

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas
de la chicha de molle, Ayacucho-2009**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN MENCIÓN A LA
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por:

Bach. RODRÍGUEZ CARRASCO, Jhanina

AYACUCHO, PERÚ

2011

*A mis queridos padres: Edisario y
Julia, a mis hermanos, que me
brindan amor, confianza y
aliento a lo largo de mi
vida.*

AGRADECIMIENTO

Con especial gratitud y reconocimiento a mi Alma Mater, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de mi formación y realización personal.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología con especial mención a su plana docente, por sus valiosas enseñanzas y experiencias durante mi permanencia en los claustros universitarios.

Al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, por los materiales y equipos facilitados para la realización del presente trabajo de investigación.

A mi asesora Mg. Paula García Godos Alcázar por su valioso aporte en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Título : Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle, Ayacucho-2009

Autor : Bach. Jhanina Rodríguez Carrasco

Asesor : Mg. Paula García Godos Alcázar

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de identificar y evaluar la capacidad probiótica *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, elaboradas artesanalmente de las provincias de Huanta y Huamanga, se aislaron 55 cepas BAL e identificando a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus maltaromicus* y *Leuconostoc mesenteroides* con base a la coloración Gram, producción de gas, gluconato y fermentación de azúcares, la capacidad probiótica *in vitro* se realizó por pruebas de antagonismo entre BAL y cuatro microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*), mostrándose que 14 de las 55 cepas BAL producen sustancias inhibitorias de amplio espectro, así mismo se evaluó la capacidad de tolerancia a condiciones gastrointestinales de cepas BAL, realizando ensayos a diferentes pH_s, diferentes concentraciones de sales biliares y jugo gástrico artificial, resultando 25 cepas BAL con capacidad de tolerancia gastrointestinal y se seleccionaron 4 cepas con mayor diámetro de halos de inhibición y cepas tolerantes a condiciones gastrointestinales siendo las cepas: BL-1 (*Lactobacillus plantarum*), BL-26 (*Lactobacillus maltaromicus*), BL-27 (*Lactobacillus plantarum*) y BL-53 (*Lactobacillus maltaromicus*), a las cuales se evaluaron la capacidad probiótica *in vivo* en 30 ratas para luego realizar recuento de BAL en el intestino a los 21 días, encontrándose en el grupo de estudio con BAL a 60×10^{19} UFC/mL, mientras en el tratamiento con BAL más yacón a 25×10^{24} UFC/mL y los tratamientos de yacón y control a 50×10^{14} UFC/mL de BAL obteniéndose una de ganancia de peso en ratas en el grupo de estudio de BAL más yacón de 46 g, mientras con bacterias lácticas se tuvo 24 g y 16 g en el grupo control y extracto de yacón. En consecuencia esta investigación demuestra que la toma diaria de bebidas fermentadas tradicionales favorece el incremento de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal.

Palabras claves: Bacterias lácticas, capacidad probiótica.

ÍNDICE

Resumen	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Bacterias lácticas	5
2.2.1. Morfología	6
2.2.1.1. Pared celular	6
2.2.1.2. Características culturales	6
2.2.2. Nutrición y condiciones de crecimiento	7
2.2.3. Condiciones ecológicas	7
2.2.4. Metabolismo	8
2.3. Capacidad probiótica	8
2.3.1. Probiótico	10
2.3.2. Características de microorganismos probióticos	11
2.3.3. Efectos probióticos en algunas enfermedades	12
2.3.3.1. Trastornos relacionados con el aparato digestivo	12
2.3.3.2. Anomalías en el sistema inmunológico	12
2.3.3.3. Infecciones del aparato urinario femenino	13
2.3.3.4. Utilización de probióticos en personas sanas	14
2.3.4. Propiedades bioterapéuticas	15
2.3.5. Efectos protectores	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
IV. RESULTADOS	23
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	38
IX. ANEXOS	42

I. INTRODUCCIÓN

Por la reciente preocupación mundial sobre asuntos de salud y la alimentación, los alimentos funcionales tienen un papel importante en la industria alimentaria, por tanto se necesita explorar procesos nuevos y poner énfasis en este tipo de industrias (Anon, 2006).

Los alimentos fermentados como la chicha de molle contienen microorganismos como las bacterias lácticas las cuales son consideradas como probióticos. Una bebida probiótica es definida como un suplemento microbiano, que tiene efectos benéficos mejorando el balance microbiano intestinal. El intestino cuenta con un sin número de microorganismos presentes en la porción final del tracto gastrointestinal humano (Anon, 2006).

En el intestino delgado la microbiota varía según el segmento intestinal, por si misma no produce alteraciones, constituyendo un verdadero cultivo autorregulable. Así mismo la variación de estos microorganismos benéficos de nuestra microbiota intestinal pueden ocasionar infecciones persistentes en el tracto intestinal, que contribuye a la pérdida de una de las características funcionales más importantes para el control de la proliferación de la microbiota intestinal; así en la chicha de molle se encuentran microorganismos beneficiosos para el hombre como las bacterias lácticas que modifican

favorablemente el balance de la microbiota intestinal, favorecen una buena digestión, inhiben el crecimiento de ciertas bacterias patógenas, potencian la función inmunológica y aumentan la resistencia a las infecciones (Galán, 2006).

Las personas con colonias intestinales de estas bacterias benéficas, están mejor equipadas para combatir el crecimiento de las bacterias que causan enfermedades. Los lactobacilos y los bacilos bífidos mantienen un balance sano de la microbiota intestinal al producir compuestos orgánicos, como el ácido láctico, agua oxigenada y ácido acético, que aumentan la acidez intestinal e inhiben el desarrollo de muchos microorganismos nocivos debido a la producción de sustancias llamadas bacteriocinas, que funcionan como antibióticos naturales, matando a los microorganismos no deseados (Roberfroid, 2000).

Es fundamental la relación existente entre la microbiota intestinal y el estado de salud de las personas (Rodríguez et al., 2009; Molina et al., 2009; Taranto et al., 2000). Una mala alimentación produce una elevada presencia de sustancias perjudiciales, que al ser utilizadas por bacterias nocivas presentes en el intestino, afectan la salud del receptor (Diplock et al., 2001).

En el intestino, tanto los microorganismos beneficiosos como aquellos potencialmente patógenos pueden competir por los mismos nutrientes para crecer y reproducirse. Por lo tanto, cuanto mayor es la población de las bacterias beneficiosas en el intestino, mayor será la competición con los microorganismos patógenos (Diplock et al., 2001).

Así en el presente estudio se investigó la capacidad probiótica de la chicha de molle, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificación de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle.
- Evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle.
- Evaluar la capacidad probiótica *in vivo* de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle en *Ratus norvegicus* "rata"

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

A través de la historia, el hombre ha aprendido diferentes formas de utilizar las bacterias lácticas, tradicionalmente las ha empleado para elaborar algunos productos fermentados.

En la actualidad se realizaron estudios sobre bacterias lácticas aisladas de chicha de molle con capacidad antagónica frente a cepas patógenas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*), realizada por García Godos (2008), en dicha investigación se logró identificar y aislar bacterias lácticas de las especies *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*, determinando que las especies identificadas producen bacteriocinas de amplio espectro.

Por otro lado se realizaron con mayor énfasis ensayos de ingesta de bacterias lácticas de origen alimenticio así como industrial para contrarrestar enfermedades relacionadas con el aparato digestivo realizado por Hilton et al., en el 2002, en cuya investigación sobre infecciones por rotavirus, concluye que las bacterias lácticas influyen en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y mejora el equilibrio de electrolitos la cual tiene consecuencias significativas en el tratamiento y prevención contra el rotavirus.

En lo que respecta a regulación del sistema inmunitario, Matsuzaki et al., en el 2000, confirmaron que algunas cepas probióticas pueden potenciar la respuesta inmunitaria congénita, para ello se han realizado varios estudios *in vitro* en animales en los cuales se demuestra, que pueden modificar respuestas inmunitarias adaptativas.

2.2. Bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico dada su presencia en multitud de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano sean estos: productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas. Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento o de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima, se ha podido comprobar, que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal. Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros (Wolf et al., 2005).

Las bacterias lácticas, pueden ser utilizadas en la prevención y el control de determinadas enfermedades, así como en el mejoramiento de la calidad de conservación de ciertos alimentos, por lo que su valor radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos, que sirvan como punto

de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal (Wolf et al., 2005).

2.2.1. Morfología

Las bacterias lácticas pertenecen al género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o cocobacilos. Son Gram positivos, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato (Samaniego et al., 2005).

2.2.1.1. Pared celular

La pared celular de las bacterias lácticas son Gram positivas y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies (Berges, 2002).

2.2.1.2. Características culturales

Las colonias en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas como *Lactobacillus confusus*, que presentan colonias viscosas.

Su crecimiento en medio líquido se presenta cuando las células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa dando lugar a un sedimento suave y homogéneo. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Samaniego et al., 2005).

Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo

compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso (Samaniego et al., 2005).

2.2.2. Nutrición y condiciones de crecimiento

Presentan particularidades respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados, suelen suplirse cuando el medio de cultivo de las BAL contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales (Berges, 2002).

Debido a que las BAL poseen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares; su clasificación se ha tornado difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural, fue informado por Tannock (1988). Debido a la alta variabilidad de esta región entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de BAL probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR (polymerase chain reaction) (Samaniego et al., 2005).

2.2.3. Condiciones ecológicas

Las BAL crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 4 - 6 y con uno óptimo de desarrollo entre 5 y 6. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 3 hasta 4. Las BAL son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo de un pH 4 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y levaduras (Berges, 2002).

La mayoría de las cepas de BAL son principalmente anaeróbicas un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular su crecimiento superficial sobre medios sólidos y en algunos casos en líquidos (Berges, 2002).

La mayor parte de las BAL son mesófilos así como también termófilos y algunas especies toleran temperaturas bajas cercanas a la congelación (Berges, 2002).

