismo comportamiento.



Figura 22. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar leche descremada. Se inoculó mediante estría, picadura y difusión en agar.

Los resultados obtenidos en el agar caseína no mostraron diferencia con las pruebas anteriores, pues el crecimiento de las cepas de BAL fue escaso y no se presentó proteólisis, para esta prueba también se realizó un control con *Pseudomonas aeruginosa*, presentando en el agar caseína una hidrólisis evidente (**Figura 23**).



Figura 23. Proteólisis en agar caseína por *Pseudomonas aeruginosa*, se inoculó mediante estría, difusión y picadura.

La capacidad proteolítica de las BAL juega un papel importante durante la fermentación de la leche, principalmente en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres, siendo que algunos péptidos presentan actividad biológica, por lo cual se les considera como péptidos bioactivos. A partir de leches fermentadas se han aislado numerosos péptidos con diversas actividades biológicas, entre las que destacan fracciones peptídicas con actividad inmunomodulante, anticancerígena, hipocolesterolémica, antimicrobiana, acarreadora de minerales, reguladora de actividad intestinal y del sistema nervioso y antioxidante. Los péptidos bioactivos más estudiados hasta el momento son aquellos implicados en el control de la presión arterial, de forma particular se han estudiado péptidos funcionales derivados de la caseína, presentes ya sea en la leche o en productos lácteos, los cuales han demostrado poseer efectos en el sistema cardiovascular debido principalmente a sus características antitrombótica o antihipertensiva, debido a ello es que resultaba de interés destacar la actividad proteolítica de las cepas BAL aisladas del kéfir de origen Hidalgo. Sin embargo, se ha puesto en evidencia que muchos péptidos antimicrobianos catiónicos pueden ser liberados por ruptura de proteínas intactas que pueden tener limitada actividad antimicrobiana o ninguna, pero un factor limitante para observar halos de actividad proteolítica fue que el tamaño de las colonias de dichas bacterias era muy pequeño y si existieron halos, fueron imperceptibles.

En el medio agar leche descremada aunque crecieron de mejor forma, hubo variación en el tamaño de las colonias observadas, indicando quizá que crecen mejor directamente en el producto alimenticio (leche) que utilizando una proteína en particular, otro factor, probablemente fue que la fuente láctea utilizada (leche descremada en polvo) no cubría por completo sus requerimientos nutricionales, quizá siendo necesario probar otras marcas (Villadóniga *et al.*, 2019; González *et al.* , 2011).

Actividad lipolítica.

En el medio de tributirina con emulsificante el crecimiento de las BAL se presentó con un mayor número de colonias en la mayoría de las cepas a excepción de las cepas E2-O y E2-C y con tamaño colonial pequeño, además, se logró observar la hidrólisis de la tributirina.

Al sembrar al control *Kocuria rhizophila* en el medio tributirina con emulsificante, se pudo observar la hidrólisis de la tributirina alrededor de la estría y las colonias aisladas, inclusive el mantener en refrigeración permitió observar mejor esta característica (**Figura 24**).

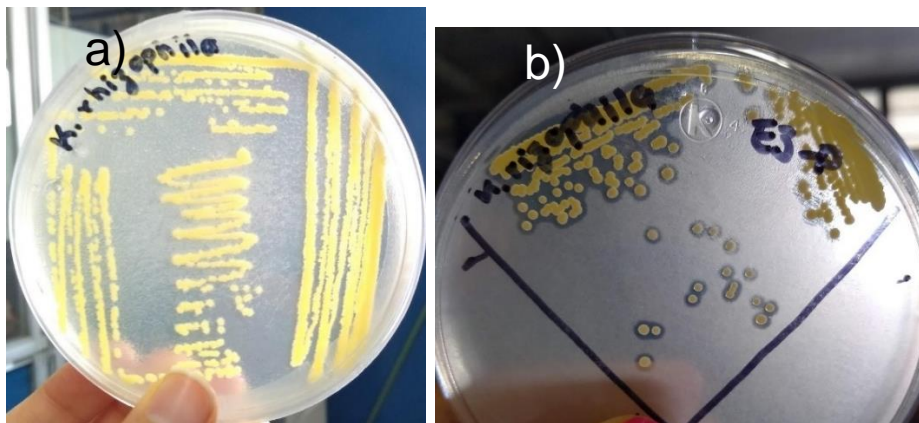


Figura 24. Ensayo de actividad lipolítica en agar tributirina. (a) Crecimiento de *K. rhizophila* en agar tributirina sin emulsificar, (b) Crecimiento e hidrólisis de la tributirina por *K. rhizophila* después de 48 horas de su crecimiento, en agar tributirina con emulsificante.

Las enzimas lipolíticas son miembros de la familia α/β hidrolasas que incluyen esterases (EC 3.1.1.1, carboxil éster hidrolasas) y lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3 triacilglicerol hidrolasas), ambas catalizan la rotura de un enlace éster entre un alcohol y un ácido carboxílico en medios acuosos. La función de estas enzimas es la hidrólisis de triacilglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos que contribuyen directamente a las características sensoriales de los alimentos fermentados (Torres *et al.*, 2014; López, 2015).

Las enzimas lipolíticas bacterianas son activas en un amplio rango de sustratos, pudiendo realizar reacciones de síntesis, hidrólisis o de intercambio de grupos, actuando sobre un compuesto químico en particular, produciendo un solo tipo de reacción y un solo tipo de producto, de modo que no se llevan a cabo reacciones laterales o generación de subproductos (Navarro y Periago, 2012).

De forma puntual, las diferencias entre esterasesas y lipasas es que éstas últimas muestran preferencia por sustratos insolubles en agua, ésteres con cadenas laterales largas (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las esterasesas hidrolizan ésteres solubles en agua parcialmente, con cadenas laterales cortas (<10 átomos de carbono), siendo la tributirina su sustrato estándar, por lo anterior dado que se trabajó con tributirina en la prueba lipolítica y existió actividad se puede decir que las enzimas producidas por las cepas de BAL ensayadas son del tipo esterasesas (González *et al.*, 2010; Navarro y Periago, 2012; López, 2015).

Se sabe que la presencia de esterasesas producidas por bacterias ácido-lácticas pueden influir significativamente en el aroma final de los productos fermentados obtenidos. En 1968, se describió por primera vez la presencia de la actividad esterasa en *Lactobacillus plantarum* cuando una cepa de esta especie fue la que presentó mayor actividad esterasa entre las bacterias lácticas aisladas durante la elaboración de queso Cheddar. Más tarde, casi 30 años después, se aislaron cepas de *L. plantarum* con actividad esterasa entre las cepas de la colección del National Dairy Products Research (Cork, Irlanda), dentro las cuales *L. plantarum* 2739, se purificó y caracterizó una esterasa intracelular, la esterasa E2, es un monómero de 65 kDa, que presentó actividad óptima a pH 7.5 y 35 °C. Entre los triglicéridos ensayados, se observó una mayor actividad frente a tributirina, aunque también hidrolizó trilaurina, tripalmitina y los ésteres de β -naftilo de los ácidos grasos de C2 a C12,

especialmente el butirato de β -naftilo, así como *Lactobacillus plantarum*, las BAL estudiadas, presentaron buena actividad para hidrolizar a la tributirina, asimismo el género de las cepas aisladas es *Lactobacillus*, por lo que es probable que la enzima lipolítica que producen sea del tipo esterasa, de modo que se sugiere identificar a dicha enzima (Torres *et al.*, 2014).

Prueba API 50 CH.

Los resultados obtenidos en las pruebas API 50 CH para las cepas de BAL se observan en la **Tabla 13**, indicando con (+) los carbohidratos que fueron fermentados y con un (-) a aquellos que no lo fueron.

Se observó que la mayoría de las cepas aisladas tienen la capacidad de metabolizar en su mayoría carbohidratos del tipo monosacáridos y disacáridos.

Tabla 13. Carbohidratos fermentables por cepas BAL aisladas del kéfir. Prueba API 50 CH.

Cepa	Carbohidrato															
	fermentable	L-arabinosa	Ribosa	Galactosa	Glucosa	Fructosa	Manosa	N-acetilglucosamina	Maltosa	Lactosa	Melobiosa	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa	Almidón	Glucógeno
<i>Streptococcus infantarius</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
E1-C	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
E1-D	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E2-A	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E2-B	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
E2-C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E2-O	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
E3-F	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E3-M	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
E3-N	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E3-P	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

La cepa E2-O tuvo la capacidad de metabolizar el mayor número de carbohidratos estudiados (10), así como ser la única en metabolizar a la manosa y fructosa. Las cepas E2-B, E3-M, E1-D y E2-A metabolizan 7 carbohidratos, la cepa E3-M fue la única de este grupo en metabolizar a la sacarosa, las cepas E1-D y E2-A fermentaron exactamente a los mismos carbohidratos indicando la probabilidad de presentar el mismo metabolismo o bien tratarse de la misma cepa de estudio. La cepa E3-N fue la única en metabolizar 6 carbohidratos, las cepas E3-P y E1-C metabolizaron 5 carbohidratos, esta última cepa fue la única que tuvo la capacidad de metabolizar al glucógeno, siendo este un polisacárido. Finalmente, las cepas E2-C y E3-F fueron las que metabolizaron el menor número de carbohidratos de la prueba (4).

