



Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*

BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ*, ZACARÍAS JIMÉNEZ SALAS*, NORMA LAURA HEREDIA ROJAS**, LICET VILLARREAL TREVIÑO**, GRACIELA GARCÍA DÍAZ***, MARIVEL GÓMEZ TREVIÑO**



Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas son capaces de alterar la microflora del hospedero y producir efectos benéficos para la salud, además de los de nutrición.¹ También han demostrado tener efectos positivos en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa, en la disminución del colesterol sanguíneo, en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas por virus y bacterias entero-patógenos, así como en la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos, en enfermedades de base inmunológica como síndrome de intestino irritable y enfermedad inflamatoria; asimismo, se han visto efectos positivos de actividad antitumoral.^{2,4}

En la última década se ha desarrollado una gran variedad de nuevos productos con probióticos, la oferta incluye productos lácteos: leches fermentadas, yogurt, helados, quesos,^{5,6} además de un gran número de suplementos en diferentes presentaciones.^{7,8}

Para que un alimento se considere un eficiente vehículo de probióticos es necesario que el cultivo agregado durante el proceso de elaboración permanezca viable a altas concentraciones durante el tiempo de vida de anaquel. Algunas organizaciones internacionales proponen una concentración mínima de 10^7 microorganismos vivos por gramo o mililitro de producto para que se generen los efectos benéficos en la salud de los consumidores.^{5,9} De acuerdo a lo propuesto por Sanders y Veld,¹⁰ es necesaria la ingestión de una dosis mínima diaria de 10^9 a 10^{10} para que puedan ser observados los efectos en la salud.

□ El presente artículo está basado en la investigación "Efectos de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* en quesos frescos", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2006 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2006.

* Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica, FaSPyN-UANL.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas-UANL.

*** Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas-UANL.

Los productos probióticos serán confiables cuando las etiquetas contengan información clara y precisa acerca de la presencia de microorganismos vivos, los géneros, las especies y las cepas que contienen y la cantidad de cada microorganismo.¹¹

Recientemente se ha encontrado que especies del mismo género tienen diferentes efectos benéficos debido a la diversidad genética entre las especies y hasta entre cepas de la misma especie.¹² Asimismo, la cantidad de microorganismos que se requiere ingerir para conseguir el efecto específico no es igual para cada cepa, por lo que se considera que las propiedades benéficas son cepadependientes.¹³

En algunos productos se ha descrito que los microorganismos declarados en la etiqueta no son los que se encuentran, existiendo la posibilidad de que no se genere el efecto positivo esperado; además, se han encontrado microorganismos potenciales patógenos, lo que representa un riesgo para el consumidor.^{7,11}

Se ha demostrado que las bacterias acidolácticas y probióticas en algunos alimentos provocan la inhibición de microorganismos, con esto contribuyen a controlar organismos que son potencialmente patógenos como algunas especies de *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Listeria* y pueden dañar la salud de quien los consume,¹⁴ o bien afectar la flora responsable del deterioro de los alimentos y, en consecuencia, prolongar la vida de anaquel del producto.¹⁵ Este efecto bioconservador se debe, principalmente, a la producción de bacteriocinas y otros compuestos inhibidores del crecimiento microbiano como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno y diacetilo.¹⁵

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia, ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que podrían reemplazar a los conservadores químicos.

Los objetivos del presente estudio fueron analizar productos con probióticos existentes en el mercado, evaluar la acción antagónica *in vitro* de los mismos contra microorganismos patógenos, elaborar queso fresco con probióticos y determinar el efecto inhibitorio de estos microorganismos sobre *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*.

Material y métodos

Productos con probióticos comercialmente disponibles

Se trabajó con tres tipos de productos con diferentes características: tres bebidas lácteas, tres leches en polvo para lactantes y cuatro suplementos. Todos los productos procedían de la zona metropolitana de Monterrey, N.L., México.

Identificación de probióticos

Se aislaron cepas cultivables de los diferentes productos y se sembraron en agar MRS hasta obtener cultivos puros.