2.2.4. Metabolismo

Las bacterias lácticas carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas (Samaniego et al., 2005).

Transforman carbohidratos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación, constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado (Samaniego, et al. 2005).

2.3. Capacidad probiótica

A través de la historia, el hombre ha aprendido diferentes formas de utilizar las bacterias lácticas, tradicionalmente los ha empleado para elaborar algunos

productos alimenticios fermentados, heredando por generaciones la tecnología de la fermentación (Palou et al., 2000).

Hacia 1907, el biólogo ruso Metchnikoff, sugirió que el proceso de envejecimiento es el resultado de la intoxicación putrefactiva ocasionada por la microbiota intestinal, esto basado en los descubrimientos en habitantes de algunas regiones de Bulgaria, quienes consumieron yogurt como parte de su dieta normal y que tuvieron una longevidad notoria (Palou et al., 2000). Metchnikoff, propuso que la vida se prolongaba como consecuencia del consumo de las bacteria lácticas presentes en el yogurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), surgiendo así la teoría de que las bacteria nocivas en el intestino pueden ser eliminadas por la acción de las bacterias lácticas. Esta teoría llamó la atención en aquellos días y popularizó el consumo diario de yogurt entre los europeos de esa época. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el *Lactobacillus bulgaricus*, que era benéfico, moriría al pasar por los jugos gástricos y no era capaz de sobrevivir en el intestino. Aunque esta teoría se desechó, hubo investigaciones exhaustivas sobre la microbiota intestinal que demostraron que las bacterias lácticas de yogurt en las cuales Metchnikoff basó su hipótesis no eran capaces de sobrevivir en el aparato digestivo (Palou et al., 2000).

En el año 1998 Spanhaak et al., demostraban que los *Lactobacillus casei* en Yakult, era capaz de colonizar el epitelio intestinal en consecuencia, de delimitar el área de adherencia del intestino de otros microorganismos indeseables (Isolauri, 2004). Así, podemos señalar que la capacidad de bacterias lácticas al ser ingeridas diariamente ya sea por alimentos fermentados y/o alimentos suplementados con estas bacterias, actúan sobre la actividad de la microbiota autóctona, y por tanto pueden modificar y favorecer el estado de salud del huésped (Fujisawa, 2008).

En la actualidad se están investigando más microorganismos con capacidad probióticas siendo las más aplicadas en la industria alimentarias las siguientes bacterias lácticas:

Cuadro N°01: Microorganismos de mayor aplicación como probióticos.

Microorganismos de mayor aplicación como probióticos	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei subps. Casei</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. Paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei subps. Tolerans</i>
<i>Lactobacillus casei inimitis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
<i>Lactococcus spp</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Streptococcus spp</i>
<i>Bacillus spp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Saccharomyces spp</i>

Fuente: Fujisawa, 2008

2.3.1. Probiótico

El primer estudio que demostró los efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos fue llevado a cabo por el microbiólogo, premio nobel en Medicina Ilya Metchnikoff en 1907, desde entonces y hasta el día de hoy ha crecido el interés por los alimentos que contienen microorganismos benéficos para la salud y más concretamente por los productos lácticos fermentados (Felley et al., 2003).

Así podemos señalar que la ingestión de bacterias vivas a través del consumo de productos fermentados, actúa sobre la actividad de la microbiota autóctona y por tanto puede modificar, favorecer el estado de salud del huésped (Lei et al., 2006).

Se utilizó por primera vez el término probiótico por Lilly et al., en el año 1965 refiriéndose a una sustancia que estimula el crecimiento de otros

microorganismos. Este término se ha redefinido posteriormente como agente microbiano viable, que al utilizar en animales o en el hombre aportan efectos beneficiosos en el huésped mejorando el balance de la microbiota intestinal (Saminel et al., 2008).

En el Informe conjunto de la FAO (Food and Agriculture Organization) en 2006 el término probiótico se definió como microorganismo vivo, que ingerido en las cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable al huésped (Marteau, 2006).

2.3.2. Características de microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos utilizados, deben ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa, que deberían ser capaces de sobrevivir a las condiciones del estómago y exposición a bilis (Adams et al., 2005).

Según la FAO (Food and Agriculture Organization) en el 2001 para que un organismo sea considerado como probiótico debe cumplir ciertos requisitos indispensables como:

- ❖ Caracterización *in vitro*:
 - a) Estabilidad fenotípica y genotípica
 - b) Patrones de utilización de carbohidratos
 - c) Proteínas.
- ❖ Resistencia a la acidez gástrica.
- ❖ Resistencia a la bilis.
- ❖ Adhesión al epitelio intestinal.
- ❖ Capacidad de utilizar prebióticos (opcional).
- ❖ Ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren el (los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s).

- ❖ Carácter GRAS ("Generally Regarded As Safe": reconocido como seguro para la salud).
- ❖ No presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad. (Fuller, 2007).

2.3.3. Efectos probióticos en algunas enfermedades

2.3.3.1. Trastornos relacionados con el aparato digestivo

La diarrea infecciosa es un importante problema mundial de salud, que causa varios millones de muertes cada año. Aunque la mayoría de las muertes se producen entre niños de países en desarrollo, se estima que la diarrea transmitida por los alimentos afecta cada año hasta el 30 % de la población, incluso en los países desarrollados. Los probióticos pueden constituir un medio importante para reducir estos problemas tales como el restablecimiento de la microbiota intestinal, el mantenimiento de la integridad de la mucosa y la mejora del equilibrio de electrolitos podrían tener consecuencias significativas en los programas de tratamiento y prevención de la diarrea en los países en desarrollo (Hilton et al., 2002).

Una novedad en lo que respecta a las aplicaciones probióticas, es la actividad contra *Helicobacter pylori*, patógeno Gram positivo que causa gastritis de tipo B, úlceras pépticas y cáncer de estómago. Los datos disponibles *in vitro* y en animales, indican que las bacterias ácido lácticas pueden inhibir el crecimiento del patógeno y reducir la actividad de la enzima ureasa necesaria para que el patógeno permanezca en el medio ácido del estómago. En cuanto a la medición de los efectos probióticos, entre los puntos finales se incluyen la supresión de la infección el tratamiento combinado con antibióticos que da lugar a un número menor de efectos secundarios, como el reflujo ácido, y a un riesgo menor de infección recurrente (Rautio et al., 2006).

2.3.3.2. Anomalías en el sistema inmunológico

La inmunidad de la mucosa y los sistemas inmunitarios congénitos adaptativos son dos aspectos considerados tradicionalmente importantes para la respuesta inmunitaria. Siendo los macrófagos, neutrófilos, células destructoras naturales y el complemento sérico representan los componentes principales del sistema congénito, encargado de la primera línea de defensa contra muchos microorganismos. Sin embargo, hay muchos agentes que este sistema es incapaz de reconocer.

Una inyección intravenosa, intraperitoneal e intrapleural de *Lactobacillus casei* Shirota en ratones aumentó considerablemente la actividad destructora de las células de nódulos mesentéricos, pero no de las células de placas de Peyer o de las células del bazo (Matsuzaki et al., 2000), lo que confirma que algunas cepas probióticas pueden potenciar la respuesta inmunitaria congénita. Se han realizado varios estudios *in vitro* y en animales (Gill et al., 2000), que demuestran claramente que las cepas probióticas pueden modificar los parámetros inmunitarios. La correlación entre estos hallazgos y los eventos que tienen lugar en el cuerpo humano sigue estando poco clara, pero hay pruebas cada vez más numerosas de que esos efectos se produzcan.

La modulación probiótica de la inmunidad del huésped es una esfera de investigación muy prometedora. Se ha realizado estudios en seres humanos, que demuestran, que los microorganismos probióticos pueden potenciar la actividad de las células destructoras naturales en ancianos (Gill et al., 2001) y que es posible modular las defensas de huéspedes no específicos (Donnet-Hughes et al., 2003).

2.3.3.3. Infecciones del aparato urinario femenino

Varios centenares de millones de mujeres sufren cada año infecciones del aparato urinario. El agente causante en más del 85% de los casos es *Escherichia coli* que tiene su origen en el intestino.

La alteración de la microbiota vaginal normal, está causada por antibióticos de amplio espectro, espermicidas, hormonas, sustancias alimentarias y factores que aún no se comprenden totalmente. Hay algunos indicios de que los microorganismos probióticos que se administran en forma de alimentos y preparaciones tópicos contribuyen a la prevención de trastornos del aparato urogenital. Se han propuesto criterios para seleccionar cepas probióticas eficaces (Reid et al., 2001), que deberían incluir la verificación de la inocuidad, la capacidad de colonización en la vagina y la capacidad de reducir el recuento de patógenos mediante la exclusión competitiva de la adherencia y la inhibición del crecimiento de los patógenos (Reid et al., 2001).

2.3.3.4. Utilización de probióticos en personas sanas

Muchos productos probióticos son utilizados por consumidores que se consideran sanos. Lo hacen suponiendo que los probióticos les permiten mantener su salud, bienestar y reducir posiblemente el riesgo de contraer a largo plazo enfermedades intestinales, renales, respiratorias y cardíacas. Es necesario hacer varias observaciones sobre este supuesto y sus repercusiones. El uso de probióticos no debería sustituir a un estilo de vida sano y una alimentación equilibrada en personas sanas (Hatakka et al., 2005).

En primer lugar, no existe una medición precisa de la salud y puede que de hecho los sujetos tengan enfermedades ocultas y no detectables en cualquier momento. En segundo lugar, no se han realizado todavía estudios para analizar si la ingestión sistemática de probióticos que contribuye o no a mantener la "salud" durante toda la vida al margen de la alimentación, el ejercicio y otros

elementos del estilo de vida. Un estudio sobre centros de asistencia ambulatoria en Finlandia demostró, que el uso de probióticos reducía la incidencia de las infecciones respiratorias y los días de ausencia por enfermedad (Hatakka et al., 2007).