Se tiene conocimiento de la existencia de una clasificación para los carbohidratos, que consiste en lo siguiente:

- a) Monosacáridos, aldehídos polihidroxilados o cetonas.
- b) Polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos
- c) Alcoholes polihídricos y ciclitoles, productos de la reducción de monosacáridos

Siendo de importancia hacer énfasis en que los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para atravesar la célula bacteriana para su degradación. En caso de que puedan ser metabolizados por alguna especie bacteriana en particular, en todo caso, primero son catabolizados a monosacáridos, ya que son menos complejos, esto mediante enzimas extracelulares (permeasas) para que éstos puedan ser incorporados al interior celular. Dado los resultados obtenidos que mostraron que las cepas BAL metabolizaron disacáridos y en el caso particular de la cepa E1-C al glucógeno (polisacárido), resulta evidente que pudieron utilizarlas como fuente de energía

gracias a la presencia de permeasas. En cuanto a los metabolitos formados después de un proceso de fermentación dependen de distintos factores, como el tipo de microorganismo con el que se esté trabajando, el tipo de sustrato que se va a fermentar y factores ambientales como la acidez y la temperatura del medio (MacFaddin, 2003).

Aunque la N-acetilglucosamina se presenta como unidad estructural de los polisacáridos, y pese a que su fórmula empírica no es $C_n (H_2O)_n$, sino en realidad se trata de un carbohidrato derivado de la glucosa no pudo ser metabolizado por las cepas BAL, sin embargo, el control *Streptococcus infantarius*, tuvo la capacidad de hacerlo (Bachmann, 1978).

Como se mencionó con anterioridad la única BAL aislada del kéfir que fermentó el glucógeno fue la cepa E1-C, se sabe que este es el polisacárido de reserva energética más importante, a nivel metabolismo se emplea como fuente de glucosa, la que a su vez se usa en la glucólisis para producir moléculas de ATP y de ácido láctico (Badui, 2006).

Con base en los resultados obtenidos, todas las cepas BAL con la capacidad de metabolizar varios de los disacáridos y monosacáridos mencionados con anterioridad, se puede decir que dentro de su metabolismo, presentan permeasas que podrían ser del tipo EII específicas para cada carbohidrato por ejemplo para la glucosa, lactosa y manosa, lo que hace posible su fermentación (Esteban, 2004).

Prueba para determinar homofermentación o heterofermentación.

a) Medio de cultivo M5.

Se decidió utilizar el medio M5 porque en diversos estudios se ha observado, que este se utiliza como medio general para distinguir BAL homofermentativas de heterofermentativas que utilizan la fructosa (Zúñiga *et al.*, 1993; Ramírez y Vélez, 2016). En las pruebas API se observó que de todas las cepas BAL, solo

la cepa E2-O fermentó la fructosa, sin embargo, no se modificó la formulación del medio cambiando a la fructosa por glucosa, debido a que en estudios en los que se realizó dicho cambio, se observó que el crecimiento de las bacterias fue pobre y el comportamiento de las cepas se vio alterado, es decir muchas de las cepas heterofermentativas se comportaban como homofermentativas.

Las características de los medios de cultivo M5 observados para los controles utilizados para esta prueba fueron para *Lactococcus lactis* 54 ch, vire completo del medio de azul a amarillo (homofermentativo), mientras que para *Leuconostoc mesenteroides* 73, el medio se mantuvo en su mayoría verde-azulado (heterofermentativa) (**Figura 25**). Dentro de la formulación del medio M5 existen factores que llegan a afectar el pH del medio e inclusive el incremento en la acidez producida por las bacterias puede provocar que las BAL heterofermentativas sean evaluadas como cepa homofermentativa, motivo quizá por el cual comenzó un vire del medio para *Leuconostoc mesenteroides*.

En cuanto a las cepas de BAL, la cepa E1-C mostró un vire del medio de verde a amarillo en una mayor proporción de la caja Petri por lo que es posible que sea una cepa homoláctica (**Figura 26**).

El resto de las cepas en su crecimiento mantuvo el color verde en gran parte de la caja Petri, pareciendo que se trataran de cepas heterolácticas, cabe mencionar que existió un vire de verde a amarillo en las regiones dónde se realizaron las estrías al momento de sembrar, se sabe que el género *Lactobacillus* presenta fermentaciones tanto homoláctica como heteroláctica, sin embargo, resulta probable que haya sido por la acidez del medio debido al lento crecimiento de las cepas BAL que se mantuvieron en incubación por 5 días (**Anexo A, tabla 10.A**).

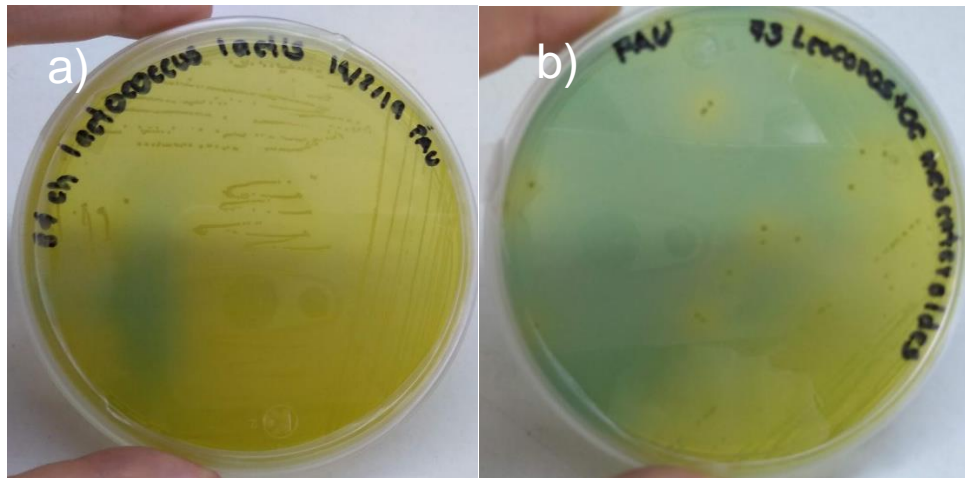


Figura 25. Prueba homo y heterofermentativa en el medio M5 para cepas control.

(a) *Lactococcus lactis* 54ch; (b) *Leuconostoc mesenteroides* 73.

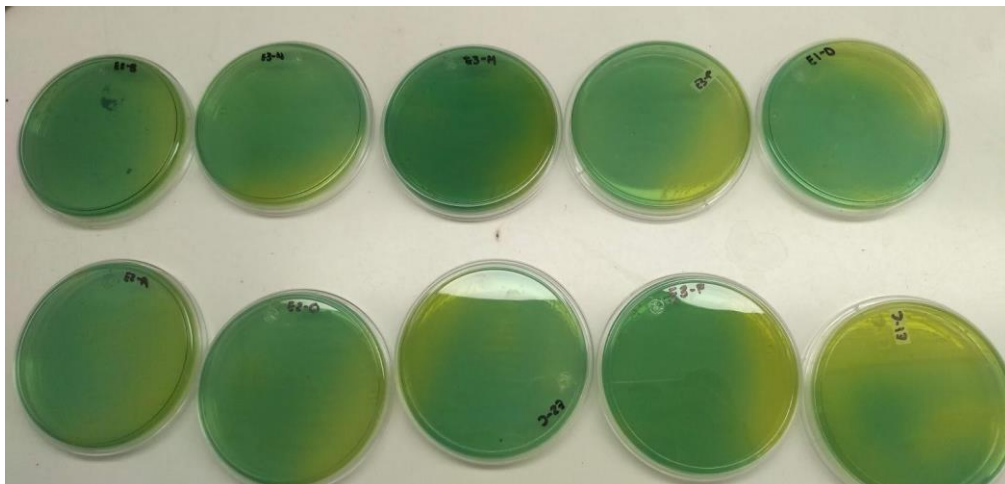


Figura 26. Prueba homo y heterofermentativa en el medio M5 para cepas BAL aisladas del kéfir.

b) Prueba de producción de gas.

Se realizó una segunda prueba para evaluar la producción de gas y la fermentación de la lactosa, utilizando caldo rojo de fenol con campanas de Durham.

