



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR

“Efecto bactericida de diferentes poblaciones de (*Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*) sobre una población de (*Escherichia coli* ATCC 25922TM) inoculado en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR

AUTOR:

Risco Torres, Henry Yony

ASESOR:

MSc. Ing. León Marrou, María Elena

LINEA DE INVESTIGACION:

Inocuidad Alimentaria

TRUJILLO - PERÚ

2015

Título de Tesis: Efecto bactericida de diferentes poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre una población de *Escherichia coli* ATCC 25922tm inoculado en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento

Henry Yony, Risco Torres

Autor

Presentada a la Escuela de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior de la Universidad César Vallejo para su aprobación.

MSc. Ing. Hubert Luzdemio Arteaga Miñano

Presidente

MSc. Ing. Jesús Sánchez González

Secretario

MSc. Ing. María Elena Marrou León

Vocal

TRUJILLO – PERÚ 2015
DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo Henry Yony, Risco Torres con DNI N° 46433722, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Registro de Grado y Título de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica. Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces. En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, Diciembre del 2015

Risco Torres, Henry Yony

DNI: 46433722

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y fiel compañero, por hacer que retome la calma y tranquilidad cuando las cosas salían fuera de sitio.

A mis padres Carlos Risco y María Torres, por todo el sacrificio realizado para hacerme tomar un buen camino y sacarme adelante.

Por haber apostado y confiado en que este día llegaría.

A mis hermanos Yaneth, Deysi y Elvis, por la paciencia, cariño y confianza, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi sobrina Gimena Baez, que me dio motivación para poder culminar con éxito este trabajo de investigación, espero verla realizada profesionalmente. Le dejo esta investigación para que le sirva de guía rumbo a su camino profesional.

Risco Torres Henry Yony

AGRADECIMIENTO

A mi asesora MSc. Ing. León Marrou, María Elena, directora de escuela de Ingeniería agroindustrial y comercio exterior de la universidad César Vallejo, con quien emprendimos este trabajo desde el proyecto hasta hacerlo realidad y por todo el apoyo brindado en todas las etapas de este trabajo de investigación.

A la MSc. Ing. Lescano Bocanegra Leslie, docente de la escuela de Ingeniería agroindustrial y comercio exterior de la universidad César Vallejo por el apoyo y tiempo brindado, dada su

experiencia en productos lácteos me oriento y apoyo en todas las etapas del proceso de elaboración del queso mantecoso.

Al Dr. Blgo. Gonzalez Cabeza, José por el apoyo incondicional recibido, su confianza y predisposición prestada desde el primer día de trabajo, por permitirme aprender más de lo que exigió la investigación, por ser maestro, guía y amigo. Así como permitirme el acceso y disponibilidad de materiales del Laboratorio de investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo.

Al Mblgo. Ávila Vereau Elio, profesor de la facultad de Medicina de la universidad privada Antenor Orrego, porque gracias a él pude resolver algunos problemas que se me presentaron en la investigación, me brindó su apoyo incondicional dada su experiencia en el tema, me brindo su confianza y se convirtió en un buen amigo.

A la Dra. Lic. Yupari Azabache Irma, docente de estadística y coordinadora en el equipo de dirección de investigación de la universidad César Vallejo, por el apoyo brindado al momento de realizar el análisis estadístico del presente trabajo de investigación, dada su experiencia como profesional en estadística e investigación.

Al Tec. Teran Rojas Alexander, laboratorista responsable del laboratorio de investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo, quien siempre me brindo sus consejos y apoyo constante.

Risco Torres Henry Yony

PRESENTACIÓN.

Señores Miembros del Jurado:

En cumplimiento con las disposiciones vigentes del reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad César Vallejo de Trujillo, someto a su consideración y elevado criterio el presente informe de Tesis titulado:

“Efecto bactericida de diferentes poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre una población de *Escherichia coli* ATCC 25922™ inoculados en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento”

Es propicia esta oportunidad para manifestar nuestro sincero reconocimiento a nuestra alma Mater y toda su plana docente, que con su capacidad y buena voluntad contribuyeron a nuestra formación profesional.

Trujillo, Diciembre del 2015

ÍNDICE

RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Realidad Problemática.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2 Trabajos previos.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3 Teorías relacionadas al tema.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1 Información general del queso.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2 Queso mantecoso.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.3 Enfermedades transmitidas por Alimentos.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.4 Bacterias ácido lácticas.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.5 <i>Lactobacillus casei var. Rhamnosus</i>	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Formulación del problema.....	13
1.5 Justificación del estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
1.6 Hipótesis.....	14
1.7 Objetivos.....	14
1.7.1 General.....	14
1.7.2 Específicos.....	14
II. MÉTODO.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Metodología.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1 Proceso de elaboración de queso mantecoso.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos aplicados a la leche fresca. ¡Error!	¡Error!
Marcador no definido.	
1.3.3 Activación y estandarización de cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592¡Error!	¡Error!
Marcador no definido.	
1.3.1 Activación y estandarización de cepa <i>Lactobacillus casei var Rhamnosus</i> ¡Error!	¡Error!
Marcador no definido.	
1.3.2 Inoculación de cepas experimentales en el queso mantecoso.¡Error!	¡Error!
Marcador no definido.	
1.3.3 Recuento en placa de <i>Escherichia coli</i>	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Diseño de investigación.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5 Variables.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.1 Variable dependiente:.....	14
1.5.2 Variable independiente:.....	14
1.6 Diseño experimental.....	17