En los niños recién nacidos los microorganismos probióticos pueden llegar a convertirse en colonizadores primarios y prevenir enfermedades graves en lactantes, la alteración de la flora en niños pequeños sanos ocasiona una situación más compleja. Precisamente por ello, una consecuencia del Proyecto Genoma Humano es que en el momento del nacimiento se pueden utilizar probióticos seleccionados para crear una flora que mejore la salud a lo largo de la vida (Hoyos, 2007).

2.3.4. Propiedades bioterapéuticas

2.3.4.1. Efectos terapéuticos

La acción antagonista hacia gérmenes patógenos es la acción más importante de la microbiota digestiva, es decir, proteger frente a las infecciones y la colonización, por parte de microorganismos patógenos del tubo digestivo (Cagigas, 2002). Los distintos mecanismos que forman la primera línea de defensa del huésped de las infecciones intestinales se llaman resistencia a la colonización, exclusión competitiva o efecto barrera. La represión de los gérmenes patógenos se puede dar de distintos modos:

- o La producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico, a partir de los glúcidos provenientes de los alimentos actúa bajando el pH y limitando el desarrollo de *Escherichia coli* y de la salmonelas. Además, la acidificación del tubo digestivo favorece a los movimientos peristálticos del intestino.
- o Reprimen el crecimiento de las bacterias patógenas, gracias a la producción de sustancias antimicrobianas del tipo de la bacteriocina, que inhiben los gérmenes que a menudo causan las infecciones. Algunas bacterias

utilizadas tienen la capacidad de desconjugar las sales biliares: las formas desconjugadas poseen una capacidad de inhibición mayor sobre el desarrollo de las bacterias que las formas conjugadas.

- Inhiben la prevalencia de los microorganismos patógenos por competición. La adherencia de los probióticos a las células intestinales permitiría una colonización rápida y focalizada del tubo digestivo. El establecimiento de gérmenes indeseables se podría evitar también gracias a una inhibición competitiva de los prebióticos, debido al consumo de los nutrientes en lugar de las bacterias patógenas.

(Cagigas, 2002).

2.3.4.2. Neutralización de los productos tóxicos

La inactivación de los compuestos tóxicos representa otro aspecto muy importante de la acción probiótica y terapéutica de BAL. Los probióticos pueden acumular y reducir la absorción de sustancias tóxicas como el amoníaco, los aminados y el indol. También que disminuyen la biotransformación de las sales biliares y de los ácidos grasos en productos tóxicos (Condony et al., 2008 y Kaila et al., 2005).

2.3.5. Efectos protectores

Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano, incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas (Cagigas, 2002): más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente menor carga microbiana por la presencia de los jugos biliares (10^3 UFC/mL de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g. La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los

recién nacidos permanecen en un medio estéril hasta que comienza el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad (Mombelli et al., 2005). Las bacterias, que forman la denominada microflora intestinal residente, no suelen tener efectos nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar de su huésped. La función beneficiosa de la microflora intestinal lo que se ha denominado la "resistencia a la colonización" o "efecto de barrera" (Schiffin et al., 2007) en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para mantener su presencia en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos ingeridos recientemente, incluidos patógenos. Por consiguiente, la manipulación alimentaria de la microbiota intestinal de "bacterias beneficiosas" podría contribuir al bienestar del huésped (Cagigas, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de abril a diciembre del 2009.

3.2. Material biológico

55 muestras de chicha de molle procedente del distrito de Luricocha comunidad rural Seclla, distrito de Ayacucho, Pacaycasa anexo Ocopa, Tambillo anexo Condaray, y distrito de Jesús Nazareno

3.3. Unidad de experimentación

30 ratas hembras adquiridos en el Instituto Nacional de Salud - Lima.

3.4. Metodología

3.4.1. Aislamiento de bacterias lácticas

Se tomó una asada de la muestra fermentada y se sembró por estrías en Agar Lactobacilli, incubándose a 37 °C por 24 horas, y observándose las características de las colonias (Salcedo, 1993).

3.4.2. Identificación de bacterias lácticas

a. Características microscópicas

b. Se evaluaron las características microscópicas mediante la coloración de Gram, esta prueba se hizo a partir de un cultivo joven (18-24h) en Agar Lactobacilli (Salcedo, 1993).

c. Pruebas bioquímicas

La evaluación de la capacidad fermentativa se realizó con los siguiente carbohidratos: arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafibinosa, salicilina, sorbitol sacarosa, xilosa, almidón e inulina (Salcedo, 1993).

3.4.3. Capacidad probiótica *in vitro*

a. Crecimiento en disco de microorganismos

En primer lugar se reactivó las cepas patógenas en caldo Nutritivo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella neumoniae*) y en caldo Sabouroud (*Candida albicans*) a 37°C por 14 horas. Así mismo se reactivó las bacterias lácticas en caldo Láctobacilli a 37°C/ 14 h y se comparó con el tubo Nº 02 de la escala de MacFarland con 10⁹ UFC/mL. Así mismo se dispuso en placas petri con Agar Lactobacilli, en la que se realizaron con la ayuda de un sacabocado discos de 6mm de diámetro a partir de la placa con Medio Lactobacilli y se colocó en placas con Agar Müeller Hintong y Agar Nutritivo, luego con las cepas de bacterias lácticas reactivadas se colocó exactamente en el centro de cada disco 20µL de BAL reactivadas (Sacsquisque et al., 2002).

b. Prueba de antagonismo

Se sumergió hisopo estéril en suspensión de células a partir de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* comparádo con el tubo Nº 02 de la Escala de MacFarland,

presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo.

Se inoculó en la superficie de la placa con Agar Müeller Hintong y Agar Nutritivo, estirando con el hisopo estéril en tres direcciones, para asegurar una distribución uniforme del inóculo, antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para eliminar el exceso de humedad superficial.

Se colocaron los discos (obtenidos según lo descrito en el apartado a) sobre la superficie del Agar Müeller Hintong presionando suavemente sobre el disco para asegurar el contacto completo con la superficie del Agar. Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C por 24 horas para bacterias y 25°C por 48 horas para levadura para finalmente medir los halos de inhibición (Sacsquisque et al., 2002),

c. Tolerancia a condiciones gastrointestinales

b.1. Tolerancia a pH ácido

Se preparó tubos con caldo Lactobacilli y se ajustó a pH 1.0, 1.5 y 2.0 con HCl 0.1 N luego se vertió el inóculo de las cepas BAL en tubos y se dejó en incubación a 37°C por 24 horas, finalmente se observó el crecimiento por turbidez (Montoya, 2008).

b.2. Tolerancia a jugos gástricos

Se reactivó las cepas BAL, luego se preparó jugo gástrico artificial, para lo cual se tomó 0.2g de NaCl y 0.32g de pepsina ajustando a pH final de 2.0 - 2.3 con HCl concentrado, se completó a 100mL con agua destilada estéril. Como control se ajustó jugo gástrico artificial a un pH de 6.5 -7.0 con NaOH 5N, luego se llevó a esterilización, así mismo se vertió 1mL de inóculo en 9 mL del jugo gástrico artificial pH 2.0 - 2.3 y pH 6.5 - 7.0 (control) y se incubó a 37°C, luego de 24 horas se observó la viabilidad celular por turbidez (Montoya, 2008).

b.3. Tolerancia a sales biliares

Se preparó bilis de buey al 0.05, 0.1, 0.15, 0.3 % p/v en tubos con Caldo Lactobacilli y se vertió 100 µL cepas BAL, se dejó en incubación a 37°C por 24 horas se observó el crecimiento por turbidez (Montoya, 2008).

3.4.4. Evaluación de la densidad poblacional *in vivo* de bacterias lácticas y cepas patógenas

a. Estandarización de la carga microbiana de bacterias lácticas

Para la estandarización de carga microbiana de BAL se reactivó las cepas patógenas y una cepa BAL escogida al azar, luego se verificó la turbidez con la escala de Mac Farland (tubo 2) con 10^9 UFC/mL, para posteriormente realizar el recuento en placa respectivo (Salcedo, 1993).

b. Evaluación *in vivo* de la densidad poblacional de bacterias lácticas

A los animales de experimentación se les distribuyó individualmente en jaulas, realizándose el siguiente diseño experimental:

Yacón + BAL	:	3 ratas
BAL	:	3 ratas
Control	:	3 ratas
Yacón	:	3 ratas

A cada uno de los animales de experimentación, se administró interaperitonealmente el probiótico diariamente. Para el tratamiento de yacón más BAL, se administró en proporción 1:1 de bacterias lácticas y jugo de yacón respectivamente, para el tratamiento de BAL y yacón 2 mL de bacterias lácticas y de jugo de yacón respectivamente.

A los 21 días se sacrificó al animal de experimentación extrayendo el intestino delgado, se lavó con agua peptonada al 1% y se diluyó hasta 10^{-20} para luego sembrar por incorporación en Agar Lactobacilli e incubar a 37°C por 24 horas y realizar el recuento en placa estándar (Montoya, 2008).

3.5. Diseño experimental

Para la investigación se empleó tratamientos con jugo de yacón y bacterias lácticas, realizándose tres repeticiones para cada tratamiento.

El diseño experimental constituido por:

Tratamiento 1 : 3 ratas (yacón + BAL)

Tratamiento 2 : 3 ratas (BAL)

Tratamiento 3 : 3 ratas (yacón)

Tratamiento 4 : 3 ratas (control)

3.6. Análisis Estadístico

Se realizó la prueba de ANOVA (Análisis de varianza) con un nivel de confianza de 95% la cual diferenció de densidades poblacionales de BAL en el intestino de ratas para ello se empleó el software estadístico SPSS 15.

IV. RESULTADOS

Tabla N° 01. Especies de bacterias lácticas encontradas en chicha de molle, Ayacucho-2009.