Para esta prueba se utilizaron como controles las cepas de *Escherichia coli* 27377 control (+) para producción de gas y fermentación de la lactosa, para el control (-) se utilizó a *Salmonella Typhimurium* (**Figura 27**).



Figura 27. Fermentación de lactosa y producción de gas en caldo rojo de fenol. a) *E. coli*, control positivo; b) *Salmonella Typhimurium* control negativo.

En el caso de las cepas BAL, la cepa E2-A, E2-B y E2-O, después de 24 horas de incubación resultaron ser (+) a producción de gas y fermentación de la lactosa. Los resultados del resto de las cepas después de 7 días de incubación se muestran en la **Tabla 14**.

El resto de las cepas evaluadas mostraron una producción de gas negativa y fermentación de la lactosa positiva a excepción de la cepa E3-N que no presentó fermentación en este medio, sin embargo, en la prueba API sí existió la fermentación de dicho carbohidrato.

Dentro de la composición del medio utilizado, se utilizó como indicador de pH el rojo de fenol puesto que los metabolitos generados a partir de la lactosa son ácidos orgánicos. El cambio de coloración en el medio ocurrió cerca del pH original del medio (pH ácido 6.8; pH del medio 7.4). Existe la probabilidad de que ocurriera la degradación de la peptona en el medio por las especies bacterianas, por lo tanto producción de sustancias alcalinas, cuestión por la que no hubo vire en el medio, además el ácido producido en la fermentación de un carbohidrato es visible por un cambio de pH, sólo cuando exista mayor producción de ácido que producción de sustancias alcalinas por la degradación de la peptona, quizá dicho motivo tuvo influencia en que no ocurriera vire en la cepa E3-N por la baja concentración de ácidos que produjo (MacFadinn, 2003).

Tabla 14. Resultados de prueba de producción de gas y fermentación de la lactosa para cepas BAL, caldo rojo de fenol. Se realizaron por duplicado.

Cepa	Producción de gas	Fermentación de la lactosa
<i>Salmonella</i> Tiphymurium	-	-
<i>E. coli</i> 27377	+	+
E1-C	-	+
E1-D	-	+
E2-A	+	+
E2-B	+	+
E2-C	-	+
E2-O	+	+
E3-F	-	+
E3-M	-	+
E3-N	-	-
E3-P	-	+

En la **Figura 28**, se ejemplifica con la cepa E2-A los resultados positivos para producción de gas y fermentación de la lactosa, observados también para las cepas E2-B y E2-O, de modo que estas tres cepas se designan como bacterias heterolácticas, mientras que el resto de las cepas, al no producir gas y fermentar la lactosa promoviendo un vire en el medio, indica que son bacterias homolácticas.



Figura 28. Producción de gas y fermentación de la lactosa en caldo rojo de fenol para las cepas de BAL.

Relación de resultados obtenidos en la identificación de las BAL aisladas al secuenciar el gen rRNA 16S y los resultados obtenidos en la caracterización de estas.

En efecto el género de las bacterias aisladas fue *Lactobacillus* como se menciona en la **Tabla 3**, en cuanto a la especie hubo incluso identificación de tres especies para una misma cepa con el 99% de identidad, siendo las especies involucradas en esta identificación E2-A, E3-M , E3-N y E3-P (indicadas de color rosa); la cepas que tuvieron asignación de dos especies fueron E1-C , E2-O y E1-D (indicadas de color naranja), las cepas que fueron identificadas como *Lactobacillus kefir* fueron E2-B, E2-C y E3-F (indicadas de color verde).

Con los resultados obtenidos, proporcionar una identificación precisa de las cepas resulta difícil, pues todas se comportaron de forma diferente en todo el proceso de evaluación, desde su crecimiento hasta la caracterización de las mismas, inclusive en la identificación microbiana utilizando las tiras API, el

microorganismo con mayor porcentaje de identificación para cada una de las cepas fue *Lactobacillus fermentum* 1, sin embargo, dicho porcentaje fue diferente para cada cepa (**Tabla 15**), ya que fermentaron carbohidratos de forma diferente, incluso pasadas las 48 horas de incubación de la prueba, fermentaban más carbohidratos, puesto que su crecimiento fue muy lento, sin embargo, ahora se sabe que no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica, pues una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos, además de las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente a la prueba, entre otras cosas, por lo que se han impuesto los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos. En este caso la secuenciación del gen rRNA 16S solo indicó género y especie, pero debido a la variabilidad de su comportamiento es posible que las cepas BAL tengan una subespecie, motivo por el cual estas cepas se comporten de manera distinta. Se utilizó el gen rRNA 16S, aunque se sabe que existe una amplia variedad de genes que han sido utilizados como dianas moleculares en estudios taxonómicos o bien de filogenia dentro de los distintos géneros y especies microbianas, además de que este análisis resulta ser el marcador inicial y en ciertas ocasiones un marcador suficiente para realizar una identificación con mayor precisión, a menos de que exista una alta homología genética que se encuentre presente en ciertos géneros microbianos o un reciente cambio en la asignación taxonómica, de modo que la identificación por el gen rRNA 16S no permita realizar una identificación a nivel especie o de géneros caso que ocurrió para las cepas BAL aisladas del kéfir (Bou *et al.*, 2011).

Tabla 15. Porcentaje de identificación para cada cepa BAL indicando ser *Lactobacillus fermentum* 1. Sistema API 50CH.

Cepa	% de identificación
E1-C	84.1
E1-D	86.2
E2-A	84.1
E2-B	99.9
E2-C	94.4
E2-O	73.1
E3-F	74.7
E3-M	81.6
E3-N	91.7
E3-P	71.0

CONCLUSIONES

Las 10 cepas aisladas del kéfir con origen de Hidalgo son bacterias de lento crecimiento, comenzando la fase logarítmica a la hora 12 de incubación y concluyendo a la hora 48 (comienzo de la fase estacionaria) en el medio MRS, son microaerofílicas, con temperatura óptima de crecimiento de 30°C, con exigencias nutricionales distintas entre sí. El carbohidrato que utilizan por excelencia es la glucosa y sin una fuente de carbono a partir de carbohidratos, su crecimiento es limitado.

En su mayoría las BAL fermentan monosacáridos y disacáridos, sin embargo, la cepa E1-C es la única cepa con la capacidad de metabolizar un polisacárido, el glucógeno. Las cepas BAL tienen actividad lipolítica en agar tributirina y en general, no presentan actividad proteolítica, amilolítica y xilanolítica, sin embargo, en este último la fuente de origen del xilano influye en su crecimiento.

La evaluación de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las BAL mediante el método de difusión en agar bajo las condiciones empleadas, mostró un buen efecto de inhibición para *Streptococcus oralis*, y un efecto limitado contra *Streptococcus mutans*, mientras que para las bacterias patógenas presentes en alimentos evaluadas en este trabajo no hay efecto de inhibición, con excepción de *Bacillus cereus*.

La sobrevivencia de las bacterias de cavidad oral en sobrenadantes de BAL con metabolitos de origen proteico se vio afectada al estar en contacto directo, el mayor efecto se observó para *S. oralis* seguido de *S. mutans*.

PERSPECTIVAS

Obtener los metabolitos producidos por las BAL a la hora 36 de incubación a 30 °C, ya que es la hora en que termina la fase exponencial y a la hora 48 que es aproximadamente la mitad de la fase estacionaria, pues hay bacterias que en este punto producen mayor cantidad de metabolitos, también realizar el frotis para la prueba de tinción de Gram a la hora 36, para obtener mejores observaciones en el microscopio. Una vez que se hayan obtenido este procedimiento, liofilizar las muestras y realizar prueba de difusión en agar y en caso de observar actividad antimicrobiana, separar las bacteriocinas mediante precipitación de proteínas para caracterizarlas.

Seguir trabajando con el agar leche descremada para observar actividad proteolítica, pero cambiando la fuente láctea y realizar una prueba de fermentación directamente en leche líquida para obtener mejores resultados, inclusive precipitar las proteínas después del crecimiento de las BAL en el mismo y caracterizarlas.

Realizar la prueba de homo y heterofermentación, utilizando el medio M5 con glucosa en lugar de fructosa, para constatar si hay cambio en los resultados observados.

Llevar a cabo otras metodologías para mejorar la identificación de las cepas, propongo realizar la secuenciación del RNA 23S como método auxiliar, ya que es utilizado como buena alternativa cuando la fracción 16S no proporciona resultados concluyentes.