1.6.1 Operacionalización de variables	¡Error! Marcador no definido.
1.7 Población y muestra.....	18
1.7.1 Población.....	18
1.7.2 Muestra.....	18
1.8 Técnica e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	18
1.8.1 Técnica.....	18
1.8.2 Instrumentos de recolección de datos.....	18
1.8.3 Métodos de Análisis de datos.....	18
II. RESULTADOS.....	19
2.3 Calidad de leche entera cruda.....	19
2.4 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en muestra testigo (MT)	19
2.5 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en muestra 1 (M1)	20
2.6 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en muestra 2 (M2)	21
2.7 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en muestra 3 (M3)	21
2.8 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en muestra 1, 2 ,3 y MT.....	22
2.9 Evaluación estadística.....	22
2.9.1 Análisis de la varianza de un factor (anova)	22
2.9.2 Pruebas post hoc HSD de Tukey.....	23
2.9.3 Sub conjuntos homogéneos HSD de Tukey	23
III. DISCUSIONES	24
IV. CONCLUSIONES.....	29
V. RECOMENDACIONES.....	29
VI. REFERENCIAS	30
ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición nutricional de algunas variedades de queso	6
TABLA 2. Según su consistencia y características de maduración.....	6
TABLA 3. Declaración del contenido de grasa láctea	7
TABLA 4. Valor nutricional del queso mantecoso	7
TABLA 5. Producción de queso mantecoso por año	8
TABLA 6. Criterios de calidad microbiológica para queso mantecoso.....	8
TABLA 7. Parámetros que regulan el desarrollo de <i>Escherichia coli</i>	10
TABLA 8. Operacionalización de variables a estudiar	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 9. Control de calidad fisicoquímica y microbiológica de leche entera cruda.....	19
TABLA 10 Análisis de varianza	23
TABLA 11. Prueba de rango post hoc de comparaciones múltiples	23
TABLA 12. Subconjuntos homogéneos HSD de Tukey	24
TABLA 13. Recuento de <i>Escherichia coli</i> en queso mantecoso.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Flujograma de elaboración de queso mantecoso .¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
FIGURA 2. Diseño experimental de la investigación	17
FIGURA 3. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> inoculado en muestra testigo	20
FIGURA 4. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> inoculado en muestra 1 de queso mantecoso	20
FIGURA 5. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> inoculado en muestra 2 de queso mantecoso.....	21
FIGURA 6. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> inoculado en muestra 3 de queso mantecoso.....	21
FIGURA 7. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> inoculado en MT, M1, M2 y M3.....	22
FIGURA 8. Diagrama referencial para el desarrollo de la investigación	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Determinación del porcentaje de grasa por la técnica gerber (NTP 202.028:1998)..	37
ANEXO 2. Determinación de la densidad por el método de lactodensímetro(NTP:202.028:1998)	37
ANEXO 3. Determinación de la acidez por el método volumétrico (NTP: 202. 116: 2000)	38
ANEXO 4. Prueba de la reductasa con azul de metileno (NTP: 202. 014: 1998)	38
ANEXO 5. Recuento de escherichia coli (ufc/g) queso mantecoso durante 15 días a 8 °C.....	40
ANEXO 6. Escala nefelométrica de MC Farland	41

ANEXO 7. Diagrama referencial para el desarrollo de la investigación	42
ANEXO 8. Imágenes del desarrollo de la investigación	43

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto bactericida de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre *E. coli* en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio, para lo cual se utilizó el método de recuento en placa y los resultados se expresaron en UFC/g. Se trabajaron tres ensayos problema y uno control, donde se adicionó al queso mantecoso en la etapa del amasado por separado tres poblaciones iniciales de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* (10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/mL) sobre una población inicial de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) en cada ensayo problema, mientras que para el grupo control solo se inoculó una población inicial de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) para comparar el crecimiento con cada ensayo del grupo problema. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 8 ± 2 °C por 15 días, realizándose análisis microbiológicos a diario. El método de recuento bacteriano en placa permitió conocer que la población inicial de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* agregada al queso mantecoso en la etapa del amasado, ejerció un efecto bactericida sobre la población 10^3 UFC/mL de *E. coli* puesto que redujo a dicha bacteria hasta una población de 10 UFC/g en el día 15 de la investigación.

Palabras clave: Queso mantecoso, *L. Rhamnosus*, *E. coli*, bactericida, población.

ABSTRACT

The present research aims to determine the bactericidal effect of *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* About *E. coli* in buttery cheese made in laboratory conditions. For which is the method used in plate count and the results expressed in UFC / g.

Three trials control problem one worked and where the buttery cheese added at the stage of mixing three separate populations of *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* (10^3 , 10^6 and 10^9 CFU / ml) in a population of *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) in each problem test, while control group para Lone population of *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/ mL) Compare for Growth Problem With each test group. Samples Were stored a temperature 8 ± 2 ° C for 15 days, microbiological analyzes carried out daily. Method of bacterial plate count allowed to know that the population 10^9 UFC/mL of *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* bactericidal effect exerted on Population 10^3 UFC/mL of *E. coli* since Bliss bacteria reduced to a population of 10 UFC/ g is the 15th Research.

Keywords: Quesi mantecoso , *L. rhamnosus* , *E. coli* , bactericide, Population

I. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria se relaciona directamente con la protección de la salud de los consumidores, para tal fin se debe garantizar la inocuidad de los alimentos evaluando y analizando la calidad microbiológica de los microorganismos indicadores de alteración, higiene y patógenos de los alimentos que son analizados para evaluar y dar resultados sobre criterios microbiológicos (NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01.2008).

El queso mantecoso es rico en vitaminas, proteínas y minerales que son requeridos para nuestra alimentación y el buen funcionamiento de nuestros sistemas; sin embargo, los quesos mantecosos artesanales también son los de mayor riesgo potencial de intoxicación e infecciones alimentarias, debido a que en la producción muchas veces se utiliza materia prima contaminada con bacterias como *Escherichia coli* ó son manipulados en condiciones antihigiénicas. Los nutrientes que contiene permiten un rápido crecimiento de los microorganismos que alteran los alimentos y generan un riesgo para el consumidor, es por ello la preocupación de asegurar la inocuidad del mismo.