Especies	N°	%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	73
<i>Lactobacillus maltaromicus</i>	6	11
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9	16

**Tabla Nº 02.A. Diámetro de halos de inhibición de bacterias lácticas
aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.**

Cepas	Especie	<i>Escherichia coli</i> DMR = 14mm	<i>Staphylococcus aureus</i> DMR =15mm	<i>Candida albicans</i> DMR=14mm	<i>Salmonella typhimurium</i> DMR=15mm
BL-1	<i>Lac.platarum</i>	17	17	17	16
BL-2	<i>Lac.platarum</i>	15	14	14	15
BL-3	<i>Lac.platarum</i>	12	14	13
BL-4	<i>Lac.platarum</i>	14	13	13.3
BL-5	<i>Lac. maltaromicus</i>	14.7	13	13	12
BL-6	<i>Lac.platarum</i>	12.6	13	12
BL-7	<i>Lac.platarum</i>	13.3	12.6	11.7
BL-8	<i>Lauc. mesenteroides</i>	13	12	14
BL-9	<i>Lac.platarum</i>	13	14	12
BL-10	<i>Lac.platarum</i>	14.7	13.3	13.3	12.6
BL-11	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-12	<i>Leuc. mesenteroides</i>	13	12	12
BL-13	<i>Leuc. mesanteroides</i>	13	13	12
BL-14	<i>Lac.platarum</i>	14	13	14	12
BL-15	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-16	<i>Lac.platarum</i>	13	13	15.3	12
BL-17	<i>Lac. maltaromicus</i>	14	12.6	13.3	12.6
BL-18	<i>Lac. maltaromicus</i>	13.3	13.3	14	14
BL-19	<i>Lac.platarum</i>	13.3	12.6	11.7
BL-20	<i>Lac.platarum</i>	13	13	12.6
BL-21	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-22	<i>Lac.platarum</i>	13	14
BL-23	<i>Lac.platarum</i>	12.6	13	12.6
BL-24	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-25	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-26	<i>Lac. maltaromicus</i>	17	18	16	16

DMR= Diámetro mínimo resistente

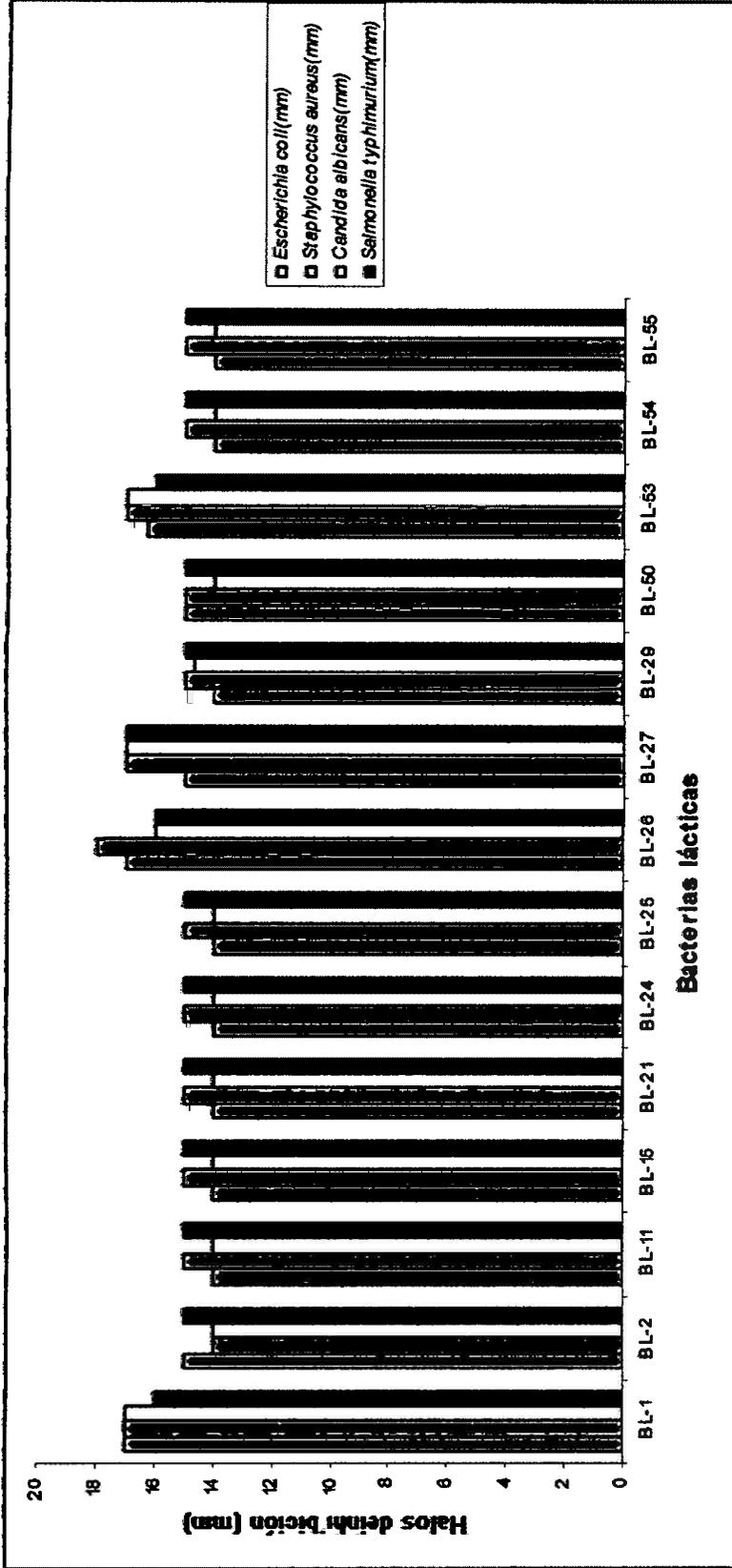
BAL= Bacteria ácido láctica

**Tabla N° 02.B. Diámetro de halos de inhibición de bacterias lácticas
aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.**

Cepas	Especie	<i>Escherichia coli</i> DMR= 14mm	<i>Staphylococcus aureus</i> DMR =15mm	<i>Candida albicans</i> DMR = 14mm	<i>Salmonella typhimurium</i> DMR=15mm
BL-27	<i>Lac.platarum</i>	15	17	17	17
BL-28	<i>Lac.platarum</i>	13	12	13
BL-29	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14.7	15
BL-30	<i>Leuc. mesenteroides</i>	12	12	13
BL-31	<i>Leuc. mesenteroides</i>	13	13	14	12
BL-32	<i>Lac.platarum</i>	12	14	12
BL-33	<i>Lauc. mesenteroides</i>	13	14
BL-34	<i>Leuc. mesentaroidas</i>	14	12	13	14
BL-35	<i>Lac.platarum</i>	13	12	13.3	12
BL-36	<i>Lac.platarum</i>	14.7	14
BL-37	<i>Lac.platarum</i>	13.3	12.6	13	13
BL-38	<i>Lac.platarum</i>	12.6	13
BL-39	<i>Lac.platarum</i>	14	14	14	12
BL-40	<i>Lauc. mesenteroidas</i>	13	13	13
BL-41	<i>Leuc. mesenteroides</i>	14	12	14	14
BL-42	<i>Lac.platarum</i>	14	14
BL-43	<i>Lac.platarum</i>	14	12	13	12
BL-44	<i>Lac.platarum</i>	12.6	14	12.6
BL-45	<i>Lac.platarum</i>	13.3	13	14.7	12.6
BL-46	<i>Lac.platarum</i>	13	13	14	12
BL-47	<i>Lac.platarum</i>	13	12	14	12
BL-48	<i>Lac.platarum</i>	12	12
BL-49	<i>Lac.platarum</i>	14	12	14	12
BL-50	<i>Lac. maltaromicus</i>	15	15	14	15
BL-51	<i>Lac.platarum</i>	13.3	14
BL-52	<i>Lac.platarum</i>	13	14	12
BL-53	<i>Lac. maltaromicus</i>	16.3	17	17	16
BL-54	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15
BL-55	<i>Lac.platarum</i>	14	15	14	15

DMR= Diámetro mínimo resistente

BAL= Bacteria ácido láctica



La codificación BL-1,2,11,15,21,24,25,26,27,28,54,55=Lactobacillus plantarum, BL-28,50,53=Lactobacillus maltonicus

Figura N° 01: Evaluación de la formación de halos de inhibición producidas por bacterias lácticas frente a cepas patógenas, Ayacucho-2009.