REFERENCIAS

1. Agama, E., Juárez, E., Evangelista, S., Rosales, O., Bello, L., (2012), Características del almidón de maíz y su relación con las enzimas de su biosíntesis, *Agrociencia*, 47, 1-12.
2. Alais. Ch., (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. 4. Barcelona: Reverté, págs.359-360.
3. Anaya L. y López L. (2018). Identificación y caracterización como probióticas de cepas de bacterias lácticas aisladas de una muestra de kéfir de Pachuca, Hidalgo. Informe de servicio social. Licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma de Hidalgo, págs.1-20.
4. Arslan, S., (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir, *CyTA - Journal of Food*, 13(3), 340-345.
5. Badui, S., (2006). *Química de los alimentos*.4, Estado de México: Pearson educación, págs. 97
6. Bachmann, K., (1978). *Biología para médicos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología*. España: Reverté, pág.19
7. Barbieri, G., Flores, J., Vignoletti, F., (2005), El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal, *Avances en periodoncia*, 17,11-16.
8. Barón, M., (2018), Inactivación de *Listeria monocytogenes* por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido. Proyecto de fin de carrera. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela técnica superior de Ingeniería Agronómica, pág. 15.
9. Barreto, M., Castillo, M., Retamal, P., (2016), *Salmonella enterica*: una revisión de la tríada agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557.
10. Barros, C., (2008). *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. Madrid: Vision libros, pág. 65.
11. BD, (2013), *BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar*. [En línea] (Actualizado en abril de 2013).

Disponible en:

<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800> [Último acceso 29 de julio 2019].

12. Bédard, F., Biron, E., (2018). Recent progress in the chemical synthesis of class II and S-glycosylated bacteriocins. *Frontiers microbiology*, 9, 1048.
13. Beristain, S., Palou, E., López, A., (2012), Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en alimentos, *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 6(2), 64-78.
14. Boldrini, G., (2009), Consumo de kéfir y frecuencia evacuatoria. Tesis para obtener el título de Licenciada en Nutrición, Facultad de ciencias de la salud, Universidad FASTA, pág. 17
15. Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., Valdezate, S., (2011), Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, *Enfermedades infecciosas de microbiología clínica*, 29(8),601-608.
16. Bourrie B., Willing B., y Cotter P. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*,7, 647.
17. Britania, (2015), *M.R.S. Agar*. [En línea] (Actualizado en noviembre 2015). Disponible en:
https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2842df7536d.pdf [Último acceso 31 de julio de 2019].
18. Byers, H., Tarelli, E., Homer, K., Beighton, D., (2000), Isolation and characterization of sialidase from a strain of *Streptococcus oralis*, *Joint research microbiology*, 49, 235-244.
19. Carasi, P., Macedo, S., Jacquot, C., Romanin, D., Serrandell, M., Urdaci, M., (2014). Impact of kefir derived *Lactobacillus kefiri* on the mucosal immune response and gut microbiota. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Immunology Research*, 2015, 1-12.

20. CDC, (2019), *La Salmonella y los alimentos*. [En línea]. (Actualizado al 4 de abril de 2019).
Disponible en:
<https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/salmonella/index.html>[Último acceso 8 de julio 2019].
21. Control de calidad SEIMC,(1997), *Listeria y listeriosis*. [En línea]. (Actualizado en diciembre de 1997).
Disponible en:
https://www.seimc.org/controldecalidadseimc/index.php?mn_MP=71&mn_MS=0&mn_MN=1&expandable=0&mn_msgweb=&palabras=LISTERIOSIS [Último acceso 3 de julio del 2019]
22. Cooper, B., (2018), Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales, *Vertientes, revista especializada en ciencias de la salud*, 16,19-22.
23. Corrales, L., Antolinez, D., Bohórquez, J., Corredor, A., (2015), Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta, *NOVA*,13(23), 55-81.
24. Díaz, G., (2003), Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis que para obtener el grado de doctor en ciencias bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, pág. 37.
25. Domínguez, L., Badiola, J., Cepeda, A., Más, A., Rodríguez, E., Zurera, G., Téllez, S., (2010), Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) en relación con los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria, *Revista del comité científico*, 12, 37-61.
26. Ellner, R. 2000, *Preguntas y respuestas sobre la microbiología de la leche y los productos lácteos*. Madrid: Ediciones Díaz Santos, págs.33-34.

27. Esteban, C., (2004), Caracterización molecular de la represión por catabolito e ingeniería metabólica en *Lactobacillus casei*, Tesis de doctorado, Universidad de Valencia.
28. Esteban, M., De las Rivas, B., Muñoz, R., (2014), Esterasas de *Lactobacillus plantarum* utilizables en la elaboración de alimentos. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 456, 30-37.
29. Fábrega, A. y Vila, J., (2013), *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation, *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308-341.
30. Falcão. M., Da Silva. R., Fernández. M., Bezerra, P., Pedrosa, P., Couto, J., Figueiredo, A., Holanda, M. (2018). Brazilian kefir fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidants peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 446-455.
31. Fisher scientific, (2018). *BD Medios de cultivo deshidratados Difco™: caldo MRS lactobacilos*. [En línea] (Actualizado el 28 de noviembre 2018).
- Disponible en:
- <https://www.fishersci.es/shop/products/bd-difco-dehydrated-culture-media-lactobacilli-mrs-broth-3/11713553> [Último acceso el 29 de noviembre de 2018]
32. Gamboa, F., (2014), Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: Experiencias de investigación. *Universidad odontológica*, 33, 65-73.
33. González, B., Gómez, M., Jiménez, Z., (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista salud pública y nutrición*, 4(2),1-8.
34. González, J., Moreno, V., Del Monte, A.,(2010), Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista colombiana de biotecnología*, 12, 124-140.

35. González, L., Jiménez, J., Cruz, A., Rodríguez, G., Gómez, L., García, M., (2011), Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 179-188.
36. González, T. y Rojas, R., (2005), Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5), 388-390.
37. Guarner, F., Sanders, S., Eliakim, R., Fedorak, E., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., Kim, N., De Paula, J., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., Le Mair, A. (2017). Probióticos y prebióticos. *World Gastroenterology Organisation*, 4.
38. Heredia, P., Hernández, A., González, A., Vallejo, B., (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.
39. Kivanc, M. y Yapici, E., (2015). Kefir as a probiotic dairy beverage: determination lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Engineering*, 55-60.
40. Koch, K. y Rigalli, A., (2015). Efecto protector de la leche fermentada con kéfir sobre la desmineralización in vitro del esmalte dental. *Actualizaciones de osteología*, 11, 78-79.
41. Leite, A., Miguel, M., Peixoto, R., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V., Mayo, B., Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *American Dairy Science Association*, 98 (6), 3622–3632.
42. Londero, A., (2012), Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir, Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de ciencias exactas, departamento de ciencias biológicas, págs. 13-14.

43. Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186-205.
44. López, O., (2015), Búsqueda de enzimas lipolíticas termófilas y expresión en microorganismos mesófilos, Tesis de doctorado, Facultad de ciencias, departamento de biología celular y molecular, págs.17-21.
45. MacFaddin, J. (2003), *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3. Buenos Aires: Médica Panamericana, págs.55-60
46. Marquina. D. y Santos. A., (2010), Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie microbiología*,3(5) 39-59.
47. Maldonado, C., (2015), Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. Tesis para obtener título de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM, pág. 38.
48. Méndez, L., (2017), Estudio microbiológico y térmico mediante microcalorimetría diferencial de barrido de la fermentación de la masa de Nixtamal para pozol. Tesis para obtener título de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM, pág. 31.
49. microBIO, (2016), *Rebecca C. Lancefield, la mujer que puso orden en los estreptococos*. [En Línea] (Actualizado al 3 de enero 2016).

Disponible en:

<https://microbioun.blogspot.com/2016/01/rebecca-c-lancefield-la-mujer-que-puso.html> [Último acceso 10 de julio 2019].

50. Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., Ramírez, L., (2014), Caracterización química y microbiológica de kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *Avances en ciencias y en ingenierías*. 6, 60-66.