El *Lactobacillus rhamnosus* aporta no solo ácido láctico al alimento si no también bacteriocinas que de acuerdo a la población en el producto podría otorgar efectos bactericidas sobre *Escherichia coli*, responsables de infecciones alimentarias y del deterioro acelerado del alimento. La adición de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* en la producción de queso mantecoso regula la carga inicial de bacterias presentes en el producto, mejorando la condición sanitaria del queso, permitiendo que no se utilice conservantes ni preservantes, prolongando el periodo de almacenamiento del producto.

En la presente investigación se usó *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus*, quien posee la capacidad de producir bacteriocinas, como principal producto bactericida. La presencia de este antibacteriano inhibe y controla el crecimiento del *Escherichia coli* ATCC 25922 presente en el queso mantecoso

El problema que realmente existe es la presencia de *Escherichia coli* en quesos mantecosos artesanales que se producen en la provincia de Trujillo, departamento de La Libertad por ser un alimento altamente perecedero debido a su elaboración, composición y comercialización en condiciones inadecuadas.

Los quesos elaborados artesanalmente, han sido causa frecuente de diversas infecciones alimentarias, cuando son consumidos después de estar expuesto a condiciones no apropiadas durante su proceso de elaboración o en el almacenamiento. Estas enfermedades alimentarias son producidas principalmente por microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *coliformes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros consideradas entre las principales causas de intoxicación alimentaria a nivel mundial y substancialmente en Latinoamérica y el Caribe (Caldaz, 2008; Díaz-Rivero y González, 2001; Cristóbal y Maurtua 2003; Espinoza, 2003; Mercado, 2007; Citado por Acevedo et al., 2013).

El efecto de esta situación puede ocasionar enfermedades de transmisión alimentaria (ETA'S), como gastroenteritis por *Escherichia coli* (enterohemorrágica), una enfermedad caracterizada por una abundante diarrea de carácter hemorrágico, dolores abdominales, fiebre y en los casos más severos, la toxina puede provocar anemia e insuficiencia renal.

De lo anteriormente expuesto esta investigación propone contrarrestar las causas de diversas infecciones alimentarias producidas por *Escherichia coli*, inoculando el probiótico *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* en el proceso de elaboración del queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio, lo que permitirá crear un efecto bactericida contra *Escherichia coli*.

Arias et al., (2013) probaron la eficiencia de las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* para antagonizar los patógenos resistentes a antibióticos *Salmonella enteritidis* var *Thyphimurium* y *Escherichia coli* O157:H7. Las tres cepas probióticas mostraron poseer un efecto antagónico contra las cepas patógenas *Salmonella Thyphimurium* y *E. coli* O157:H7 resistentes a antibióticos. En la prueba de "Well Diffusion", *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* presentaron reducciones estadísticamente semejantes entre ellas ($P > 0.05$) de 37-41 mm

para *E. coli* O157:H7 y de 32 – 41 mm para *Salmonella Thyphimurium*, mientras que *B. animalis* mostró reducciones menores (P0.05).

Del Campo et al., (2008) aislaron 350 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir de 35 muestras de quesos frescos, fueron probadas en contra de cuatro microorganismos patógenos, tres Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) y un Gram- (*Salmonella agona*). Sólo 25 cepas mostraron capacidad antagónica, el mayor efecto inhibitor fue debido al pH, por la producción de ácidos orgánicos. 8 de ellas, mostraron un efecto inhibitor diferente al pH, Todas las cepas mostraron actividad antagónica en contra de bacterias Gram+. *Salmonella Agona*, no fue inhibida en su desarrollo, por ninguna de las cepas de bacterias ácido lácticas. Tres cepas que mostraron inhibición con el sobrenadante, se trataron con enzimas proteolíticas, y se determinó que el factor inhibitor es de origen proteico.

Durán et al., (2010) realizaron ensayos en quesos de capa dando como resultado que estaban contaminados con *Escherichia coli*, un indicador de contaminación fecal, además evidenciaron una manipulación higiénica deficiente durante la elaboración del producto, en cuanto a los resultados del espectro inhibitorio demostraron la sensibilidad de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*), frente a *Lactobacillus*. Las bacteriocinas ejercieron su poder antimicrobiano ante microorganismos relacionados o presentes en su ambiente, disminuyendo la presencia de causantes del deterioro y/o de patógenos en los alimentos.

Roldán et al., (2011) demostraron que la cepa de *L. casei* ensayada podría ser utilizada como herramienta biotecnológica útil para impedir el desarrollo de *E. coli* O157:H7 en caso de contaminación de un producto alimentario, especialmente cárnico, con este patógeno, como también han informado previamente otros investigadores. Estos resultados fueron alentadores, ya que cepas de BAL aisladas a partir de un ecosistema regional, pueden convertirse en una herramienta biotecnológica útil para controlar *E. coli* O157:H7 en la producción de alimentos seguros, libres de patógenos emergentes. Además, esta potencial aplicación en la biopreservación alimentaria podría lograrse tanto mediante la incorporación del sobrenadante libre de células (SLC) a diferentes matrices alimentarias o a películas poliméricas comestibles utilizadas para el envasado de alimentos, mediante la integración de las cepas de BAL seleccionadas a los fermentos utilizados en la elaboración de alimentos tales como productos cárnicos, lácteos o vegetales fermentados.

Fernández *et al.*, (2014) caracterizaron investigaciones sobre metabolitos inhibidores de crecimiento microbiano y concluyeron en que el efecto inhibitorio de las bacteriocinas depende del tipo de bacteriocina, de la matriz alimentaria, de las condiciones del experimento y del microorganismo a inhibir; una de las principales dificultades para utilizar bacteriocinas para la inhibición de microorganismos en alimentos son los costos en cuanto a la producción, su poca termotolerancia y su espectro antibacterial, lo cual varía dependiendo de la bacteriocina. Observaron en los resultados de estudios realizados, la importancia de utilizar las bacteriocinas en los productos alimenticios, ya que pueden aplicarse directamente sobre el alimento e incluirse en la formulación del producto, sin alterar las características sensoriales.