**Tabla Nº 03.A. Crecimiento de bacterias lácticas en condiciones
gastrointestinales, Ayacucho-2009.**

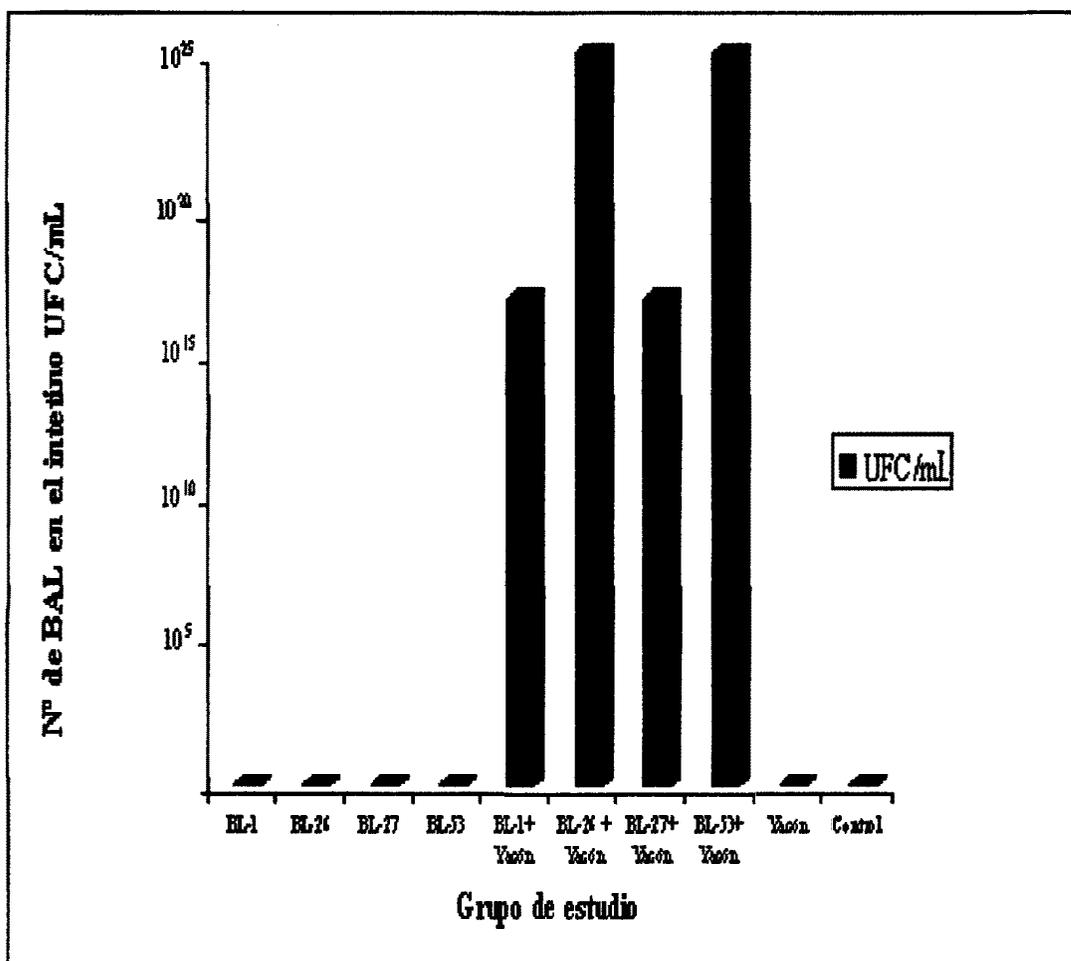
CEPAS	Especie	Tolerancia gastrointestinal							Tolerancia	
		pH			Bilis(% p/v)					Jugo gástrico
		1	1.5	2	0.05	0.1	0.15	0.3		
BL-1	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-2	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-3	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-4	<i>Lac.platarum</i>	X	X	X	√	√	√	X	√	NO
BL-5	<i>Lac. maltaromicus</i>	X	X	√	√	√	√	√	√	NO
BL-6	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-7	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-8	<i>Lauc. mesenteroidas</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-9	<i>Lac.platarum</i>	X	X	√	√	√	√	√	√	NO
BL-10	<i>Lac.platarum</i>	√	X	√	√	√	√	√	√	NO
BL-11	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-12	<i>Leuc. mesenlaroides</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-13	<i>Lauc. mesenteroidas</i>	X	X	X	√	√	√	X	√	NO
BL-14	<i>Lac.platarum</i>	X	√	X	X	X	X	X	√	NO
BL-15	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-16	<i>Lac.platarum</i>	X	X	X	√	√	√	√	√	NO
BL-17	<i>Lac. maltaromicus</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-18	<i>Lac. mallaromicus</i>	X	X	X	√	√	√	√	√	NO
BL-19	<i>Lac.platarum</i>	X	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-20	<i>Lac.platarum</i>	X	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-21	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-22	<i>Lac.platarum</i>	X	X	√	√	√	√	√	X	NO
BL-23	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-24	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-25	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-26	<i>Lac. maltaromicus</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI

BAL= Bacteria ácido láctica

**Tabla Nº 03.B. Crecimiento de bacterias lácticas en condiciones
gastrointestinales, Ayacucho-2009.**

CEPAS	Especie	Tolerancia gastrointestinal							Tolerancia	
		pH			Bilis(% p/v)					Jugo gástrico
		1	1.5	2	0.05	0.1	0.15	0.3		
BL-27	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-28	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-29	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-30	<i>Leuc. mesenteroides</i>	×	×	√	√	√	√	√	√	NO
BL-31	<i>Leuc. mesenteroides</i>	×	×	√	√	√	√	√	×	NO
BL-32	<i>Lac.platarum</i>	×	×	√	√	√	√	√	√	NO
BL-33	<i>Leuc. mesenteroides</i>	√	√	√	√	√	√	√	×	NO
BL-34	<i>Leuc. mesenteroides</i>	√	√	√	√	√	√	√	×	NO
BL-35	<i>Lac.platarum</i>	×	×	×	√	√	√	×	√	NO
BL-36	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	×	√	×	NO
BL-37	<i>Lac.platarum</i>	×	×	×	√	√	√	√	√	NO
BL-38	<i>Lac.platarum</i>	×	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-39	<i>Lac.platarum</i>	×	×	×	√	√	√	√	×	NO
BL-40	<i>Leuc. mesenteroides</i>	×	×	×	√	√	√	√	√	NO
BL-41	<i>Leuc. mesenteroides</i>	√	×	√	×	√	×	√	×	NO
BL-42	<i>Lac.platarum</i>	×	√	√	×	√	×	×	×	NO
BL-43	<i>Lac.platarum</i>	×	×	√	√	√	√	√	√	NO
BL-44	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-45	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-46	<i>Lac.platarum</i>	×	×	×	√	√	√	√	√	NO
BL-47	<i>Lac.platarum</i>	√	×	√	√	√	×	√	×	NO
BL-48	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-49	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	NO
BL-50	<i>Lac. maltaromicus</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-51	<i>Lac.platarum</i>	×	×	√	√	√	√	√	√	NO
BL-52	<i>Lac.platarum</i>	√	√	×	√	√	√	×	√	NO
BL-53	<i>Lac. maltaromicus</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-54	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI
BL-55	<i>Lac.platarum</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	SI

BAL= Bacteria ácido láctica



La codificación BL-1=*Lactobacillus plantarum*, BL-26 =*Lactobacillus maltaromicus*, BL-27 =*Lactobacillus plantarum* y BL-53 = *Lactobacillus maltaromicus*

Figura N° 02: Densidad poblacional de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle evaluadas en el intestino de *Rattus norvegicus* "rata" a los 21 días administrado, Ayacucho-2009.

Tabla N° 04. Ganancia de pesos promedio de *Rattus norvegicus* “rata” sometidas a inóculos de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.

Grupo de estudio	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso	% ganancia de peso
BL-1	153.8737	181.5093	27.6356	8
BL-26	154.2589	185.0896	30.8307	10
BL-27	154.5032	173.4318	18.9286	6
BL-53	154.0488	173.9646	19.9158	6
BL- 1+ Yacón	154.5164	197.7945	43.2781	14
BL- 26 + Yacón	154.125	200.2252	46.1002	15
BL-27 + Yacón	153.7394	198.3146	44.5752	14
BL-53 + Yacón	154.5761	203.4336	48.8575	16
Yacón	153.8562	169.5877	15.7315	5
Control	154.1628	169.6784	15.5156	5

La codificación BL-1=*Lactobacillus plantarum*, BL-26 =*Lactobacillus maltaromicus*, BL-27 =*Lactobacillus plantarum* y BL-53 = *Lactobacillus maltaromicus*

V. DISCUSIÓN

En la investigación de la capacidad probiótica, se identificaron 55 cepas de bacterias lácticas en base a la producción de gas, gluconato y fermentación de 16 carbohidratos, lográndose identificar tres especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus maltaromicus* y *Leuconostoc mesenteroides*, en un porcentaje de 73,11 y 16% respectivamente (tabla N° 01).

Uno de los primeros requisitos para determinar a una cepa probiótica como tal es de producir sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas; éstos compuestos reducen el número de células patógenas, afectando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Earns, 2006), en este sentido se llevó a cabo un estudio con la finalidad de evidenciar la posible capacidad inhibidora de las cepas aisladas de la chicha de molle y para realizar la selección de cepas, se basó, en que las cepas fueran activas frente a cuatro microorganismos patógenos los cuales deben evidenciarse mediante la producción de sustancias inhibitorias. Los resultados de este estudio se visualizan en la tabla N° 02.A y tabla N° 02.B, en el que se observa a las cepas BAL frente a dos bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, y *Salmonella typhimurium*, a una Gram positiva *Staphylococcus aureus* y a una levadura *Candida albicans*, resultando de ello que las 55 cepas producen sustancias inhibitorias frente a microorganismos patógenos, siendo el diámetro

mínimo resistente 14 mm, 15 mm, 15 mm y 14 mm respectivamente, observándose que 14 cepas producen halos de inhibición frente a las cuatro cepas patógenas (figura N° 01), deduciendo que estas cepas producen bacteriocinas de amplio espectro, visualizando que las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus maltaromicus* presentan mayor capacidad de inhibición en comparación con las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, este resultado es similar a lo reportado por García Godos (2008) en su investigación de la capacidad antagónica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, siendo las especies de *Lactobacillus plantarum* con mayor capacidad antagónica en comparación a *Leuconostoc mesenteroides*.

Entre las especies de *Lactobacillus* que desempeñan un papel fundamental en el tracto digestivo podemos citar a *Lactobacillus plantarum* las cuales mencionan Berngmarl (2004) en su investigación de la actividad inhibitoria de los mismos frente a cepas de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* demuestra que *Lactobacillus plantarum* producen un sistema inhibitorio y acción antagonista contra los microorganismos patógenos antes mencionados, estos resultados coinciden con la producción de bacteriocinas producidas por las cepas BAL aisladas de chicha de molle (figura N°01).

Un requisito importante para determinar la utilización de los *Lactobacillus* como probiótico, es que las cepas sean capaces de adherirse a las células intestinales ya que constituye un pre-requisito para la colonización, dichos *Lactobacillus* deben soportar las barreras potenciales tales como pH del estómago, presencia de bilis y las interacciones con otros microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal por tanto se requieren cepas ácido-tolerantes así como tolerantes a jugos gástricos y fluidos duodenales (Fernández, 2006).