La identificación del género *Bifidobacterium* se realizó a través de la prueba de fructosa 6 fosfato fosfocetolasa.¹⁶

La identificación de las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se realizó mediante el sistema API (bioMérieux I' Etoile France); se utilizó medio CHL y galerías API 50 CH para *Lactobacillus* y para *Bifidobacterium* se utilizó la galería API 20 A; los resultados se analizaron con las pruebas bioquímicas reportadas en el Manual de Bergey.¹⁶

Contenido y sobrevivencia de microorganismos probióticos viables

La cantidad de probióticos viables mediante la cuenta en placa en Agar MRS a 35°C, por 72 horas, en jarras de anaerobiosis con Gas Pak Plus System (BBL), con diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷.¹¹

La sobrevivencia de los microorganismos probióticos se analizó mediante la cuenta en placa en agar MRS a intervalos seleccionados. Para las bebidas lácteas se tomó una muestra mantenida a 4°C cada tercer día y se analizó su cuenta de probióticos viables, descrita anteriormente.¹⁷ Las leches en polvo para lactantes con probióticos se analizaron al tomar una muestra cada diez días por cinco meses, el producto se mantuvo a temperatura ambiente con el recipiente cerrado. Los suplementos se analizaron cada semana durante ocho semanas y posteriormente cada mes hasta los cinco meses a temperaturas indicadas por los fabricantes.

Calidad microbiológica

La calidad de los productos con probióticos se determinó por medio de análisis microbiológicos de los diferentes microorganismos y su contrastación con la normatividad vigente en nuestro país: NOM 185-SSA1 2002 para las bebidas lácteas, NOM 131-SSA1 1995 para leches en polvo para lactantes, NOM 121-SSA1-1994 para quesos frescos, madurados y procesados.¹⁸

Para el análisis microbiológico de los productos con probióticos se siguieron las técnicas oficiales aprobadas y publicadas como NOM. Se realizó la cuenta de bacterias mesófilas aerobias, la cuenta en placa de coliformes totales, la determinación de coliformes totales por número más probable (NMP), la determinación de coliformes fecales (NMP), la cuenta de *Staphylococcus aureus*, la determinación de *Listeria monocytogenes*, el aislamiento de *Salmonella* y la cuenta de hongos y levaduras.¹⁸

Actividad antimicrobiana

Se evaluaron 32 cepas de probióticos diferentes que se aislaron, al medir los halos de inhibición que generaron sus sobrenadantes en agar Luria (Difco Laboratorios, Detroit, Mich.), que contenían los microorganismos patógenos de prueba (*Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*, *S. enteritidis* var. *Paratyphi*, *S. enteritidis* var. *Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *E. coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*); se utilizaron cloranfenicol como control positivo y caldo MRS estéril como control negativo.¹⁹ Se calcularon las unidades de actividad (UA) expresadas como el recíproco de la mayor dilución donde se presenta una zona de inhibición.²⁰

Elaboración de queso con probióticos

En tres ocasiones diferentes se elaboró un queso fresco tipo panela de forma convencional, a partir de leche entera pasteurizada, con la adición de renina microbiana para la coagulación de la caseína. Después de la separación del suero y el salado, la masa cuajada se distribuyó en dos porciones; a una se le adicionó una mezcla de los probióticos

(*Lactobacillus casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium lactis* proporcionados por la compañía Lactilab de México) en proporciones iguales de 1×10^{10} UFC/mL de cada uno cultivados en caldo MRS y cosechados por centrifugación. La porción restante fue utilizada para elaborar el queso control sin probióticos, posteriormente los quesos fueron moldeados y prensados hasta obtener la consistencia adecuada.

Evaluación del queso con probióticos

Al queso con probióticos y el queso control se les determinó la vida de anaquel en tres experimentos independientes; los productos se almacenaron a 4°C y cada cuatro días se evaluaron los atributos de apariencia física, consistencia, aroma y sabor.

La evaluación sensorial de queso con probióticos se realizó a través de dos pruebas: una analítica de diferenciación triangular²¹ y otra afectiva hedonista.²² Los sujetos que participaron en la evaluación sensorial fueron estudiantes voluntarios de la carrera de nutrición de ambos sexos, entre 18 y 45 años.

Inhibición de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* en quesos frescos

El efecto inhibitorio de los probióticos sobre el desarrollo de *Salmonella* se evaluó comparando la presencia-ausencia del patógeno en los quesos con y sin probióticos a diferentes concentraciones de inóculo y días del experimento. La presencia de *Salmonella* se determinó mediante la amplificación por PCR del gen *inv A*.

Se seleccionaron los iniciadores 139 y 141, que amplifican un fragmento de 287 pb del gen *inv A* reportado por Rahn *et al.*²³ Se comprobó la especificidad del par de iniciadores al utilizar los nueve diferentes microorganismos patógenos descritos en la metodología, y 35 cepas de bacterias lácticas y probióticas, previamente caracterizados por su perfil bioquímico (datos no mostrados).