Gutiérrez y Acosta, (2008) encontraron que *Lactobacillus casei* presentó actividad antagónica contra *E. coli*, pues la zonas de inhibición leídas como variable de respuesta fueron mayores de 2 mm hasta en la dilución 10^{-3} en tres ensayos realizados en el tiempo, sin embargo en el día 15 la actividad bactericida del extracto disminuyó considerablemente con respecto a la del día 5. Los análisis de Unidades de Actividad mostraron que el extracto de este aislado es activo aun en diluciones altas, lo cual significa que los extractos tiene actividad aun a muy pequeñas concentraciones. El aislado nativo de *L. casei* produjo sustancias antimicrobianas contra bacterias Gram negativa como *E. coli* pudiendo utilizarse probablemente como un bioconservante natural en alimentos.

Larrea *et al.*, (2007) determinaron el efecto bacteriostático y bactericida del *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de esta cepa en condiciones de laboratorio, encontrado que para obtener un efecto bacteriostático del *Lactobacillus casei* sobre el *Escherichia coli* se necesita un CMI de 64 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que para obtener un efecto bactericida se necesitó un CMB de 256 $\mu\text{L}/\text{mL}$ capaz de lograr una lisis celular y una reducción del 99.99% de la población inicial.

Álvarez (2011) realizó un estudio de la aplicación de las concentraciones de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ inoculadas al queso fresco, determinó que es necesario la presencia de esta bacteria en poblaciones por encima de 10^6 UFC/mL para obtener un efecto considerable en la inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922™. Siendo así, la inoculación de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus casei* al queso fresco, permitió controlar la población presente de *Escherichia coli* ATCC 25922™ durante los 10 días de experimentación mostrando un efecto bacteriostático. Mientras que la inoculación de 10^9 UFC/mL de

Lactobacillus casei ATCC 393™, permitió la reducción poblacional de *Escherichia coli* ATCC 25922™ presente en el producto hasta valores permitidos por la NTS N° 071 DIGESA/MINSA, mostrando un efecto de tipo bactericida.

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

(a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada /descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o (b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a). (Codex Alimentarius, 2011).

El queso contiene de forma concentrada la mayoría de los nutrientes de la leche, con excepción de la lactosa. Esto se debe en gran parte a la pérdida de agua que se produce durante la elaboración del queso.

La hidrólisis de la caseína en productos intermedios aumenta la digestibilidad de la proteína. Los procesos tecnológicos empleados en la elaboración del queso no alteran el valor nutritivo de la proteína de la leche. El contenido en minerales del queso es mayor que en la leche, destacando la cantidad de calcio, que en quesos maduros puede ser de alrededor de 10 veces mayor. También destacan los contenidos de fósforo y cinc. La biodisponibilidad de todos estos minerales no se ve afectada por los procesos de elaboración del queso. El contenido en vitaminas hidrosolubles de los distintos quesos es variable en función de las pérdidas en el suero y de la síntesis y utilización por los microorganismos. Mataix *et al.*, (1994); citado por Gil (2010).

Tabla 1. Composición Nutricional de algunas variedades de queso

NUTRIENTE/100G	BURGOS	PARMESANO	BOLA	BRIE	CAMEMBERT	GRUYERE	MANCHEGO
Energía (kcal)	174	393	349	319	297	401	420
Proteína (g)	15	40	29	19,3	20,9	29	32
Grasa (g)	11	25	25	26,9	23,7	31	32
Hidratos de carbono (g)	4	2	2	Trazas	Trazas	1,5	1
Ca (mg)	186	1.350	760	540	350	850	1.200
P (mg)	600	990	520	390	310	600	550
Zn (mg)	0,5	4	4	2,2	2,7	4	4
Na (mg)	1.200	760	980	700	650	610	670
K (mg)	200	150	160	100	100	120	80
Vitamina B12 (µg)	0,5	1,5	1,4	1,2	1,1	1,5	1,5
Vitamina B2 (mg)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,3
Vitamina A (mg) (Equivalentes de retinol)	320	343	305	285	230	159	357
Niacina (mg) (Equivalente de niacina)	1,2	1,1	5,9	5	5,9	6	8,2

Fuente: *Mataix et al., (1994); citado por Gil (2010)*

Clasificación de los quesos

Los quesos se clasifican de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos:

Según el contenido de humedad.

Tabla 2. Según su consistencia y características de maduración.

HSMG %	Denominación	Características de maduración
< 51	Extraduro	Madurado
49-56	Duro	Madurado por mohos
54-69	Firme/Semi duro	No madurados/Frescos
> 67	Blando	En salmuera

Fuente: Codex alimentarius, (2011)

1.3.1.1.1 Según el contenido de grasa láctea:

Deberá declararse en forma aceptable el contenido de la grasa de la leche en el país en que se vende al consumidor final, bien sea, I) como porcentaje por masa, II) como porcentaje de grasa en el extracto seco, o III) en gramos por ración cuantificada en la etiqueta, siempre que se indique el número de raciones.

Tabla 3. Declaración del contenido de grasa láctea

Extra graso	si el contenido de GES es superior o igual al 60%
Graso	si el contenido de GES es superior o igual al 45 % e inferior al 60 %
Semigraso	si el contenido de GES es superior o igual al 25 % e inferior al 45 %
Semidesnatado (Semidescremado)	si el contenido de GES es superior o igual al 10 % e inferior al 25 %
Desnatado (Descremado)	si el contenido de GES es inferior al 10 %

Fuente: Codex Alimentarius, (2011)

El queso mantecoso o cremoso es aquel blando del tipo fresco, no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa, de textura homogénea, cremosa, no granulada, preparado a partir de crema sola o mezclada con leche y cuajada con cultivos lácticos y opcionalmente con adición de enzimas. Los quesos deberán elaborarse exclusivamente con leche pasteurizada y bajo estrictas condiciones higiénico-sanitarias. La apariencia, textura, color, olor y el sabor de los quesos deberán ser los característicos y deberán estar libres de sustancias y caracteres sensoriales extraños. La grasa y las proteínas lácteas de los quesos frescos no podrán ser sustituidas por elementos de origen no lácteo. El queso mantecoso es definido por el instituto de investigación de tecnología industrial y de normas técnicas, como producto fresco, de pasta blanda y mantecoso, elaborado con leche entera y reconstituida, pasteurizada o no, que presenta una pasta de textura cerrada y consistencia suave, color blanco o ligeramente amarillento (Cuevas, 2004).