Así para evaluar la capacidad probiótica *in vitro* se realizaron pruebas de tolerancia gastrointestinal en la cual se evaluó el crecimiento de BAL a diferentes concentraciones de pH, concentraciones de bilis y jugo gástrico artificial, experimentadas a las 55 cepas. En la tabla Nº 03.A y tabla Nº 03.B, se observa la capacidad de tolerar estas condiciones, para ello las bacterias lácticas requieren complejos de proteínas y carbohidratos para adherirse a las células intestinales. Para algunas cepas, un material tipo polisacárido que facilita la unión, mientras que otras cepas involucran complejos de lípidos y proteínas en este mecanismo (Henriksson, 2005 y Saviano, 2006)

Fujisawa et al., (2008), indicaron que a partir de los estudios realizados de las cepas de *Lactobacillus* provocan un adecuado efecto probiótico en el intestino humano dado que son capaces de resistir a estas condiciones. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio resultando de ello que 25 cepas aisladas de chicha de molle tienen capacidad de tolerar condiciones gastrointestinal *in vitro*.

En base a ello se seleccionó cuatro cepas BAL con mayor diámetro de inhibición frente a microorganismos patógenos y tolerantes a condiciones gastrointestinales, siendo las seleccionadas BL-1 de la especie *Lactobacillus plantarum*, BL-26 de la especie *Lactobacillus maltaromicus*, BL-27 *Lactobacillus plantarum* y BL-53 de la especie *Lactobacillus maltaromicus* a las cuales se evaluaron la capacidad probiótica *in vivo*.

Para la evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de cepas se administró bacterias lácticas a 30 animales de experimentación (*Rattus norvegicus*) del cual podemos destacar que no se observaron efectos negativos ni en el comportamiento ni en el bienestar de las 30 ratas hembras a lo largo de todo el estudio realizado. Así para la administración de estas cepas se inoculó 10^{15} UFC/mL, resultados que se muestra en la tabla Nº 11.

En la tabla Nº 04 observamos los resultados de la aplicación de los tratamientos en cuanto a la ganancia de peso de ratas, encontrándose que las ratas que recibieron bacterias lácticas más jugo de yacón obtuvieron 46 gr de ganancia de peso mientras que en la ingesta de BAL se obtuvo 24 gr y 16 gr de ganancia de peso en el grupo control y extracto de yacón, de ello deducimos que las ratas que recibieron bacterias lácticas más jugo de yacón lograron mayores ganancias en peso a comparación con los que no recibieron el tratamiento, debido a la mayor asimilación de nutrientes y ausencia de enfermedades e infecciones gástricas durante el tiempo de estudio. El mayor incremento de peso puede ser atribuido a un mejor estado físico en las ratas, como lo reporta Fox (2007) en su investigación sobre el efecto de bacterias probióticas en animales de experimentación en el cual estableció, que la ganancia diaria de peso en animales influyen factores como la ingesta de bacterias probióticas, estimulando su resistencia a microorganismos patógenos así como activando su respuesta inmune.

En el tabla Nº 03 (Anexo Nº 6), se reporta la carga microbiana de bacterias lácticas halladas en los intestinos de los animales de experimentación que son muy variables, en el cual se pone evidencia que las bacterias lácticas son capaces de adherirse al intestino, existiendo mayor número de carga microbiana en los tratamientos de las cuatro cepas más la utilización del yacón, esto debido a la presencia del prebiótico el cual cumple el papel de nutriente para los probióticos, en base a las cuatro cepas experimentales no existe diferencia en la carga microbiana obtuyéndose una carga microbiana de 25×10^{24} UFC/mL en el grupo de estudio con BAL más yacón, mientras que en el tratamiento con BAL 60×10^{19} UFC/mL, de ello podemos mencionar que las cuatro cepas probióticas tienen la misma capacidad de adherencia al intestino, en cambio en el grupo de

estudio en los cuales se experimentó independientemente con el yacón y el grupo control reportan una carga de 50×10^{14} UFC/mL, en base a ello se observa un incremento de 10×10^5 UFC/mL de BAL con respecto a la utilización de BAL y 25×10^{10} UFC/mL con BAL más yacón (gráfico N° 02). Siendo el yacón, condicionante para una mayor densidad poblacional de las cepas lácticas, debido a la presencia de fructodigosacáridos como fuente de carbono estimulando selectivamente al crecimiento de microorganismos probióticos como reporta Flores en el 2008 en su investigación capacidad prebiótica de *Smallantus sonchifolia* en *Rattus norvergicus*, menciona que los prebióticos como el yacón contienen fructooligosacáridos que estimulan el crecimiento de número de UFC de *Lactobacillus*. En consecuencia podemos indicar que administrar una mezcla de una cepa BAL con el jugo de yacón administrado en proporción 1:1 determinar un grado de adhesión notable y que facilita el desplazamiento de bacterias lácticas en el tracto digestivo de los individuos en experimentación.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
BIBLIOTECA

VI. CONCLUSIONES

- Se identificaron 55 cepas nativas de bacterias lácticas de chicha de molle procedentes de las provincias de Huanta y Huamanga pertenecientes a las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus maltaromicus*.
- 14 cepas BAL produjeron sustancias inhibitorias de amplio espectro frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*) y 25 cepas BAL resistentes a condiciones gastrointestinales.
- Se evaluaron en el intestino de ratas el crecimiento de BAL, reportando a los 21 días una densidad poblacional de 60×10^{19} UFC/mL en el grupo de estudio de bacterias lácticas y 25×10^{24} UFC/mL en el tratamiento con bacterias lácticas más jugo de yacón; mientras con el grupo de yacón y control 50×10^{14} UFC/mL de BAL.

VII. RECOMENDACIONES

- **Difundir el consumo de bebidas tradicionales como la "chicha de molle" debido a que tiene capacidad probiótica.**
- **Aislar microorganismos patógenos que causen enfermedades gastrointestinales como *Helicobacter pylori* entre otros y realizar ensayos *in vitro* de capacidad probiótica.**
- **Implementar y equipar laboratorios de biología molecular para la identificación genotípica de las cepas de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle e impulsar la formulación de una bebida prebiótica.**
- **Continuar con los trabajos de investigación relacionados a bebidas tradicionales de nuestra región para determinar la capacidad probiótica y/o prebiótica mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*.**

- <http://books.science.com.pe/books/Favourable/effect/of+acidifie/milk>
10. Fox, S. (2007). Probiotics: Intestinal inoculants for production animal. Vet. Med. 12(83): 806-818. New York. En URL:
http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm
 11. Flores, M. (2008). Tesis: Capacidad prebiótica de *Smallanthus sanchifolia* "yacón" en *Rattus norvergicus* "rata". Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Perú.
 12. Fuller, R. (2007). Probiotics in man and animal and applied Bacter. Colombia. En URL:
http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FBJN81_01%2FS0007114599000045a.pdf&code=c1dbe1b793d891edd563057d88374391
 13. Galán, V. (2006). Prebióticos y probióticos: Bacterias saludables. MK3 S.L. Mirasierra. Argentina. En URL:
<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/45/6/1808>
 14. García Godos, P. (2008). Informe de investigación: Evaluación de bacterias lácticas con capacidad antagónica frente a cepas patógenas aislada a partir de chicha de molle. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Perú.
 15. Gill, H., Prasad, J., Gopal, P. (2000). Dietary *Bifidobacterium lactis* HN019 enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Immunol. 8(2): 14-18. Argentina. En URL:
<http://www.gastroinf.com/SecciNutri/dietry.pdf>
 16. Gill, H., Sheih, Y., Chuh, L. (2001). Systemic immunity enhancing effect in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium. J Am Coll Nutr. 14(4): 25-27. México. En URL:
<http://www.jacn.org/content/20/2/149.short>
 17. Hatakka, K., Savilahti, E., Ponka, A., Meurman, J., Poussa, T., Nase, L., Saxelin, M. (2005). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children. Br Med J. Brasil. En URL:
<http://agris.fao.org/agrissearch/search/display.do?f=1999/GB/GB99070.xml;GB1999010468>
 18. Henriksson, A. (2005). Adhesion to porcine squamous epithelium of sacharide and protein of *Lactobacillus fermentum*. Cuba. En URL:
<http://mic.sgmjournals.org/content/138/12/2657.short>

19. Hilton, Y., Kukielka, T., Farres, W. (2002). Prebióticos y probióticos: una relación beneficiosa. *Rev Cubana Aliment Nutriv.* 14(4): 12-15. Cuba. En URL: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm
20. Hoyos, A. (2007). Activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Cuba. En URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp070268v/full>
21. Isolauri, E., Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. (2004). Probiotics in primary prevention of atopic disease. *Lancet.* México. En URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673600042598>
22. Fujisawa, N. (2008). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters.* 4(2): 5-7. México. En URL: http://books.biology.com.pe/books?hl=es&lr=&id=ucPf5kCNGjMC&oi=fnd&pg=PR7&dq=+Favourable++effect+of+acidifiel+milk&ots=hLiblmUsMZ&sig=TXLoxqneAf_CKeaY7RN02p5PmKY#v=onepage&q&f=false
23. Kaila, M., Isolauri, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (2005). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response on human diarrhea by a human lactobacillus strain. *Pediat Res.* México. En URL: http://journals.lww.com/pedresearch/Abstract/1992/08000/Enhancement_of_the_Circulating_Antibody
24. Lei, E., Friis, H. (2006). Sponeausly fermented millet product as a natural probiotic. *International Journal of Food Microbiology.* 78(15): 76-80. Brasil. En URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506002510>
25. Matsuzaki, T., Chin, J. (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol.* 10(4):56-58. London. En URL: <http://www.nature.com/icb/journal/v78/n1/abs/icb200010a.html>
26. Marteau, P. (2006). Safety aspects of probiotic product. Roma. En URL: <http://europa.eu.int/com/food/fs/sc/scan/out41.pdf>.
27. Mombelli, B., Gismondo, M. (2000). The use of probiotics in medical practice. México. En URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857900003228>
28. Montoya, H. (2008). *Biología experimental.* 3ra edición. Editorial Científica. México.