51. Mondragón, P., Escalante, P., Osuna, C., Ibarra, V., Morlett, J., Aguilar, G., Rodríguez, R., (2013). Bacteriocinas: características y aplicaciones en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70.
52. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F., Mayorga, L., (2009), Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73,63-72.
53. Mora, N., García, A., (2007), Susceptibilidad de bacterias ácido-lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis para obtener el título de Químico de alimentos. Instituto de ciencias básica e ingeniería. Centro de investigaciones químicas, UAEH, pág. 4.
54. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2006), *Microbiología Médica*. Barcelona: Elsevier, págs. 27-30
55. Navarro, I. y Periago, M., (2012), Enzimas lipolíticas bacterianas: Propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *Anales de veterinaria Murcia*, 28,45-65.
56. Negroni, M., (2009), *Microbiología estomatológica* ,2, Buenos Aires: Panamericana, págs. 253-260.
57. Núñez, D. y García, L., (2010), Bioquímica de la caries dental. *Revista habanera de ciencias médicas*, 9(2), 156-166.
58. Ojeda, J., Oviedo, E., Salas, A., (2013), *Streptococcus mutans* y caries dental. *Revista CES odontología*, 26,44-56.
59. Organización Mundial de la Salud, (2019), *Escherichia coli*. [En línea] (Actualizado al 2019). Disponible en: https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/ [Último acceso 4 de julio de 2019].
60. Ortega, L., (2010), *Enterococos*: actualización. *Revista habanera de ciencias médicas*, 9(4), 507-511.
61. Padilla, C., Núñez, M., Padilla, A., Lobos, O., (2012). Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde

- diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Revista chilena de infectología*, 29, 55-61.
62. Palao. M. (2009), Técnicas para el análisis microbiológico de los alimentos, *Comité editorial de la Facultad de Química*, pág. 192.
63. Pardi, G., Guilarte, C., Cardozo, E., Briseño, E., (2008), Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico, *Acta odontológica venezolana*, 47, 1-11.
64. Pares. R. y Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Sevilla: Reverte, págs. 74-85.
65. Parra, R., (2010). Bacterias ácido-lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 94-105.
66. Pedroso, T., Agramonte, A., Montano, I., Guedes, D., García, I. (2015). Impacto del uso de probióticos sobre indicadores selectos del estado nutricional del enfermo hospitalizado. *Revista cubana de alimentación y nutrición* .25(2), 261-263.
67. Pretell, A. y Urraca, E. (2012). Características fisicoquímicas y aceptabilidad general de un kéfir de leche de vaca (*Bos Taurus*) y de cabra (*Capra hircus*). *Pueblo continente*, 23,145-156.
68. Porte, L., Brown, S., Dobouch, J., Egaña, A., Andrighetti, D., (2009). *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. *Revista chilena de infectología*, 26(6),571.
69. Quiroz, R., Folch, J., (2011), Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología aplicada*, 28,194-204.
70. Ramírez, C., Vélez, J., (2016), Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información tecnológica*,27(6),115-118.
71. Ramos, A., Monteoliva, M., Nader, F. (2012). *Probióticos y salud*. Madrid: Ediciones Díaz Santos, págs.512-515

72. Rangel, J., Sparling, P., Crowe, C., Griffin, P., Swerdlow, D., (2005), Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks , United States , 1982-2002, *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 603-609.
73. Rodríguez, G., (2002), Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
74. Rodríguez, G., (2007), Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas a partir de la leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca). Trabajo de grado para optar al título de Zootecnista. Universidad de la Salle, Facultad de Zootecnia, pág. 35.
75. Romero, E., *et al.*, (2011), *Escherichia coli* de tipo patógeno en alimentos, *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 5(2), 28-39.
76. Rosa, D., Dias, M., Grześkowiak, Ł., & Reis, S., Conceição, L., Peluzio, M. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews*, 30, 1-15.
77. Salazar, A., Blanca, C., Montoya, C., Olga, I., (2003), Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana, *Viate*, 10(2), 20-26.
78. Sánchez, J., Correa, M., Castañeda, L., (2016), *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos, *Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230-232.
79. Silva, K., Rodrigues, S., Filho, L., Lima, A., (2009), Antimicrobial Activity of broth fermented with kefir grains. *Human Press*. 152(2), 316-325.
80. Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., Mercado, M., (2005), Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente, *Revista MVZ Córdoba*, 10, 511-543.
81. Torres, M., De las Rivas, B., Muñoz, R., (2014), Esterasas de *Lactobacillus plantarum* utilizables en la elaboración de alimentos. *Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 456, 30-37.

82. Villadóniga, C. (2010), Productos bioactivos obtenidos por proteólisis (nutraceúticos y alimentos funcionales). **En:** C. Villadóniga, S. Vairo, S. Morcelle, M. Errasti, M. Bruno, A. Barros, A. Cantera. eds. *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales*. Argentina, 273-297.
83. Zendejas, G., Avalos, H., Soto, M., (2014), Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación, *Revista Biomédica*, 24(3), 129-131.
84. Zúñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S., (1992), An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of food microbiology*, 18, 38.

ANEXOS

Anexo A. Composición de medios de cultivo.

Tabla A.1. Formulación para preparar un litro de capa y sobrecapa para prueba de difusión en Agar.

CAPA		SOBRECAPA	
Reactivo /medio	(g)	Reactivo/ medio	(g)
Fosfato de sodio monobásico (J.T.BAKER)	4.3	Fosfato de sodio monobásico (J.T.BAKER)	4
Fosfato de sodio dibásico (J.T.BAKER)	10	Fosfato de sodio dibásico (J.T.BAKER)	10
Agar bacteriológico (Difco™)	17	Agar bacteriológico (Difco™)	8
Caldo BHI (OXOID®)	37	BHA (OXOID®)	15
Agua	1000	Agua	1000

Tabla A.2. Composición del medio MRS-almidón.

Componente	g/L
Peptona pancreática de caseína BD	10
Extracto de carne OXOID	10
Extracto de levadura BD	5
Almidón de maíz SIGMA -Aldrich	20
Citrato diamoniacoal J.T. Baker	2.17
Acetato de sodio J.T. Baker	5
Sulfato de magnesio heptahidratado SIGMA	0.207
Sulfato de manganeso SIGMA	0.056
Fosfato dipotásico J.T. Baker	2.62
Agar Bacto™	15

(Díaz, 2003).

Tabla A.3. Composición medio MRS-xilano.

Componente	g/L
Peptona pancreática de caseína BD	10
Extracto de carne OXOID ®	10
Extracto de levadura BD	5
Xilano (abedul o maíz)	10
Citrato diamoniaco J.T. Baker	2.17
Acetato de sodio J.T. Baker	5
Sulfato de magnesio heptahidratado SIGMA	0.207
Sulfato de manganeso SIGMA	0.056
Fosfato dipotásico J.T. Baker	2.62
Agar Bacto ™	15

Tabla A.4. Composición del medio leche descremada.

Componente	g/L
Caldo nutritivo deshidratado BD	8
Leche descremada en polvo Svelty ®	25
Agar Bacto ™	15

Tabla A.5. Composición del medio agar calcio caseinato

Componente	g/L
Peptona de carne BD Bioxon	5
Cloruro de sodio J.T. Baker	5
Extracto de carne OXOID®	3
Caseína de leche de bovino Sigma	2.5
Hidróxido de calcio J.T. Baker	0.15
Cloruro de calcio J.T. Baker	0.05
Agar Bacto™	13.5

Tabla A.6. Composición del medio caseína

Componente	g/L
Caldo nutritivo deshidratado BD	8
Caseína de leche de bovino Sigma	25
Agar Bacto™	15

Tabla A.7. Composición del medio tributirina sin carbohidratos

Componente	g/L
Peptona Bacto™	5
Extracto de levadura BD	3
Tributirina Sigma Aldrich	10
Agar Bacto™	15

Tabla A.8. Composición del medio tributirina con glucosa

Componente	g/L
Tryptona Bacto ™	10
Extracto de levadura BD	5
Cloruro de sodio J.T. Baker	10
Tributirina Sigma Aldrich	10
Glucosa 20%	5 mL
Agar Bacto ™	15

Tabla A.9. Composición del medio tributirina con emulsificante

Componente	g/L
Tryptona Bacto ™	10
Extracto de levadura BD	5
Cloruro de sodio J.T. Baker	10
Tributirina Sigma Aldrich	10
Glucosa 20%	5 mL
Tween® 80 Sigma Aldrich	0.5 mL
Agar Bacto ™	15

Tabla A.10 Composición del medio M5.

Componente	g/L
Tryptona Bacto ™	10
Extracto de levadura Bacto ™	5
D (-) Fructosa Sigma ®	2.5
Fosfato de sodio monobásico J.T. Baker	2.5
Tween® 80 Sigma Aldrich	1 mL
L-cisteína HCl Sigma	0.5
Sulfato de magnesio heptahidratado Sigma	0.2
Sulfato de manganeso Sigma ®	0.05
Ácido D-pantoténico Sigma ®	0.01
Verde de bromocresol Técnica Química S.A.	20 mL *
Agar Bacto ™	20

Tabla A.11 Composición del caldo MRS Difco™

Componente	g/L
Peptona de proteasa No.3	10.0
Extracto de res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0

Tabla A.12. Composición del medio BHI OXOID®

Formulación	g/L
Sólidos de infusión cerebral	12.5
Sólidos de infusión de corazón de res	5.0
Peptona proteosa	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de disodio	2.5
pH 7.4 ±0.2 a 25 °C	

Tabla A.13. Composición del medio BHA OXOID ®

Formulación	g/L
Sólidos de infusión cerebral	12.5
Sólidos de infusión de corazón de res	5.0
Peptona proteosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato de disodio	2.5
Agar	10.0
pH 7.4 ± 0.2 a 25 °C	

Anexo B. Preparación de medios de cultivo y reactivos.