Valor nutricional del queso mantecoso por 100gr

Tabla 4. Valor nutricional del queso mantecoso

Nutrientes	Cantidad
Energía(kcal)	396
Proteína(g)	28
Grasa Total (g)	30
Glúcidos(g)	3.30
Calcio (mg)	1076
Hierro (mg)	1.50

Fuente: Fundación universitaria iberoamericana, (2012)

Según el MINAGRI/SIEA, la producción de queso mantecoso a nivel nacional en el año 2013, según ubicación de las plantas fue 882.74 Toneladas y la venta 878.74 Toneladas, a nivel regional en la libertad el año 2012 la producción de Queso mantecoso fue 0.21 Toneladas y la venta 0.21 Toneladas.

Tabla 5. Producción de queso mantecoso por año, según Ubicación de las plantas procesadoras: año 2012.

Departamento	Queso Mantecoso (TN)
Arequipa	0.57
La Libertad	0.21
Pasco	0.65
Puno	15.81
Cajamarca	440.42
Total	457.65

Fuente: MINAGRI/SIEA, (2012)

En cuanto a la Vida útil de queso mantecoso La temperatura de conservación es de 4 – 7 ° C. Al ser refrigerados los quesos pueden durar aproximadamente dos semanas y mucho más tiempo si son congelados (3 a 4 semanas) ITDG (2008).

Requisitos microbiológicos para el queso mantecoso.

Tabla 6. Criterios de calidad microbiológica para queso mantecoso

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	C	Límite por g.	
					m	M
<i>Coliformes</i>	5	3	5	2	5x10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	----
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	----

Fuente: NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01. (2008)

Las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y el agua causan la muerte de 2 millones de personas al año, en su mayoría niños.

La inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están inextricablemente relacionadas.

Los patógenos de transmisión alimentaria pueden causar diarrea grave o infecciones debilitantes, como la meningitis. La contaminación por sustancias químicas puede provocar intoxicaciones agudas o enfermedades de larga duración, como el cáncer. Las enfermedades transmitidas por los alimentos pueden causar discapacidad persistente y muerte. Algunos ejemplos de alimentos insalubres son los alimentos de origen animal no cocinado, las frutas y hortalizas contaminadas con heces y los mariscos crudos que contienen biotoxinas marinas (OMS, 2014).

El género *Escherichia* consta de al menos cinco especies, siendo *Escherichia coli* la que se aísla con más frecuencia. *E. coli* fue descubierto en 1885 por Theodor Escherich, quien lo denominó inicialmente *Bacterium coli* y forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* y está presente en gran cantidad en el tracto gastrointestinal y es la enterobacteria que con más frecuencia causa pielitis, pielonefritis, endocarditis, sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infección del tracto urinario y gastroenteritis entre los viajeros que visitan países con deficientes condiciones sanitarias; además ciertos serotipos producen en los niños una diarrea epidémica grave y a veces mortal. Son la causa de la diarrea de verano esporádica, no epidémica, en niños durante el segundo y tercer veranos de su vida. Este tipo de diarrea está causada por productos metabólicos irritantes producidos por el colibacilo y no por verdadera infección (Méndez, 2005).

Morfología.

Escherichia coli es un bacilo grueso, corto de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 micras de longitud. Fermentan la glucosa, lactosa, maltosa y otros azúcares con producción de ácido y gas. Alrededor del 50% de las cepas fermentan sacarosa; a éstas se les denomina *E. coli communitis*, mientras que el otro 50% que no fermentan este azúcar se les llama *E. coli mommunis*. El ácido formado por la fermentación de los carbohidratos es principalmente ácido láctico con pequeñas cantidades de ácidos fórmico y acético. Se producen bióxido de carbono e hidrógeno en cantidades aproximadamente iguales (Méndez, 2005).

Escherichia coli es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria (OMS, 2015).

Las cepas de *E. coli* poseen una serie de factores de virulencia de los que carecen las cepas no patógenas de *E. Coli*, así las primeras pueden adherirse a las células humanas, pueden invadir los tejidos humanos y pueden producir toxinas. Según que tipo de factores de virulencia posea una determinada cepa patógena, las que afectan el tracto intestinal pueden clasificarse en cepas enterotoxígenas, enteroinvasivas y enteropatógenas. Las cepas enterotoxígenas de *E. coli* son la causa principal de la diarrea del viajero y de las diarreas infantiles en países en vías de desarrollo. Estas cepas poseen adhesinas que les permiten fijarse al epitelio intestinal y además contienen plásmidos que codifican enterotoxinas que son responsables de la diarrea. Se conocen dos enterotoxinas, una que se destruye por el calor, o toxina termolábil, y otra que lo resiste, o toxina termorresistente (Ingraham *et al.*, 1998).

Todas son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas y no esporuladas. Es decir, de sencilla destrucción con el calor de la pasteurización. En la tabla mostrada a continuación podemos observar los principales parámetros que regulan el desarrollo (Michanie, 2003).

Tabla 7. Parámetros que regulan el desarrollo de *Escherichia coli*

PARÁMETRO	MÍNIMA	OPTIMA	MÁXIMA
Temperatura	7-8	35-40	44-46
pH	4.4	6 - 7	9.0
Actividad de agua (aw)	0.95	0.99	-

Fuente: Michanie, 2003

Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de la *E. coli*, y se producen cientos de muertes. En los últimos años, ha habido un aumento de los brotes con un efecto significativo en los sistemas de salud y la producción agrícola. Entre las fuentes más frecuentes de infecciones transmitidas por los alimentos figuran los productos lácteos y los zumos (jugos) no pasteurizados, la carne elaborada y cocida de manera insuficiente, las frutas y las hortalizas crudas y la manipulación y el almacenamiento insalubres de los alimentos preparados (FAO, 2015).