Los quesos fueron inoculados con concentraciones de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* de 100, 10, 1 y 0.1 UFC/g de queso, los cuales se colocaron en recipientes estériles y se almacenaron en

refrigeración. Una muestra se analizó inmediatamente, otras a las 24, 48, 72 y 96 horas, donde se tomó una porción y se colocó en un preenriquecimiento con agua peptonada por 16 horas.

La detección de *S. enteritidis* var. *Typhimurium* se realizó en muestras de DNA extraído por el método de DNAzol® (para cepas de referencia) y por CTAB (Bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio) para muestras de queso, mediante el procedimiento descrito por Edwards K. *et al.*²⁴

La mezcla de reacción y las condiciones del termociclador utilizadas para la amplificación del segmento gen *inv A* son reportadas por Mata.²⁵ Se determinó el límite de detección en esta técnica al inocular *S. enteritidis* var. *Typhimurium* en 25 g de queso en concentraciones de 10^5 hasta 10^2 UFC/g de queso (0.2 UFC en 25 g).

Análisis estadístico

Para determinar la diferencia del contenido de probióticos, del contenido de microorganismos coliformes, levaduras y hongos entre marcas estudiadas se realizó un análisis de varianza y la comparación múltiple de medias de Tukey. Con la misma prueba se analizó el grado de inhibición de patógenos por microorganismos probióticos.

Los parámetros de vida de anaquel de los quesos con probióticos se analizaron por medio de la prueba de Mann Whitney.

La comparación de la presencia de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney a diferentes días y concentraciones de inóculo del patógeno. Se analizó la frecuencia de la presencia/inhibición de *Salmonella* por concentración y días con respecto a cada tratamiento (con y sin probióticos) por Ji cuadrada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v10.0 para Windows, con un nivel de significancia de 0.05 o menos.

Resultados

Evaluación de productos con probióticos

En la tabla I se muestran los resultados del análisis

Tabla I. Información de las etiquetas de productos con probióticos y hallazgos microbiológicos.

Producto	Origen	Información de etiqueta		Microorganismos detectados	
		Microorganismo declarado	UFC/g declarado	Nombre	UFC/g encontrado
1	Bebida láctea	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	1×10^8	<i>L. paracasei</i>	9×10^7
2	Bebida láctea	Producto lácteo fermentado	No declarado	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. casei</i>	5.5×10^8
3	Bebida láctea	<i>Lactobacillus</i>	No declarado	<i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i>	1.8×10^6
4	Leche en polvo	<i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	No declarado	<i>B. bifidum</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>B. adolescentis</i> o <i>B. animalis</i>	1.1×10^7
5	Leche en polvo	<i>Bifidobacterium lactis</i>	No declarado	<i>B. adolescentis</i> o <i>B. animalis</i>	1.8×10^6
6	Leche en polvo	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	No declarado	<i>B. longum</i> <i>B. adolescentis</i> o <i>B. animalis</i> <i>acidophilus</i> <i>L. plantarum</i>	2.3×10^6
7	Suplementos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	4.3×10^7 > 4.3×10^7	<i>L. acidophilus</i> <i>B. longum</i> <i>B. adolescentis</i> o <i>B. animalis</i>	1.5×10^6
8	Suplementos	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	> 1×10^5 *	<i>L. acidophilus</i>	1.6×10^3
9	Suplementos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>B. bifidum</i>	> 1.5×10^9 *	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i>	1.9×10^5
10	Suplementos	Bacilos lácticos acidófilos y búlgaros	No declarado	<i>L. acidophilus</i>	3.5×10^3

microbiológico realizado a los productos con probióticos, así como su comparación con lo declarado en las etiquetas. En tres de los productos coincide lo encontrado con lo declarado en el género y la especie, y en dos más sólo en el género. En cuatro productos se encontraron más especies de los mismos géneros de las declaradas y en una muestra de suplementos no se logró aislar el microorganismo especificado del género *Bifidobacterium*. Los microorganismos encontrados pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (seis especies) y *Bifidobacterium* (tres especies).

De los cuatro productos que especifican el contenido de microorganismos sólo en la bebida se encontró un número ligeramente inferior de lo que declaran. En los suplementos el contenido es menor a lo declarado de 1 hasta 4 ciclos logarítmicos.

En relación al contenido de probióticos en los diferentes productos, se encontró que en bebidas lácteas la cantidad de probióticos en dos de las muestras es adecuada para asegurar el efecto positivo por el consumo de microorganismos, el producto 3 no alcanza las 10^7 UFC/g recomendado.