Preparación de capa y sobrecapa

Capa. Pesar todos los componentes de la formulación y disolver en un litro de agua destilada, mezclar bien, esterilizar 121 °C durante 15 minutos.

Sobrecapa. Pesar componentes de la formulación, disolver en un litro de agua destilada, calentar en parrilla hasta completa disolución y a punto de ebullición, una vez que se alcanzó este punto transferir con una pipeta 10 mL de sobrecapa en tubos de ensaye con rosca, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Caldo MRS

Disolver 55 gramos del medio en un litro de agua destilada, mezclar bien, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo BHI

Disolver 37 gramos del medio en un litro de agua destilada, mezclar bien, esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Medio BHA

Suspender 47 gramos en un litro de agua destilada, llevar a ebullición hasta su completa disolución, esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Medio M5

Disolver los componentes del medio en agitación y calor constante. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Medio MRS-almidón

Previo al mezclado total de los componentes del medio, solubilizar el almidón con la mayor proporción de agua correspondiente al volumen total a adicionar, posteriormente adicionar el resto de los componentes, mezclar bien, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Medio MRS-xilano

Solubilizar el xilano previamente antes de disolver el resto de los componentes, una vez solubilizado por completo, adicionar el resto del volumen total de agua destilada, mezclar bien, esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Solución stock de verde de bromocresol

Pesar 0.012 g de NaOH y disolver en 30 mL de agua destilada para obtener una solución de 0.01 N de NaOH, después pesar 0.1 g de verde de bromocresol y mezclar hasta disolver.

NaCl 1M

Pesar 5.85 g de NaCl para preparar 100 mL de solución de cloruro de sodio 1 M.

Glucosa 20%

Pesar 1 g de glucosa y disolver en 5 mL de agua destilada.

Agar tributirina

Mezclar los componentes de la formulación en agua destilada en agitación y calor constante, menos la tributirina, el tween 80 y el agar, hasta su completa disolución. Posteriormente adicionar la tributirina, una vez que los glóbulos de la tributirina redujeron su tamaño, adicionar el tween 80 hasta formar una emulsión, una vez ocurrido, adicionar el agar hasta disolver por completo. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Caldo rojo de fenol con lactosa y observación de producción de gas.

Rehidratar 20 g de medio de cultivo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar con agitación frecuente hasta el punto de ebullición y completa disolución. Distribuir 10 mL en tubos de ensaye con tapa de rosca, colocar campanas Durham y esterilizar en autoclave entre 116-118 °C (12 lbs de presión) durante 15 minutos.

Anexo C. Condiciones específicas de trabajo para ciertas pruebas.

Tabla C.1. Condiciones de trabajo para bacterias patógenas y de cavidad oral utilizadas para prueba de difusión en Agar.

Microorganismo a inhibir	Inóculo (µL)	Tiempo de incubación al reactivar (h)	Dilución para realizar la prueba	Inóculo en sobrecapa (µL)	Tiempo de incubación de la prueba (h)
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ 103	40	24	-	40	18-24
<i>Listeria innocua</i> , cepa 2, Lab. 324	40	24	10 ⁻²	40	18-24
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 10449	40	24	10 ⁻²	40	18-24
<i>Streptococcus oralis</i> Fac. Medicina	40	24	-	40	18-24
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40	24	10 ⁻³	40	18-24
<i>Escherichia coli</i> 108412 Lab. 324.	40	24	10 ⁻³	40	18-24
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	40	24	10 ⁻³	40	18-24
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	40	24	-	40	18-24
<i>Streptococcus faecalis</i> 29212, Fac. Medicina	40	24	10 ⁻³	40	18-24

Tabla modificada de Maldonado (2015).

Tabla C.2. Diluciones empleadas para conteo en placa.

Tiempo de monitoreo (h)	Diluciones empleadas					
	<i>Streptococcus oralis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Sobrenadante	Control	Sobrenadante	Control	Sobrenadante	Control
0	10 ⁻¹ -10 ⁻³	Directo -10 ⁻⁴	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻² -10 ⁻⁴
12	Directo-10 ⁻²	10 ⁻¹ - 10 ⁻³	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻² -10 ⁻⁴
24	Directo -10 ⁻¹	Directo-10 ⁻¹	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻³ -10 ⁻⁶	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻² -10 ⁻⁴
48	Directo	Directo-10 ⁻²	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻² - 10 ⁻⁵	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻³ -10 ⁻⁵

Anexo D. Curva patrón para método de Bradford.

Se realizó una curva patrón con BSA para poder cuantificar la proteína presente en los sobrenadantes obtenidos de las cepas BAL. La prueba para realizar dicha curva se realizó por duplicado, obteniendo los resultados que se observan en la **Tabla D.1**.

Tabla D.1. Valores obtenidos en la curva patrón con BSA

[BSA] mg/mL	Promedio de absorbancias	Desviación estándar
0	0	0.000
0.125	0.159	0.049
0.25	0.3515	0.066
0.5	0.5955	0.093
1	0.896	0.222

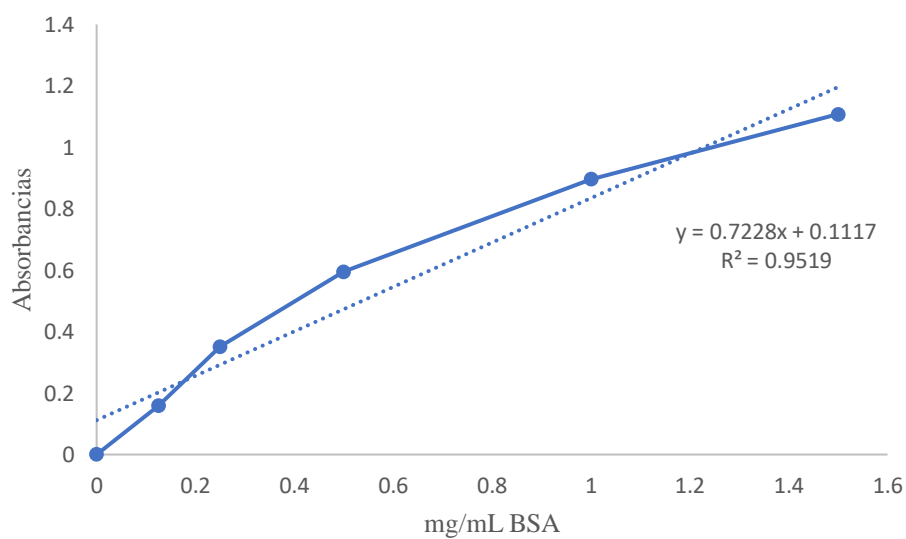


Figura D.1. Curva patrón, método Bradford.

Anexo E. Tratamiento de datos obtenidos en pruebas realizadas experimentalmente. Desviación estándar y coeficientes de variación de pruebas de cinéticas de crecimiento, difusión en agar y sobrevivencia.

Tabla E.1. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E1-C

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0.07	0.016	22.22	6.07	0.000	0.00	0.07	0.010	13.38	6.08	0.007	0.12
1	0.08	0.016	20.20	6.07	0.007	0.12	0.10	0.016	16.68	6.06	0.000	0.00
2	0.10	0.001	1.44	6.06	0.000	0.00	0.10	0.013	12.24	6.04	0.000	0.00
3	0.12	0.003	2.42	6.05	0.007	0.12	0.13	0.016	11.97	6.03	0.007	0.12
4	0.15	0.016	10.73	6.03	0.007	0.12	0.17	0.004	2.05	5.99	0.007	0.12
5	0.18	0.011	6.43	6.00	0.007	0.12	0.23	0.012	5.28	5.95	0.000	0.00
6	0.23	0.003	1.24	5.98	0.006	0.09	0.28	0.007	2.56	5.92	0.007	0.12
7	0.27	0.001	0.26	5.94	0.007	0.12	0.37	0.000	0.00	5.89	0.000	0.00
8	0.33	0.004	1.30	5.92	0.007	0.12	0.43	0.009	2.15	5.86	0.007	0.12
9	0.41	0.018	4.52	5.93	0.007	0.12	0.50	0.008	1.71	5.78	0.000	0.00
10	0.48	0.013	2.81	5.88	0.000	0.00	0.58	0.011	1.95	5.70	0.000	0.00
11	0.51	0.010	1.94	5.82	0.007	0.12	0.62	0.008	1.38	5.61	0.007	0.13
12	0.55	0.011	2.05	5.65	0.156	2.75	0.70	0.007	1.01	5.51	0.007	0.13
24	2.13	0.069	3.25	4.44	0.021	0.48	1.88	0.016	1.23	4.51	0.000	0.00
36	3.55	0.778	21.91	4.15	0.02	0.51	2.20	0.02	0.96	4.2	0.01	0.34