Existen también microorganismos que se les conoce como “ amigos”, tal es el caso de los probióticos son microorganismos vivos que se pueden formular en muchos tipos diferentes de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más utilizados como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Bacillus* se utilizan también como probióticos. Bacterias de ácido láctico (LAB), incluyendo especies de *Lactobacillus*, que han sido utilizados para la conservación de los alimentos por fermentación durante miles de años, pueden servir una doble función al actuar como agentes de fermentación de alimentos y, además, potencialmente impartir beneficios para la salud (WGO, 2011)

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (. Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009, Citado por Ramírez *et al.*, 2011).

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Camubacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weilla* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros (Bousar, Cerning y Desmazeaud, 1997; Devlieghere, Vermeiren y Debevere, 2004; Gálvez, 2007; Jagnow *et al.*, 1991, Citado por Parra, 2010).

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (produce solo ácido láctico) y heterofermentativas (produce ácido láctico y otras sustancias) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos (Bertrand *et al.*, 2003; Citado por Parra, 2010).

Producción de Metabolitos de las bacterias ácido lácticas.

Las BAL producen una serie de sustancias llamadas metabolitos que pueden cumplir funciones en los alimentos entre las que se destacan:

Sustancias antimicrobianas.

Las BAL producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes. Recientemente está demostrado que la adición de levaduras

fermentadas por *Lactobacillus plantarum* inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Vázquez y Murado, 2008; citado por Parra, 2010).

Peróxido de Hidrógeno es un componente antimicrobiano compuestos proteínicos biológicamente activos, producto del metabolismo primario y/o secundario, que tienen la capacidad de ser bactericidas o bacteriostáticos frente a microorganismos sensibles de la misma especie o estrechamente relacionados. Las bacteriocinas son compuestos sintetizados ribosomalmente producidos por bacterias con el fin de inhibir el crecimiento de otras bacterias. Estas pueden ser miradas como antibióticos, pero difieren de estos de diferentes formas: Las bacteriocinas son sintetizadas ribosomalmente, las células productoras son inmunes a estas, su estructura polipeptídica de mayor peso molecular, tienen un modo de acción diferente y tienen un espectro de acción menor por lo que solo tienen la capacidad de inhibir bacterias estrechamente relacionadas a la cepa productora (Fernández, 2000; citado en Revista Colombiana "Teoría y praxis investigativa" , 2009).

Lactobacillus rhamnosus es un componente principal de la población de *lactobacillus* que habitan naturalmente el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Mitsuoka, 1992). Este organismo ha sido estudiado extensamente y se ha encontrado que posee un número de propiedades que constituyen las bases para implementar su uso en salud y en investigación clínica (Casas *et al.*, 1998; Citado por Calderón *et al.*, 2007). Son Bacilos Gram positivos no móviles de 0.8-1.0 x 2.0-4.0 µm, extremos cuadrados, aparecen individualmente o en cadenas. Aislado de productos lácteos, aguas residuales y muestras clínicas humanas. Desde hace 20 años se emplea en productos farmacéuticos y alimenticios (De Vos *et al.*, 2009; citado por Amorocho, 2011)

Dentro de las características asociadas a esta bacteria, se encuentra que no posee actividad antimicrobiana contra otras bacterias ácido lácticas y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del ileon humano y a los productos con fibra de la dieta. También, es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares. Esta bacteria es aerotolerante, posee excelente viabilidad en yogurt durante cuatro semanas de almacenamiento a 4°C y es útil en su producción, ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas propiedades organolépticas.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aéreos*, *Bacillus seres* y *Clostridium perfringens* in vitro; así como una actividad anti-*Listeria* cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne en embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración (Citado por Calderón *et al* 2007).

L. rhamnosus Gorbach – Goldin (LGG) se multiplica en la superficie del colon y reduce el número de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal (*Salminen y Donohue, 1996; Isolauri et al 2002*). Produce una sustancia antimicrobiana que inhibe la multiplicación de enteropatógenos, incluyendo *Clostridium difficile, Salmonella, E. coli, S. aureus, C. albicans, C. perfringens* y *S. mutans* (*Bennet, 1996, Salminen y Donohue, 1996, Isolauri, et al 2002, Calderón, et al 2007, Warren, et al 2007; citado por Amorocho, 2011*).

Debido a la gran cantidad de quesos artesanales tipo mantecoso contaminados con bacterias patógenas como *Escherichia coli*, que se expenden en los mercados de la provincia de Trujillo, las enfermedades de transmisión alimentarias que causan estas bacterias patógenas en la población trujillana y pérdidas económicas de productores y comercializadores por multas y decomiso de sus productos por atentar contra la salud de los consumidores, se tiene la necesidad de buscar alternativas para contrarrestar las enfermedades de transmisión por alimentos causadas por *Escherichia coli*, y pérdidas económicas en productores y comercializadores. El único ingrediente para la producción de quesos es la leche, el cual, debido a su procesamiento, va adquiriendo una microbiota entre la que se incluyen microorganismos patógenos como *E. coli*. Considerando que el queso mantecoso es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos patógenos debido a su alto contenido en agua, pH óptimo y la gran variedad de nutrientes que éste posee. Este trabajo tiene como fin reducir el número de *Escherichia Coli*, por lo tanto prevenir las enfermedades transmitidas por esta bacteria, mediante la incorporación de diferentes concentración de *Lactobacillus casei var. Rhamnosus*.

1.1. Formulación del problema.

¿Qué población de *Lactobacillus Casei var. Rhamnosus* tendrá efecto bactericida sobre *Escherichia Coli* ATCC 25922 inoculados en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento?