De las leches en polvo para lactantes que se analizaron, sólo una aporta más de 10^7 UFC/g, sin embargo, un producto es fórmula de inicio (para bebés de 0 a 6 meses), y dos son de continuación

(para mayor de seis meses) por lo que la cantidad de producto a utilizar por día es diferente de acuerdo al consumo lactante; sólo el producto 4 supera los 10^9 UFC por día.

En los suplementos se encontraron valores bajos de probióticos y con variaciones muy grandes, ninguna muestra alcanza los valores recomendados.

Respecto a la sobrevivencia de los probióticos en las bebidas almacenadas a temperatura de refrigeración, se encontró que en dos de las marcas no se redujo el contenido de microorganismos a lo largo de un mes, tiempo mayor al de su fecha de caducidad, la otra marca presentó una disminución moderada con respecto a la concentración inicial (1.5 unidades logarítmicas).

La sobrevivencia de los probióticos en las leches en polvo analizadas no mostró disminución del contenido de probióticos de más de un ciclo logarítmico durante los primeros tres meses de almacenamiento, tiempo mayor al que usualmente el producto se mantiene en uso.

La sobrevivencia de los probióticos en suplementos fue menor y muy variable, mientras una muestra presenta disminución de tres unidades logarítmicas en el primer mes del estudio, las demás exhiben reducciones inferiores a una unidad logarítmica aun estando todos los productos dentro del tiempo de caducidad.

No hay diferencia en la calidad microbiológica de las bebidas y leches en polvo entre las marcas analizadas, aunque algunas muestras de leches presentaron valores de coliformes y levaduras superiores a los establecidos en las normas, lo que sugiere deficiencia en el control de calidad interno en la elaboración y manejo de los productos. No se encontraron microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en los productos analizados.

Actividad antimicrobiana

De las 32 cepas analizadas, 25 mostraron actividad antimicrobiana, expresada como halos de inhibición, contra alguno de los patógenos de prueba (figura 1). De las doce cepas aisladas de bebidas, once mostraron actividad; de las nueve aisladas de leche en polvo, sólo siete; y de las cuatro de suplemen-

tos, ninguna produjo inhibición. De las cepas con actividad antimicrobiana 19 correspondieron al género *Lactobacillus*, y seis a *Bifidobacterium*.

En la figura 2 se muestra el grado de inhibición de los patógenos hacia los compuestos difusibles de los diferentes probióticos. Se encontró que los patógenos más sensibles fueron: *Salmonella enteritidis* var. *Paratyphi*, *S. enteritidis* var. *Typhimurium*, *S. enteritidis* var. *Enteritidis* y *Yersinia enterocolitica*, con diferencia significativa entre ellos y los demás patógenos.

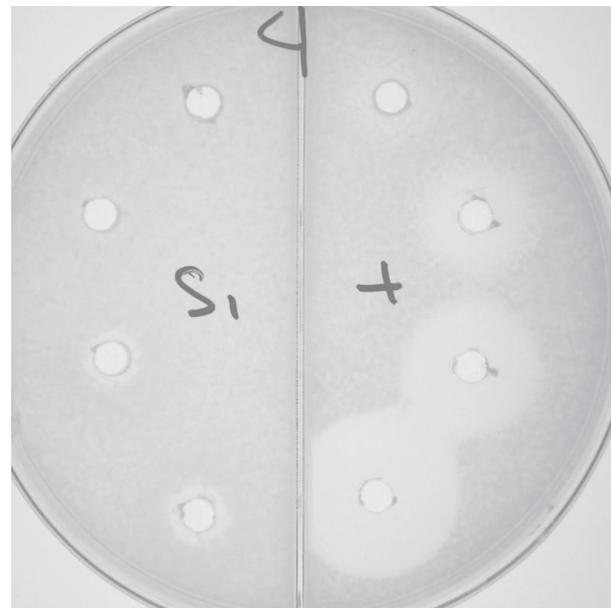


Fig. 1. Actividad antimicrobiana de probióticos. Inhibición de *Bacillus cereus* como patógeno de prueba con una cepa aislada de bebidas y el control (+).