- 29. Palou, A., Serra, P. (2000).** Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. *Alim Nutr Salud. Brasil*. En URL:
<http://ibros-revistas-derecho.vlex.es/vid/perspectivas-europeas-alimentos-fermentados-117641>
- 30. Perdigon, G., Vintini, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M. (1999).** Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Dairy Sci.* 11(5):23-25. Colombia. En URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030299753336>
- 31. Quillama, E. (1995).** Aislamiento e identificación de bacterias lácticas aisladas de chicha de jora. *Boletín de Lima.* 100(3):12-15. Perú.
- 32. Rautio, M., Jacobus, S. (2006).** Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Roma. En URL:
<http://md1.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=ENV&recid=4572150&q=Liver+abscess+due+to+a+Lactobacillus+rhamnosu+s+strain+indistinguishable+from+Lactobacillus+rhamnosus+&uid=790976822&setcookie>
- 33. Reid, G., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. (2001).** Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Microbiol Immunol.* Colombia. En URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01549.x/full>
- 34. Roberfroid, M. (2000).** Prebiotics and probiotics: are they functional foods. *Ediciones J Clin Nutr.* 9(3):12-14. Cuba. En URL:
<http://www.ajcn.org/content/71/6/1682S.abstract>
- 35. Sacsquisque, E., Velásquez, J. (2002).** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. En URL:
<http://manul.sld/proced/sensibil=S037507602003000300004&inscript>
- 36. Salcedo, A. (1993).** Microbiología clínica y el laboratorio bioquímico. 1ra edición. Editorial Graf. Impresiones. Perú
- 37. Saxalin, N. (2007).** Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 71(10):23-26. Cuba. En URL:
<http://www.ajcn.org/content/71/2/405.short>

- 38. Saviano, A. (2006).** Milk intolerance and-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* 11(6):23-26. Brasil. En URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030287800231>
- 39. Schiffin, E., Brassart, D.,Donnet, A. (2007).** Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacterial. *Dairy Sci Aug. España.* En URL:
<http://www.ajcn.org/content/66/2/515S.short>
- 40. Spanaak, S. (1998).** The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora. *E. journal Clinical Nutrition.* 10(4):13-16. Argentina. En URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881885>
- 41. Villalobos, R., Saldivar, S., Moreno, A. (2008).** Tesis Implante histológico experimental de *Trichinella spiralis* en *Rattus norvergicus* "rata". *Boletín Lima.* 100(5):14-16. Perú.
- 42. Wolf, B., Garleb, K., Ataya, D., Casas, A. (2005).** Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult male subjects. *Microbial. Ecology in Health and Disease.* Argentina. En URL:
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08910609509141381>

ANEXOS

Anexo Nº 01.

Tabla Nº 04. Lugares de procedencia de chichas de molle, Ayacucho-2009.

Nº	Procedencia
BL-1	Agallas de oro
BL-2	Av. Amancaes
BL-3	Condoray
BL-4	
BL-5	Chaqo
BL-6	Evitamiento
BL-7	
BL-8	Enace
BL-9	Huascaura
BL-10	
BL-11	Huanta
BL-12	Jr. Pizarro
BL-13	Jr. Cusco
BL-14	Luricocha
BL-15	Los olivos
BL-16	Muyurina
BL-17	
BL-18	Nazarenas
BL-19	Ñeque
BL-20	
BL-21	
BL-22	
BL-23	Ocopa (pacaycasa)
BL-27	Pacaycasa
BL-28	
BL-29	
BL-30	
BL-31	
BL-32	
BL-33	
BL-34	
BL-35	Prolongación Cusco
BL-36	
BL-37	Santa Elena
BL-38	
BL-39	Santa Bárbara
BL-40	
BL-41	
BL-42	
BL-43	San Sebastián
BL-44	
BL-45	Secclá
BL-46	San Juan Bautista
BL-47	
BL-48	
BL-49	San Luis
BL-50	Tambillo
BL-51	
BL-52	
BL-53	Villa San Cristóbal
BL-54	
BL-55	

BL=Bacteria ácido láctica

Anexo N° 02.

Tabla N° 02. Características microscópicas de bacterias lácticas nativas aisladas de chichas de molle, Ayacucho-2009.

Cepas	Gram	Características
BL-1	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-2	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-3	+	Bacilos solos y en cadena
BL-4	+	Bacilos solos y en cadena
BL-5	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-6	+	Bacilos solos y en cadena
BL-7	+	Bacilos en cadena
BL-8	+	Cocos en pareja y cadena corta
BL-9	+	Cocobacilos en cadena y cocos solos
BL-10	+	Cocobacilos en cadena y bacilos solos
BL-11	+	Bacilos solos y en cadena
BL-12	+	Cocos en pareja y cadena corta
BL-13	+	Cocos solos
BL-14	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-15	+	Cocobacilos en pareja
BL-16	+	Bacilos en cadena
BL-17	+	Bacilos solos y en cadena
BL-18	+	Bacilos en cadena
BL-19	+	Bacilos solos y en cadena
BL-20	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-21	+	Cocobacilos en cadena corta
BL-22	+	Cocobacilos en pareja
BL-23	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-24	+	Bacilos solos y en cadena
BL-25	+	Bacilos solos y en cadena
BL-26	+	Bacilos solos y en cadena
BL-27	+	Bacilos solos y en cadena
BL-28	+	Cocobacilos en cadena
BL-29	+	Bacilos solos y en cadena
BL-30	+	Cocos solos
BL-31	+	Cocos solos y cadena corta
BL-32	+	Cocobacilos en cadena corta
BL-33	+	Cocos solos
BL-34	+	Cocos solos
BL-35	+	Cocos solos
BL-36	+	Cocos en pareja y cadena corta
BL-37	+	Bacilos solos y en cadena
BL-38	+	Bacilos en cadena
BL-39	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-40	+	Cocos solos
BL-41	+	Cocos en pareja y cadena corta
BL-42	+	Cocobacilos en cadena corta
BL-43	+	Cocobacilos en cadena corta
BL-44	+	Bacilos solos y en cadena
BL-45	+	Bacilos en cadena y solos
BL-46	+	Bacilos solos y en cadena
BL-47	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-48	+	Cocobacilos en cadena corta
BL-49	+	Bacilos en cadena
BL-50	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-51	+	Bacilos solos y en cadena
BL-52	+	Bacilos solos y en cadena
BL-53	+	Cocobacilos en cadena
BL-54	+	Cocobacilos solos y en cadena corta
BL-55	+	Cocobacilos solos y en cadena corta

BL=Bacteria ácido láctica

Anexo N° 03.

Tabla N° 06.A. Identificación de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.

Cepa	Gas	Gluconato	Fermentación de carbohidratos														Especie			
			Ar	Cel	Fru	Gal	Glu	Lac	Mal	Mnt	Man	Raf	Sal	Sor	Sac	Xyl		Alm	Inu	
BL-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-5	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-6	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-13	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-14	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-17	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-18	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-19	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-20	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum

BL=Bacteria ácido láctica

Tabla N° 06.B. Identificación de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.

Cepa	Gas	Glucniatc	Fermentación de carbohidratos														Especie			
			Ar	Cel	Eru	Gal	Glu	Lac	Mal	Mnt	Man	Raf	Sal	Sor	Sac	Xyl		Alm	Inu	
BL-21	..	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-22	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-23	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-25	+	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-26	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-27	-	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-29	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-30	+	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-31	+	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-32	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-33	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-34	+	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-35	..	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-36	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-37	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum

BL=Bacteria ácido láctica

Tabla N° 06.C. Identificación de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.

Cepa	Gas	Gluconato	Fermentación de carbohidratos														Especie			
			Ar	Cel	Fru	Gal	Glu	Lac	Mal	Mnt	Man	Raf	Sal	Scr	Sac	Xyl		Alm	Inu	
BL-38	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-39	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-40	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	Leuconostoc mesenteroides
BL-41	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leuconostoc mesenteroides
BL-42	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-43	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-44	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-45	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-46	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-47	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-48	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-49	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-50	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-51	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-52	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-53	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus maltaromicus
BL-54	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum
BL-55	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactobacillus plantarum

BL=Bacteria ácido láctica

Anexo N° 04

Tabla N° 08. Análisis de varianza para diámetro de halos de inhibición de las bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, comparando cuatro cepas patógenas, Ayacucho-2009.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Antagonismos con <i>Escherichia coli</i> (mm)	Inter-grupos	3038,267	54	56,264	618,906	,000
	Intra-grupos	10,000	110	,091		
	Total	3048,267	164			
Antagonismos con <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	Inter-grupos	4914,812	54	91,015	2502,914	,000
	Intra-grupos	4,000	110	,036		
	Total	4918,812	164			
Antagonismos con <i>Candida albicans</i> (mm)	Inter-grupos	2586,279	54	47,894	718,411	,000
	Intra-grupos	7,333	110	,067		
	Total	2593,612	164			
Antagonismos con <i>Salmonella typhimurium</i> (mm)	Inter-grupos	3647,067	54	67,538	928,651	,000
	Intra-grupos	8,000	110	,073		
	Total	3655,067	164			

Tabla N° 09. Análisis de varianza y comparación de medias mediante Tukey para la densidad de bacterias lácticas *in vivo* aisladas de chicha de molle evaluadas en el intestino de *Rattus norvegicus* "rata" a los 21 días de administrado, Ayacucho-2009.