1.2. Objetivos

1.2.1. General.

Determinar el efecto bactericida de diferentes poblaciones de *Lactobacillus Casei* var. *Rhamnosus* sobre una población de *Escherichia Coli* ATCC 25922 inoculados en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento

1.2.2. Específicos.

- Elaboración de queso mantecoso en condiciones de laboratorio
- Inocular una población de 10^3 UFC/mL de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 durante la etapa de amasado del proceso de elaboración del queso mantecoso.
- Inocular la cepa *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* en poblaciones de 10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/mL a las muestras de queso mantecoso previamente contaminadas con *Escherichia Coli*.
- Analizar a diario durante un periodo de 15 días, los efectos de las diferentes poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre los quesos contaminados con *Escherichia coli*.

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Hipótesis

A mayor población de *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* mayor será el efecto bactericida sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 inoculado en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento.

2.2. Variables:

Variable dependiente:

Población de *E. coli* ATC 25922, (10^3 UFC/mL)

Variable independiente:

Poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, (10^3 , 10^6 , 10^9 UFC/mL)

Tiempo de almacenamiento (8 ± 2 °C), 15 Días (360 Horas)

2.3. Operacionalización de las Variables

	Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de medición
Dependiente	<i>E. coli</i> ATCC 252	Bacilo Gram negativos, gruesos, cortos de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 micras de longitud. Fermentan la glucosa, lactosa, maltosa y otros azúcares con producción de ácido y gas, su PH óptimo de desarrollo es de 6-7 con un PH mínimo de 4.4 y máximo de 9.	Usando escalas de McFarland se preparó la población de 10^3 UFC/mL de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y se inoculó 1ml/100g de masa, durante la etapa del amasado del queso mantecoso.	UFC/mL	Razón
	<i>Lactobacilos casei</i> Var. <i>Rhamnosus</i>	Bacilos Gram positivos, no móviles de 0.8-1.0 x 2.0-4.0 μm , extremos cuadrados, aparecen individualmente o en cadenas, heterofermentativos, producen bacteriocinas, peróxido de hidrogeno y ácidos grasos	Usando escalas de McFarland se preparó poblaciones de 10^3 , 10^6 , 10^9 UFC/mL de <i>Lacobacillus</i> var. <i>Rhamnosus</i> y se inoculó 1ml/100g de masa, durante la etapa del amasado del queso mantecoso.	UFC/mL	Razón
Independiente	Tiempo de Almacenamiento	Es el periodo en el cual se producen cambios físico-químicos y microbiológicos en el queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio almacenado	Se realizó los análisis de las muestras y recuento bacteriano cada día durante un periodo de 15 días, las muestras estuvieron a temperatura de refrigeración (8 ± 2 °C)	Días	Intervalo

2.4. Metodología

Se aplicará el método experimental, el tipo de estudio es aplicado y se desarrollará un Diseño experimental puro.

2.5. Diseño experimental

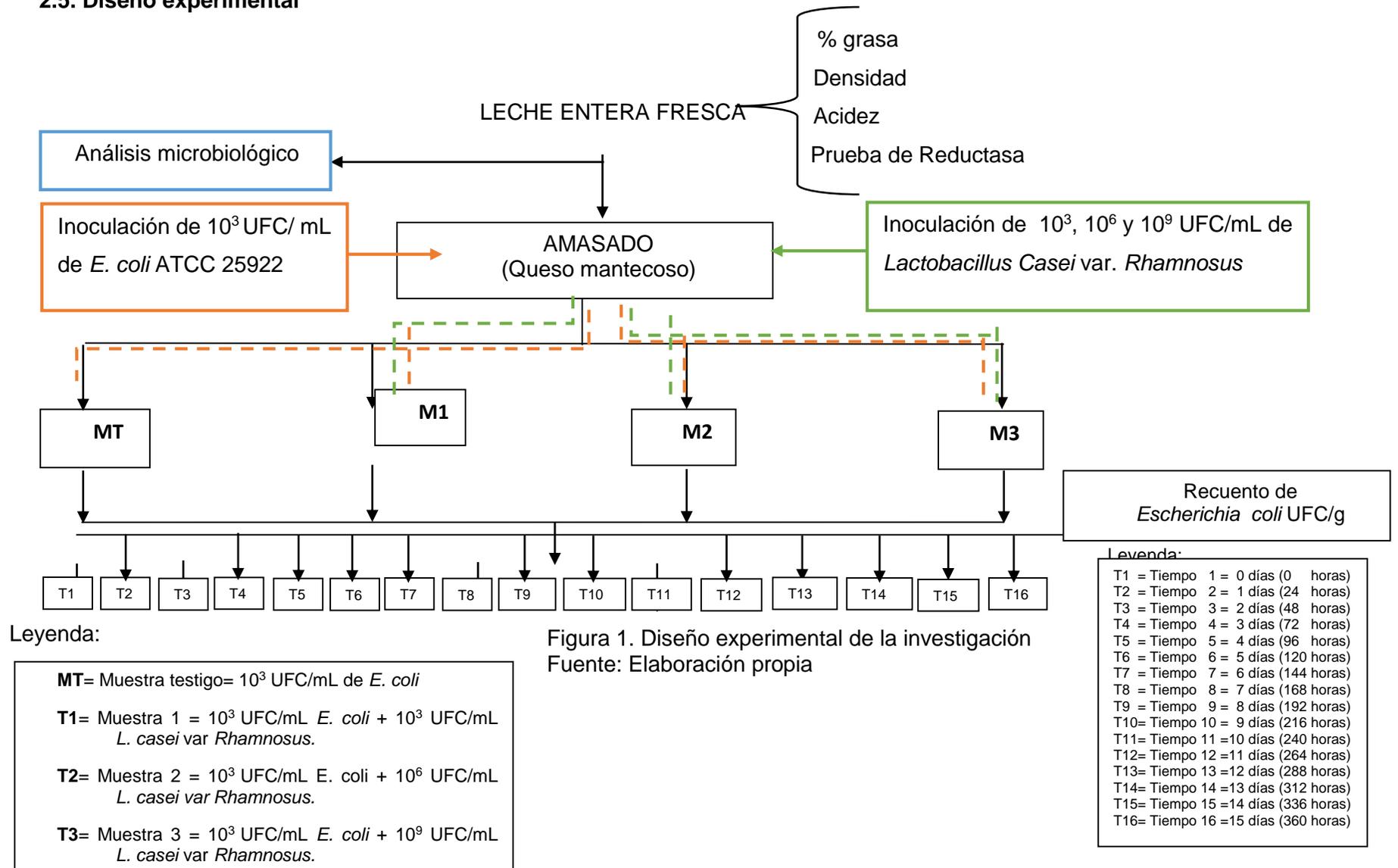


Figura 1. Diseño experimental de la investigación
Fuente: Elaboración propia

2.6. Población y muestra

Población.