Tabla E.2. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E1-D.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0.076	0.015	19.67	6.32	0.000	0.00	0.072	0.009	12.86	6.31	0.007	0.11
1	0.087	0.013	14.63	6.31	0.000	0.00	0.088	0.005	5.66	6.32	0.007	0.11
2	0.096	0.008	8.84	6.30	0.000	0.00	0.109	0.015	13.69	6.29	0.021	0.34
3	0.122	0.009	7.57	6.28	0.000	0.00	0.144	0.007	4.91	6.26	0.014	0.23
4	0.149	0.008	5.24	6.27	0.000	0.00	0.181	0.006	3.53	6.24	0.007	0.11
5	0.182	0.013	7.40	6.24	0.000	0.00	0.236	0.009	3.90	6.19	0.014	0.23
6	0.191	0.007	3.70	6.21	0.000	0.00	0.270	0.001	0.26	6.15	0.014	0.23
7	0.250	0.016	6.52	6.19	0.007	0.11	0.342	0.013	3.93	6.14	0.007	0.12
8	0.291	0.006	1.94	6.16	0.014	0.23	0.422	0.016	3.69	6.09	0.014	0.23
9	0.363	0.005	1.37	6.17	0.007	0.11	0.464	0.001	0.15	6.02	0.021	0.35
10	0.400	0.011	2.65	6.12	0.000	0.00	0.497	0.010	1.99	5.92	0.021	0.36
11	0.436	0.001	0.32	6.06	0.021	0.35	0.550	0.010	1.80	5.83	0.035	0.61
12	0.546	0.004	0.65	5.88	0.035	0.60	0.625	0.007	1.13	5.72	0.021	0.37
24	2.198	0.088	4.02	4.85	0.007	0.15	1.800	0.021	1.18	4.94	0.021	0.43
36	3.700	0.223	6.02	4.22	0.000	0.00	2.093	0.010	0.47	4.56	0.007	0.16

Tabla E.3. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E2-A.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
0	0.022	0.008	36.18	6.14	0.007	0.12	0.032	0.011	33.67	6.11	0.007	0.12
1	0.029	0.004	14.63	6.12	0.014	0.23	0.046	0.003	6.15	6.09	0.000	0.00
2	0.039	0.001	1.84	6.08	0.014	0.23	0.051	0.004	8.32	6.06	0.000	0.00
3	0.044	0.006	14.63	6.05	0.007	0.12	0.063	0.011	17.96	6.03	0.000	0.00
4	0.057	0.007	12.41	6.09	0.021	0.35	0.088	0.012	13.74	6.04	0.000	0.00
5	0.074	0.007	9.56	6.09	0.014	0.23	0.121	0.011	8.80	6.04	0.007	0.12
6	0.102	0.015	14.63	6.37	0.007	0.11	0.156	0.011	7.25	6.33	0.000	0.00
7	0.124	0.008	6.84	6.34	0.014	0.22	0.209	0.012	5.77	6.32	0.007	0.11
8	0.155	0.008	5.03	6.32	0.007	0.11	0.265	0.011	4.01	6.26	0.014	0.23
9	0.200	0.009	4.61	6.33	0.007	0.11	0.331	0.013	3.85	6.22	0.007	0.11
10	0.246	0.008	3.45	6.31	0.007	0.11	0.404	0.011	2.80	6.15	0.007	0.12
11	0.289	0.006	2.21	5.96	0.064	1.07	0.443	0.009	2.08	5.64	0.071	1.25
12	0.333	0.009	2.76	5.95	0.049	0.83	0.487	0.016	3.19	5.62	0.078	1.39
24	1.395	0.030	2.13	4.86	0.042	0.87	1.382	0.017	1.23	5.05	0.035	0.70
36	2.847	0.157	5.51	4.51	0.021	0.47	1.830	0.017	0.93	4.91	0.007	0.14

Tabla E.4. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E2-B.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0.022	0.010	45.00	6.33	0.014	0.22	0.009	0.006	62.85	6.33	0.000	0.00
1	0.038	0.000	0.00	6.34	0.021	0.33	0.015	0.006	37.71	6.33	0.000	0.00
2	0.048	0.004	7.44	6.33	0.014	0.22	0.028	0.005	18.00	6.34	0.000	0.00
3	0.049	0.022	45.20	6.32	0.000	0.00	0.049	0.001	2.89	6.31	0.007	0.11
4	0.054	0.001	2.62	6.29	0.007	0.11	0.072	0.023	31.43	6.27	0.000	0.00
5	0.058	0.004	6.15	6.28	0.000	0.00	0.099	0.001	0.72	6.27	0.007	0.11
6	0.076	0.014	18.61	6.27	0.007	0.11	0.102	0.006	5.55	6.23	0.000	0.00
7	0.096	0.012	12.59	6.26	0.000	0.00	0.150	0.008	5.66	6.21	0.014	0.23
8	0.133	0.013	9.57	6.24	0.000	0.00	0.180	0.025	14.14	6.17	0.014	0.23
9	0.141	0.005	3.52	6.21	0.007	0.11	0.239	0.028	11.83	6.14	0.000	0.00
10	0.193	0.015	7.71	6.18	0.000	0.00	0.313	0.023	7.47	6.12	0.007	0.12
11	0.213	0.001	0.66	6.14	0.000	0.00	0.370	0.028	7.64	6.07	0.028	0.47
12	0.406	0.151	37.14	6.14	0.007	0.12	0.427	0.030	7.13	6.03	0.035	0.59
24	1.204	0.029	2.41	5.13	0.021	0.41	1.514	0.016	1.03	4.44	0.000	0.00

Tabla E.5. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E2-C.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
0	0.046	0.023	49.19	6.37	0.007	0.11	0.028	0.017	60.61	6.37	0.000	0.00
1	0.045	0.018	40.86	6.32	0.000	0.00	0.039	0.012	31.22	6.33	0.014	0.22
2	0.050	0.023	47.14	6.33	0.014	0.22	0.046	0.014	30.74	6.35	0.007	0.11
3	0.063	0.014	22.45	6.31	0.007	0.11	0.072	0.028	38.57	6.29	0.014	0.22
4	0.082	0.003	3.45	6.27	0.014	0.23	0.093	0.026	28.28	6.26	0.007	0.11
5	0.096	0.004	3.70	6.24	0.000	0.00	0.101	0.015	14.78	6.23	0.021	0.34
6	0.105	0.004	3.38	6.23	0.021	0.34	0.134	0.027	20.05	6.17	0.021	0.34
7	0.131	0.008	6.48	6.20	0.007	0.11	0.204	0.029	14.25	6.14	0.049	0.81
8	0.177	0.025	14.02	6.15	0.007	0.12	0.261	0.008	3.25	6.10	0.064	1.04
9	0.212	0.037	17.34	6.11	0.035	0.58	0.336	0.064	18.94	5.97	0.042	0.71
10	0.261	0.016	6.24	6.06	0.028	0.47	0.403	0.047	11.77	5.90	0.049	0.84
11	0.316	0.061	19.24	6.00	0.035	0.59	0.502	0.055	10.99	5.80	0.049	0.85
12	0.394	0.016	3.95	5.93	0.042	0.72	0.612	0.107	17.46	5.66	0.113	2.00
24	1.320	0.095	7.23	4.90	0.113	2.31	1.715	0.216	12.62	4.59	0.290	6.32