N° bacterias lácticas en intestino (UFC/mL)

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5,814E+051	9	6,459E+050	9689,193	,000
Intra-grupos	1,333E+048	20	6,667E+046		
Total	5,815E+051	29			

Tabla Nº 10. Análisis de varianza y comparación de medias mediante Tukey para la ganancia de peso de *Rattus norvegicus* Ayacucho-2009.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5191,786	9	576,865	14,286	,000
Intra-grupos	807,593	20	40,380		
Total	5999,379	29			

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
Control	3	15,515667		
Yacón	3	15,731533		
Cepa 3	3	18,928533		
Cepa4	3	19,920833		
Cepa 2	3	20,830733		
Cepa 1	3	27,635567	27,635567	
Cepa 1 + yacón	3		43,278067	43,278067
Cepa 3 + yacón	3		44,575200	44,575200
Cepa2 + yacón	3			46,100267
Cepa 4 + yacón	3			48,857467
Sig.		,409	,086	,982

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo Nº 05

Tabla Nº 11. Estandarización de la carga microbiana de bacterias lácticas, Ayacucho-2009.

	Cepas	Carga microbiana (UFC / mL de inóculo)
Bacterias	<i>Salmonella typhimurium</i>	10^{14}
	<i>Escherichia coli</i>	10^{11}
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{14}
	<i>Bacteria láctica aislada</i>	10^{18}
Levadura	<i>Candida albicans</i>	10^{12}

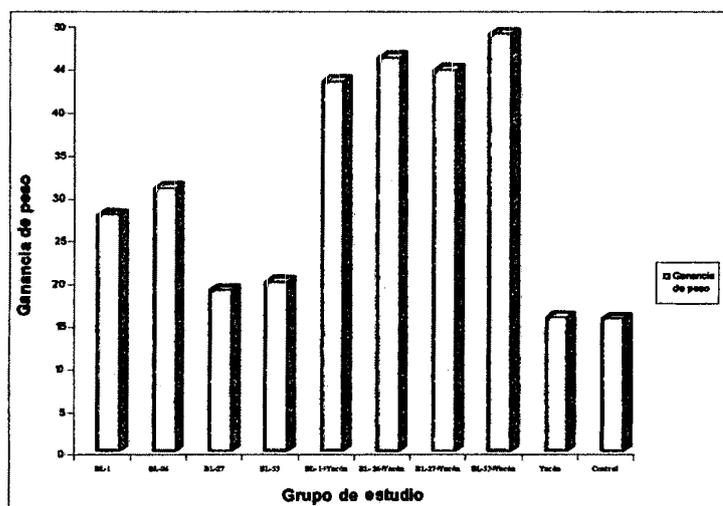
Anexo N° 06

Tabla N° 03. Densidad poblacional de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle evaluadas en el intestino de *Ratus norvergicus* "rata" a los 21 días de administrado, Ayacucho-2009.

Grupo de estudio	UFC/mL
BL-1	60x 10 ¹⁹
BL-26	50x 10 ¹⁹
BL-27	60x 10 ¹⁹
BL-53	70x 10 ¹⁹
BL-1+ Yacón	20x 10 ²⁴
BL-26+ Yacón	30 x 10 ²⁴
BL-27 + Yacón	20 x 10 ²⁴
BL-53+ Yacón	30 x 10 ²⁴
Yacón	50 x 10 ¹⁴
Control	50 x 10 ¹⁴

La codificación BL-1=*Lactobacillus plantarum*, BL-26=*Lactobacillus maltaromicus*, BL-27=*Lactobacillus plantarum* y BL-53=*Lactobacillus maltaromicus*

Anexo N°07



La codificación BL-1=*Lactobacillus plantarum*, BL-26=*Lactobacillus maltaromicus*, BL-27=*Lactobacillus plantarum* y BL-53=*Lactobacillus maltaromicus*

Gráfico N° 03: Ganancia de peso de *Rattus norvergicus* "rata" sometidas a cuatro cepas de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009.

Anexo N° 09
MATRIZ DE CONSISTENCIA
TEMA: Capacidad probiótica de bacterias lácticas asiladas de la chicha de molle, Ayacucho-2009
ASESORA: Mg. Paula García Godos Alcázar
AUTOR: Bach. Jhanina Rodríguez Carrasco

Problema	Objetivos	Hipótesis	VARIABLES	Marco teórico	Metodología
¿Las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle presentarán capacidad probiótica	<p>OBJETIVO GENERAL Evaluar la capacidad de las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle. 2. Evaluar la capacidad probiótica <i>in vitro</i> de las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle. 3. Evaluar la capacidad probiótica <i>in vivo</i> de bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle en <i>Ratus norvegicus</i> "rata"</p>	<p>Las bacterias lácticas aisladas de la chicha de molle del departamento de Ayacucho presentan una buena capacidad probiótica</p>	<p>Variable independiente: Bacterias lácticas</p> <p>Variable dependiente: Capacidad probiótica</p>	<p>Por la reciente preocupación mundial sobre asuntos de salud y la alimentación, los alimentos funcionales tienen un papel importante en la industria alimentaria por tanto se necesita explorar procesos nuevos. Así el concepto de alimentos funcionales incluye los ingredientes alimenticios que necesita para función nutritiva básica, ejercen un efecto beneficioso en la salud o reducen el riesgo de enfermedades (Chávez, 1977).</p> <p>Los alimentos fermentados como la chicha de molle podrían ser consideradas como alimentos o comidas funcionales contienen microorganismos beneficiosos como bacterias lácticas que tienen comportamiento probiótico que es definida como un suplemento microbiano que sirve como dispositivo alimenticio, tiene efectos beneficiosos en el hospedero mejorando su balance microbiano intestinal. Las bacterias lácticas introducidas en el sistema digestivo pueden mejorar el equilibrio de la microflora del aparato gastrointestinal y se entregan a menudo por productos lácteos fermentados (Torija, 2001).</p> <p>De esta manera la chicha de molle ayudaría a solucionar problemas intestinales producidos por patógenos, aumentando la población benéfica de microflora intestinal, favorecen una buena digestión, potencian el sistema inmunológico y aumenta la resistencia a las infecciones. (Beltrán, 2002).</p>	<p>Para el desarrollo de esta investigación se usarán muestras provenientes de lugares donde elaboran chicha de molle de manera artesanal este muestreo se realizará en las provincias y comunidades de Huamanga y Huanta del Departamento de Ayacucho. Para la identificación de cepas de bacterias lácticas, se realizará aislamiento directo en agar lactobacilli e incubación a 37°C por 24 horas. Así mismo se realizará el aislamiento por enriquecimiento en caldo lactobacilli para su luego realizar ceparios. Se identificarán las bacterias lácticas como tal realizando coloración Gram y pruebas bioquímicas como catalasa, producción de gas y glucanato así como la capacidad fermentativa a diferentes carbohidratos. Se realizará un prueba de antagonismos para cual se reactivarán las cepas patógenas como: <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> en caldo nutritivo y <i>Candida albicans</i> en caldo sabouraud sembrar una asada e incubar a 37°C por 24 horas, procedimiento simultaneo a la reactivación de la cepa. Con la ayuda de un sacabocado colocar cilindros con BAL e incubar a 37°C por 24 horas. Se procederá a elaborar la bebida probiótica usando yacón y posteriormente se adicionarán cepas con capacidades probióticas. Para el comportamiento probiótico <i>in vivo</i> se realizarán ensayos con ratas a los cuales se les suministrará la bebida intraperitonealmente al cabo de los 21 días se sacrificará al animal se extraerá el intestino delgado, se lavará con agua peptonada y se realiza sembrados en agar lactobacilli para su posterior recuento.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS R. D. N° 210-2011-FCB-D

Bach. Jhanina Rodríguez Carrasco

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día doce de agosto del dos mil once, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas, reunidos para asistir al acto de sustentación de tesis, bajo la Presidencia del Dr. Víctor H. Alegría Valeriano en su condición de Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, como Secretario Docente Mg. Aurelio Carrasco Venegas y con la asistencia de los miembros del jurado calificador el Mg. Víctor L. Cárdenas López, Blga. Sonia H. Palomino Felices, Mg. Aurelio Carrasco Venegas (miembros) y Mg. Paula García Godos Alcázar (Asesora) para administrar la sustentación de tesis: Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, Ayacucho-2009, presentado por la Bach. Jhanina Rodríguez Carrasco, quién pretende optar el Título profesional de Bióloga con mención a la especialidad de Biotecnología.

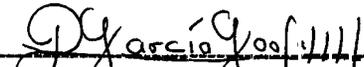
El Decano inicia el acto de sustentación verificando la documentación pertinente que obra en la mesa, dando la conformidad correspondiente, luego dirigiéndose a la sustentante da las recomendaciones correspondientes conforme a lo establecido en el Reglamento General.

La sustentante expone el trabajo de investigación haciendo uso de medios audiovisuales en el tiempo correspondiente, luego el Decano inicia la segunda etapa del acto de sustentación en la que los miembros del jurado calificador realizan las observaciones y preguntas que consideren pertinentes para realizar las calificaciones correspondientes. Culminado esta etapa el Decano solicita a la sustentante y público asistente a abandonar el Auditorium a fin de que el jurado calificador pueda deliberar y emitir la evaluación correspondiente, el cual es como sigue:

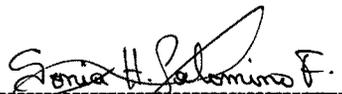
JURADO CALIFICADOR	EXP.	RPTA A PREGUNT.	PROM
Mg. Víctor L. Cárdenas López	16	16	16
Mg. Aurelio Carrasco Venegas	18	16	17
Mg. Paula García Godos Alcázar	18	17	18
Biga. Sonia H. Palomino Felices	18	18	18
		PROMEDIO	17



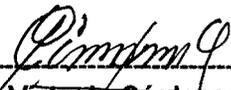
Dr. Víctor Alegría Valeriano
(Presidente)



Mg. Paula García Godes Alcázar
(Miembro- Asesora)



Blga. Sonja H. Palomino Felices
(Miembro)



Mg. Víctor L. Cárdenas López
(Miembro)



Mg. Aurelio Carrasco Venegas
(Miembro – Sec. Docente)