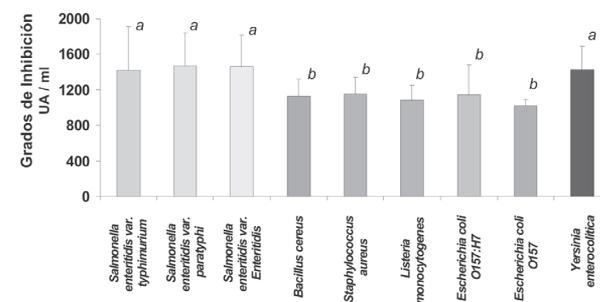


Fig. 2. Sensibilidad de patógenos a compuestos difusibles de probióticos. Los valores de UA en la gráfica corresponden a la media de 25 probióticos diferentes con tres ensayos independientes ($n = 75$).^{a,b} Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente ($F = 28.15$, $p < 0.01$).

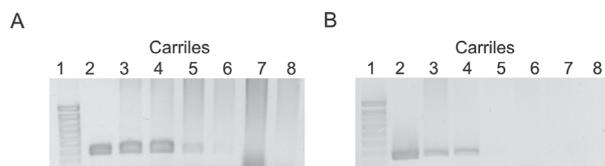


Fig. 3. Electroforesis de productos de PCR de gen *inv A* para detección de *Salmonella*. A) Queso sin probióticos, B) queso con probióticos. Carril 1 marcador de pb, 2 control positivo, carriles 3 al 6 queso inoculado con *Salmonella* con 10^2 a 10^1 UFC/g, carriles 7 queso sin *Salmonella* y carril 8 control negativo.

Elaboración de quesos con probióticos

El contenido promedio de probióticos en el producto terminado fue de 1.6×10^8 UFC/g. Los microorganismos probióticos no sólo sobrevivieron en el queso elaborado, sino que aumentaron un ciclo logarítmico durante las tres semanas siguientes hasta llegar a una concentración de 1.4×10^9 UFC/g.

La calidad microbiológica de los quesos elaborados con y sin probiótico fue similar, no presentaron *Salmonella* spp ni *Listeria monocytogenes* en las repeticiones realizadas. No hubo diferencia significativa entre el queso con probióticos y su control en los parámetros de coliformes totales, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus*.

Respecto a vida de anaquel, los quesos con probióticos no presentaron signos de alteración ni cambios en sus propiedades organolépticas en los 21 días de almacenamiento, mientras en los quesos sin probióticos hubo evidentes signos de alteración alrededor del día 17 en aroma y sabor, y para el día 20 se observaron coloraciones anormales en la superficie del queso.

En la prueba de diferenciación triangular, los panelistas no lograron discriminar entre el queso con y sin probióticos en los atributos de sabor, color y textura ($p > 0.05$).

Las pruebas hedónicas se realizaron para los mismos atributos y permitieron conocer el nivel de agrado del queso con probióticos. Los panelistas expresaron agrado para las características de color, textura y sabor el 81%, 89% y 84%, respectivamente.

Inhibición de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* en quesos frescos

Al analizar la frecuencia de detección de *Salmonella*

Tabla II. Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos a diferentes concentraciones de inóculo.

Día	Frecuencia de detección de <i>Salmonella</i> (%)							
	Sin probióticos				Con probióticos			
	Concentración de inóculo UFC/g							
	10^2	10^1	1	10^{-1}	10^2	10^1	1	10^{-1}
0	100	100	66	66	80	40	60	60
1	66	100	33	66	60	80	40	20
2	100	100	100	66	60	20	20	0
3	100	100	66	33	60	60	20	20
4	100	50	0	0	75	25	0	0

en queso con y sin probióticos a las diferentes concentraciones de inóculo (tabla II), se observa que en el queso sin probióticos se detectó el patógeno en porcentajes mayores en todas las concentraciones de inóculo, esto fue estadísticamente significativo en el día dos del tratamiento y tres concentraciones de inóculo de *Salmonella* (de 1×10^1 , 1 y 1×10^{-1} UFC/g).

Discusión

Al analizar la información de las etiquetas se encontró que solamente 60% de los productos especifican el género y la especie de los microorganismos contenidos, 20% sólo especifica el género y 20% restante presenta información muy imprecisa, lo que sugiere un etiquetado deficiente. Esta situación no es un problema exclusivo de México, ya que existen reportes de otros países donde también se presenta esta falta de precisión. En un estudio realizado en Inglaterra se encontró que en más de la mitad de los productos probióticos analizados no se especifica qué microorganismos contienen.¹¹

Por otra parte, en algunos productos no se observó correspondencia entre el microorganismo declarado en la etiqueta y el encontrado. Esta falta de concordancia fue reportada antes por diversos autores. En Bélgica se reportaron mal etiquetados 47% de los suplementos y 40% de los productos lácteos analizados.⁷ Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de establecer reglamentaciones consensuadas para evitar riesgos en la población. Sudáfrica es uno de los países que ya cuentan con reglamentaciones en este sentido.⁸