Tabla E.6. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E2-O.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0.041	0.006	13.80	6.07	0.007	0.12	0.044	0.006	14.63	6.07	0.000	0.00
1	0.058	0.009	15.99	6.06	0.007	0.12	0.049	0.008	16.04	6.05	0.000	0.00
2	0.063	0.008	12.45	6.03	0.007	0.12	0.077	0.011	13.86	6.01	0.000	0.00
3	0.080	0.007	8.84	6.00	0.007	0.12	0.102	0.010	9.71	5.98	0.000	0.00
4	0.105	0.003	2.69	6.00	0.000	0.00	0.168	0.049	29.13	5.99	0.007	0.12
5	0.134	0.004	3.17	6.00	0.007	0.12	0.211	0.047	22.12	5.98	0.000	0.00
6	0.170	0.004	2.50	6.29	0.021	0.34	0.269	0.064	23.66	6.27	0.000	0.00
7	0.202	0.001	0.35	6.26	0.021	0.34	0.312	0.047	15.21	6.19	0.014	0.23
8	0.242	0.003	1.17	6.20	0.042	0.68	0.356	0.043	12.13	6.12	0.007	0.12
9	0.301	0.004	1.41	6.13	0.007	0.12	0.395	0.052	13.25	6.04	0.000	0.00
10	0.347	0.007	2.04	6.05	0.028	0.47	0.434	0.046	10.60	5.97	0.021	0.36
11	0.361	0.005	1.37	6.02	0.028	0.47	0.467	0.033	7.12	5.67	0.375	6.62
12	0.397	0.002	0.54	5.42	0.000	0.00	0.480	0.791	165.02	5.36	0.007	0.13
24	1.660	0.011	0.68	4.55	0.028	0.62	1.554	0.048	3.09	4.74	0.028	0.60
36	3.228	0.178	5.52	4.29	0.007	0.17	2.412	0.017	0.70	4.53	0.049	1.09

Tabla E.7. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E3-F.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
0	0.063	0.014	22.45	6.08	0.028	0.47	0.071	0.004	5.98	6.07	0.007	0.12
1	0.082	0.005	6.07	6.08	0.000	0.00	0.086	0.007	8.22	6.05	0.000	0.00
2	0.096	0.006	5.89	6.06	0.007	0.12	0.101	0.008	8.40	6.04	0.007	0.12
3	0.117	0.014	12.09	6.04	0.007	0.12	0.132	0.007	5.36	6.00	0.000	0.00
4	0.147	0.013	8.66	6.01	0.000	0.00	0.178	0.001	0.40	5.96	0.000	0.00
5	0.176	0.007	4.02	5.99	0.021	0.35	0.223	0.013	6.04	5.93	0.007	0.12
6	0.209	0.006	2.71	5.97	0.014	0.24	0.292	0.028	9.46	5.90	0.000	0.00
7	0.276	0.019	6.93	5.94	0.014	0.24	0.380	0.017	4.47	5.89	0.007	0.12
8	0.331	0.001	0.43	5.93	0.007	0.12	0.451	0.023	5.18	5.83	0.014	0.24
9	0.416	0.037	9.02	5.91	0.014	0.24	0.512	0.031	6.08	5.77	0.028	0.49
10	0.466	0.013	2.73	5.88	0.007	0.12	0.590	0.011	1.92	5.66	0.028	0.50
11	0.513	0.011	2.07	5.79	0.021	0.37	0.665	0.052	7.77	5.55	0.035	0.64
12	0.558	0.007	1.27	5.76	0.021	0.37	0.709	0.023	3.19	5.50	0.035	0.64
24	1.654	0.014	0.86	4.44	0.007	0.16	1.015	0.494	48.63	4.50	0.021	0.47
36	2.350	0.000	0.00	4.17	0.092	2.21	2.000	0.071	3.54	4.28	0.035	0.83

Tabla E.8. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E3-M.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0	0.102	0.001	1.39	6.30	0.014	0.22	0.088	0.001	0.81	6.30	0.021	0.34
1	0.112	0.006	5.05	6.29	0.000	0.00	0.119	0.013	11.34	6.27	0.000	0.00
2	0.133	0.006	4.80	6.26	0.014	0.23	0.143	0.004	2.97	6.24	0.014	0.23
3	0.159	0.012	7.58	6.24	0.000	0.00	0.180	0.008	4.71	6.21	0.007	0.11
4	0.189	0.005	2.63	6.22	0.007	0.11	0.230	0.005	2.16	6.16	0.000	0.00
5	0.227	0.005	2.19	6.17	0.000	0.00	0.310	0.008	2.51	6.08	0.014	0.23
6	0.250	0.007	2.83	6.12	0.000	0.00	0.366	0.006	1.55	6.00	0.000	0.00
7	0.329	0.021	6.24	6.04	0.000	0.00	0.467	0.004	0.91	5.91	0.007	0.12
8	0.396	0.004	0.89	5.97	0.000	0.00	0.578	0.003	0.49	5.81	0.000	0.00
9	0.475	0.003	0.60	5.91	0.007	0.12	0.698	0.005	0.71	5.65	0.000	0.00
10	0.495	0.030	6.00	5.81	0.000	0.00	0.761	0.004	0.56	5.47	0.000	0.00
11	0.645	0.011	1.65	5.73	0.007	0.12	0.954	0.023	2.37	5.34	0.007	0.13
12	0.718	0.003	0.39	5.60	0.007	0.13	1.065	0.007	0.66	5.20	0.007	0.14
24	2.618	0.081	3.11	4.63	0.000	0.00	2.313	0.067	2.90	4.69	0.007	0.15
36	3.952	0.104	2.63	4.09	0.007	0.17	2.695	0.079	2.94	4.39	0.007	0.16

Tabla E.9. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E3-N.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
0	0.030	0.021	70.71	6.31	0.000	0.00	0.033	0.009	28.28	6.31	0.014	0.22
1	0.023	0.004	15.71	6.30	0.000	0.00	0.044	0.000	0.00	6.29	0.007	0.11
2	0.050	0.005	10.00	6.29	0.000	0.00	0.039	0.011	27.55	6.26	0.000	0.00
3	0.060	0.004	7.07	6.28	0.007	0.11	0.053	0.006	12.12	6.26	0.007	0.11
4	0.063	0.019	30.55	6.27	0.007	0.11	0.087	0.010	11.38	6.24	0.007	0.11
5	0.083	0.006	7.71	6.25	0.000	0.00	0.112	0.016	13.89	6.22	0.000	0.00
6	0.095	0.006	6.73	6.26	0.007	0.11	0.164	0.002	1.30	6.19	0.007	0.11
7	0.128	0.011	8.32	6.22	0.007	0.11	0.211	0.008	3.70	6.17	0.007	0.11
8	0.159	0.006	4.02	6.21	0.007	0.11	0.262	0.009	3.52	6.14	0.000	0.00
9	0.206	0.008	3.78	6.19	0.007	0.11	0.323	0.015	4.60	6.14	0.000	0.00
10	0.260	0.011	4.35	6.17	0.000	0.00	0.376	0.011	3.01	6.10	0.007	0.12
11	0.322	0.002	0.66	6.18	0.007	0.11	0.420	0.008	2.02	6.04	0.000	0.00
12	0.366	0.001	0.19	6.13	0.007	0.12	0.475	0.011	2.38	5.97	0.007	0.12
24	1.324	0.065	4.91	5.24	0.014	0.27	1.251	0.030	2.37	5.15	0.071	1.37
36	2.593	0.053	2.05	4.67	0.021	0.45	1.725	0.014	0.82	4.95	0.007	0.14

Tabla E.10. Datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa E3-P.

Tiempo de monitoreo (h)	Temperatura 30 °C						Temperatura 37 °C					
	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	DO promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	pH promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
0	0.026	0.006	24.96	6.30	0.007	0.11	0.042	0.008	18.74	6.29	0.000	0.00
1	0.049	0.004	8.66	6.30	0.007	0.11	0.033	0.002	6.53	6.28	0.000	0.00
2	0.058	0.004	7.31	6.28	0.000	0.00	0.040	0.011	26.81	6.26	0.007	0.11
3	0.070	0.004	5.09	6.26	0.007	0.11	0.067	0.000	0.00	6.25	0.007	0.11
4	0.081	0.008	9.66	6.27	0.007	0.11	0.103	0.013	12.36	6.23	0.007	0.11
5	0.103	0.014	13.73	6.23	0.000	0.00	0.147	0.016	10.58	6.19	0.000	0.00
6	0.129	0.011	8.77	6.22	0.014	0.23	0.208	0.006	3.07	6.17	0.007	0.11
7	0.180	0.002	1.18	6.20	0.014	0.23	0.256	0.023	9.13	6.14	0.000	0.00
8	0.230	0.013	5.53	6.17	0.014	0.23	0.319	0.007	2.22	6.12	0.007	0.12
9	0.271	0.001	0.26	6.15	0.014	0.23	0.420	0.007	1.68	6.07	0.007	0.12
10	0.335	0.033	9.94	6.16	0.000	0.00	0.480	0.009	1.92	6.01	0.007	0.12
11	0.401	0.001	0.35	6.10	0.028	0.46	0.557	0.037	6.60	5.90	0.007	0.12
12	0.455	0.033	7.31	6.05	0.014	0.23	0.622	0.008	1.25	5.82	0.014	0.24
24	1.552	0.014	0.91	5.10	0.007	0.14	1.509	0.018	1.22	5.06	0.014	0.28
36	2.940	0.156	5.29	4.57	0.007	0.15	2.328	0.145	6.23	4.74	0.000	0.00