Al analizar el contenido de probióticos en los productos, se encontró que 66% de las bebidas,

33% de las leches en polvo y ninguno de los suplementos cumplen con lo propuesto por las organizaciones internacionales de un mínimo de 10^7 UFC por gramo o mililitro de producto, iguales resultados se obtienen al analizar los consumos por día de acuerdo a las recomendaciones o dosificaciones de los fabricantes. Resultados similares en bebidas lácteas y suplementos fueron publicados previamente donde se reportan valores bajos de probióticos.^{7,26} La baja cuenta de probióticos en los suplementos o preparaciones farmacéuticas posiblemente se deba al estrés o daño que los tratamientos tecnológicos pueden producir en los microorganismos.²⁷

Para evaluar la efectividad probiótica de las cepas aisladas de los productos analizados, se determinó la actividad antimicrobiana de los microorganismos aislados de estos productos. Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que los probióticos analizados producen sustancias que difunden al medio de cultivo y que ejercen actividad inhibitoria, tal como se ha descrito previamente por Stiles.¹⁵ En este trabajo los patógenos más sensible fueron *Salmonella* y *Yersinia*. El efecto antimicrobiano de los probióticos sobre *Salmonella* ya fue analizado previamente por Hudahult *et al.*,²⁸ quienes describen que este proceso puede deberse a la producción de bacteriocinas o al ácido láctico.

En este trabajo se demostró que el queso fresco es un vehículo acarreador efectivo de probióticos, ya que la mezcla de microorganismos probióticos seleccionada sobrevive sin alterar las propiedades organolépticas. El uso de alimentos con varias especies de probióticos ha mostrado ser más eficiente que el de los productos con una sola especie, dado que se potencian los efectos benéficos a la salud, y además se logran ventajas tecnológicas y organolépticas.²⁹ Otros investigadores elaboraron quesos con contenidos similares, por ejemplo, Vinderola *et al.*⁶ elaboraron un queso fresco con una mezcla de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un contenido de 10^8 UFC/g y, Kasimoglu *et al.*³⁰ elaboraron un queso blanco con *L. acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a 10^7 UFC/g.

En el queso fresco elaborado los microorganismos adicionados no disminuyen en cantidad durante el tiempo de vida de anaquel del producto.

Se ha reportado que la variación en la sobrevivencia depende de la especie o cepa que se adicione al queso.³¹ Datos presentados por Boylston *et al.*³² indican que algunos quesos contienen compuestos, como la para-k-caseína, que se producen cuando la renina es utilizada como agente coagulante y que actúan como promotores del crecimiento de probióticos. Posiblemente, el incremento de un ciclo logarítmico del contenido de probióticos observado en el presente trabajo se deba al efecto estimulante de la para-k-caseína formada.

Es deseable, en los alimentos con probióticos, que los microorganismos adicionados no alteren las propiedades organolépticas del producto para lograr su aceptación por los consumidores. En este trabajo, los probióticos adicionados al queso no generaron cambios en los atributos de sabor, aroma, textura y color comparados con el queso control, lo que sugiere que la adición de la mezcla de probióticos no tiene efectos adversos en las características sensoriales del producto.

Los productos lácteos pueden ser un vehículo de ingestión de *Salmonella*, siendo reportada su presencia y sobrevivencia en los diferentes tipos de quesos.³³ El riesgo de contaminación por *Salmonella* en quesos frescos es mayor por sus características de baja acidez y alto contenido de humedad;³⁴ además, se potencia el riesgo de infección, debido a que se consumen sin procesos de cocción.

Para evaluar la efectividad de los probióticos adicionados a los quesos sobre *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* se analizó el efecto de inhibición del crecimiento del patógeno inoculado artificialmente a través de pruebas *in vitro* a diferentes concentraciones, y se comparó con un queso que no contenía probióticos.

Los resultados muestran que en los quesos sin probióticos el patógeno se detectó en un mayor porcentaje, en contraste con el queso con probióticos. Esta tendencia se observó con las diferentes concentraciones de patógeno. Estos resultados son similares a los descritos por Saad *et al.*³⁵ al estudiar la inhibición de *E. coli* O157:H7 en queso minas (queso fresco típico de Brasil) con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno, lo que

demuestra que la adición de probióticos puede ser efectiva para disminuir los riesgos en quesos frescos, que por sus características son muy vulnerables de contaminarse.

El análisis estadístico del grado de inhibición de la *Salmonella typhimurium* inoculada en el queso con probióticos comparada con la del queso control reveló un efecto positivo de los probióticos en la inhibición del patógeno que depende del tiempo, esta inhibición fue significativa en el día dos en las concentraciones de 1×10^1 , 1 y 1×10^{-1} UFC/g, lo cual sugiere un efecto de temporalidad, que ya fue descrito previamente.¹⁵

Estos resultados también muestran un efecto dependiente de la concentración de inóculo, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de los probióticos ocurre solamente a bajas concentraciones del patógeno. Estos resultados son semejantes a los descritos por Salvatierra *et al.*³⁶ al analizar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus* en yogurt.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que en el queso fresco tipo panela se alcanzó una concentración de 1.6×10^8 UFC/g, la cual aumentó hasta de 1.4×10^9 UFC/g durante las tres semanas siguientes. Las evaluaciones sensoriales indican que la adición de los probióticos no altera las propiedades organolépticas del alimento conservando la buena aceptabilidad del mismo, además de alargar la vida de anaquel, por lo que se considera que es un vehículo adecuado para transporte de microorganismos probióticos, pues permite la sobrevivencia de probióticos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores.

Al analizar la presencia de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* en quesos inoculados con diferentes concentraciones del patógeno, se observó que en los quesos con la adición de probióticos se advierte la presencia del patógeno sólo con mayores concentraciones de inóculo; en contraste, se observó una mayor presencia de *Salmonella* en los quesos sin probióticos, este efecto de inhibición de *Salmonella* fue significativo en el día dos en las concentraciones de 10, 1 y 0.1 UFC/g, indicando que

los probióticos ejercieron una inhibición transitoria en el desarrollo de *Salmonella* en las diferentes concentraciones inoculadas.

Estos resultados muestran un panorama alentador para el uso de los probióticos como estrategia para contribuir al logro de la inocuidad alimentaria, además de los efectos en la salud que ya se han demostrado.

Resumen

Los probióticos son complementos o alimentos que contienen microorganismos viables que afectan benéficamente al huésped a través de diferentes efectos en el tracto intestinal. Una estrategia para que estos efectos lleguen a mayor cantidad de personas es producir más alimentos que los contengan. En este trabajo se demostró que el queso fresco es un vehículo efectivo de probióticos, ya que sobreviven sin alterar las propiedades organolépticas. Además, se demostró que los probióticos ejercieron una inhibición transitoria en el desarrollo de *Salmonella*, que podría repercutir en prolongar la vida de anaquel del producto y en un menor riesgo de enfermedades gastrointestinales.

Palabras clave: Probióticos, Quesos, Etiquetado, Actividad antimicorbiana.

Abstract

Probiotics are complements or foods with viable microorganisms that have a beneficial effect in the host through different effects in the intestinal duct. A strategy for these effects to benefit most people is to produce more food containing them. This work showed that fresh cheese is an adequate vehicle of probiotics because it permits the survival of the probiotics without changing the organoleptic properties. Also, it was shown that probiotics have a transitory inhibition in the development of *Salmonella*, which may help lengthen the product's shelf life and decrease the risk of gastrointestinal diseases.

Keywords: Probiotics, Cheese, Labeling, Antagonistic action.

Referencias

1. Schrezenmeir, J. & De Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nut*, 73 (supplement), pp.361S-354S.
2. Marteau, P. Vrese, M. Cellier, C.J. & Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics *Am J Clin Nut*, 73 (supplement), pp.430-436.
3. Reid, G. Jass, J. Sebulsky, M.T. & McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotic in clinical practice. *Clin Microb Rev*, 16 (4), pp.658-672.
4. Adolfsson, O. Meydani, S.N. & Russel, R.M. (2004) Yogurt and gut function. *Am J Clin Nut*, 80 (supplement), pp.245-256.
5. Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J*, 11 (1-2), pp.1-17.
6. Vinderola, C.G. Prosello, W. Ghiberto, D. & Reinheimer, J.A. (2000) Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J Dairy Sci*, 83 (9), pp.1905-1911.
7. Temmerman, R. Pot, B. Huys, & Swings, J. (2003) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol*, 81 (1), pp.1-10.
8. Theunissen, J. Britz, T.J. Torriani, R.C. & Witthuhun, R.C. (2005). Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int J Food Microbiol*, 98, pp.11-21.
9. Stanton, C. Gardiner, G. Meehan, H. Collins, K. Fitzgerald, G. Lynch, P. & Ross, R. (2001) Market potential for probiotics. *Am J Clin Nut*, 73 (supplement), pp.476S-483S.
10. Sanders, M.E. & Huis in't Veld, J.H.J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoeck*, 76, pp.293-315.
11. Hamilton-Miller, J.M.T. Shah, S. & Winkler, J.T. (1999) Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*, 2 (2), pp.223-229.
12. Salminen, S. Bouley, C. Boutron-Ruault, M.C. Cummings, J.H. Franck, A. & Gibson, G.R. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *J Nut*, 80 (supplement), pp.147-171
13. Vanderhoof, J.A. & Young, R. (2002) Probiotics in pediatrics. *Pediatrics*, 109 (5), pp.956-958.
14. Senne, M.M. & Gilliland S.E. (2003) Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. *J Food Protect*, 66 (3), pp.418-425.
15. Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhock*, 70, pp.331-345.
16. Scardovi, V. (1986) Irregular Nonsporing Gram-positive rods. In *Manual of systematic bacteriology*. [Sneath, P.H. Mair, N.S. Sharpe, M.E. Holt, J.G. Bergey's.] Section 15. Vol. 2, USA. Williams & Williams.
17. Torres, M.R. (2002) Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, México, D. F. Editorial Gráfica Nueva, Editora de las Universidades Iberoamericanas.
18. NOM-SSA (Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud). 2005. México. On line. Disponible en la página: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nomssa.html>
19. Tagg, J.R. Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol*, 40, pp.722-756.
20. Barefoot, S. Chen, Y. Hughes, T. Bodine, A. Shearer, M. & Hughes, M. (1994) Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (10), pp.3522-3528.
21. Pedrero, D.L. & Pangbron, R.M. (1989) Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos. Editorial Alambra Mexicana S. A., México.
22. Sancho, J. Bota, E. & De Castro, J.J. (2002). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Alfaomega Grupo Editor S. A. México.

23. Rahn, K. De Grandis, S.A. Clarke, R.C. McEwen, S.A. Galán, J.E. Ginocchio, C. Curtis III, R. & Gyles, C.L. (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method of detection of *Salmonella*. Moll. Cell. Probes. 6:271-279.
24. Edwards K, Johnstone C, & Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research 19 (6):1349.
25. Mata, V.L. (2003) Implementación de la PCR para la detección de bacterias patógenas de importancia en carne de res, aves y derivados. Tesis de maestro en ciencias, con especialidad en microbiología, Universidad Autónoma de Nuevo León.
26. Fasoli, S. Marzotto, M. Rizzotti, L. Rossi, F. Dellaglio, F. & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. Int J Food Microbiol, 82, pp.59-70.
27. Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. Trends Food Sci Tech, 9, pp.295-306.
28. Hudault, S. Liévin, V. Bernet-Camard, M. & Servin, A.L. (1997) Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. Appl. Environ. Microbiol, 63 (2), pp.513-518.
29. Timmerman, H.M. Koning, C.J. Mulder, L. Rombouts, F.M. & Beynen A.C. (2004) Monostain, multistain and multispecies probiotics a comparison of functionality and efficacy. Int J Food Microbiol, 96 (3), pp.219-233.
30. Kasimoglu, A. Göncüoğlu, M & Akgün, S. (2004) Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. Int Dairy J, 14 (12), pp.1067-1073.
31. Brearty, S. Roos, R.P. Fitzgerald, G.F. Collins, J.K. Wallace, J.M. & Stanton, C. (2001) Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. Int Dairy J, 11 (8), pp.599-610.
32. Boylston, T.D. Vinderola, C.G. Ghoddusi, H.B. & Reinheimer, J.A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. Int Dairy J, 14 (5), pp.375-387.
33. El-Gazzar, F.E. & Marth, E.H. (1992). *Salmonellae*, *Salmonellosis*, and dairy foods: a review. J Dairy Sci, 75, pp.2327-2343.
34. Peraza, C. (2001). Los quesos artesanales en México. Lácteos y cárnicos mexicanos. 15, pp.48-54.
35. Saad, S.M.I. Vanzin, C. Oliveira, M.N. & Franco, B.D.G.M. (2001) Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. J Food Protect, 64 (8), pp.1151-1155.
36. Salvatierra, M. Molina, A. Gamboa, M. & Arias, M.L. (2004) Evaluación del efecto de cultivos de probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. Arch Latinoam Nut, 54 (3), pp.298-302.

Recibido: 7 de septiembre de 2006

Aceptado: 15 de septiembre de 2006