Para la elaboración del queso mantecoso se utilizó leche entera cruda, del establo lechero “Las Pampas” del distrito de Simbal, provincia de Trujillo, departamento de la Libertad. El cual cuenta con 170 vacas en producción y un promedio diario de 4680 litros de leche por día.

Muestra.

Se realizó un muestreo no probabilístico, se tomó una muestra de 120 Litros de leche entera cruda, lo que equivalió a 12 kg de Queso mantecoso.

2.7. Técnica e instrumentos de recolección de datos

Técnica

Observación directa.

Instrumentos de recolección de datos.

En los anexos 5 y 6 se presentan los formatos para el registro de datos en cuanto a la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche entera cruda y del recuento de *Escherichia coli* (UFC/g) en queso mantecoso durante 15 días de almacenamiento a temperatura de 8 ± 2 °C.

2.8. Métodos de Análisis de datos.

Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el software estadístico IBM SPSS Statistics en el cual se analizó:

- El análisis de varianza de un factor para conocer si por lo menos el promedio de una de las muestras difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Donde se rechazó la hipótesis nula, H_0 : Las medias de las 4 muestras son iguales (no existe diferencia significativa), con un 95% de confiabilidad, puesto a que el valor de la significancia fue de: 0.000.
- Se utilizó la prueba de rango post hoc HSD de Tukey de comparaciones múltiples, donde el promedio de la muestra testigo (MT) y el promedio de la muestra 3 (M3) estadísticamente son las que presentan mayor diferencia significativa ($p=0.00$), con un nivel de significancia de 5 %.
- Por intermedio de los Subconjuntos homogéneos HSD de Tukey se encontró que en el subconjunto 3 están incluidos 2 grupos (MT y M1) cuyas medias no difieren significativamente (Significancia = 0.259), de igual modo en el subconjunto 2 están incluidos 2 grupos (M1 y M2) cuyas medias

no difieren significativamente (Significancia = 0.164), y en el subconjunto 1 está incluido un solo grupo (M3) que difiere de los anteriores y que obviamente no difiere de sí mismo (Significancia = 1.00), demostrándose estadísticamente con un 95 % de confiabilidad que en la muestra 3 (M3) se utilizó el mejor tratamiento.

III.- RESULTADOS

3.1. Calidad de leche entera cruda.

Tabla 8. Control de calidad fisicoquímica y microbiológica de leche entera cruda - (NTP: 202. 001: 2003)

Proveedor	Turno de ordeño	Fecha de ordeño	Hora de ordeño	Características fisicoquímicas	
"Las Pampas"	Mañana	02/10/15	5:00 -Am	Materia grasa (g/100g)	3.4
				Densidad (g/ml)	1.031
				Acidez expresada en g. de ácido láctico (g/100g)	0.16
				Prueba de la Reductasa con azul de metileno	Buena

Fuente: Elaboración propia

La tabla 9 muestra los análisis fisicoquímicos de las muestras de leche de vaca entera cruda del establo proveedor. La prueba de la reductasa indicó valores cualitativos con la calificación de 'buena'. El contenido de grasa de la leche osciló entre 3,40 y 3,50 %. La densidad de la leche estuvo entre 1,031 y 1,032 g/mL.

Por lo expresado, y en función de los valores presentados, en la presente investigación se empleó como materia prima la leche entera cruda, del establo lechero "Las Pampas" del distrito de Simbal, provincia de Trujillo, por considerarse de mejor calidad fisicoquímica y microbiológica.

3.2. Comportamiento de *Escherichia coli* en muestra testigo (MT)

Se determinó la curva de crecimiento de *Escherichia coli* en el queso mantecoso mediante la técnica de recuento bacteriano en placa a diario, durante un periodo de 15 días a $T^{\circ} = 8 \pm 2$ °C

Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra testigo de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante 15 días a temperatura 8 ± 2 °C.

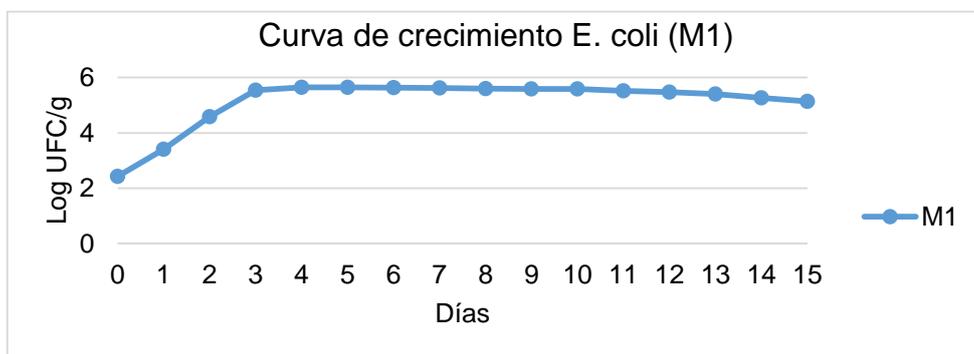
En la figura 3 se muestra la curva de crecimiento de la población 10^3 UFC/mL de *E.*



coli inoculado en queso mantecoso que alcanzó una población final de 1.16×10^6 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial de 2.73×10^2 UFC/g.

3.3. Comportamiento de *Escherichia coli* en muestra 1 (M1)

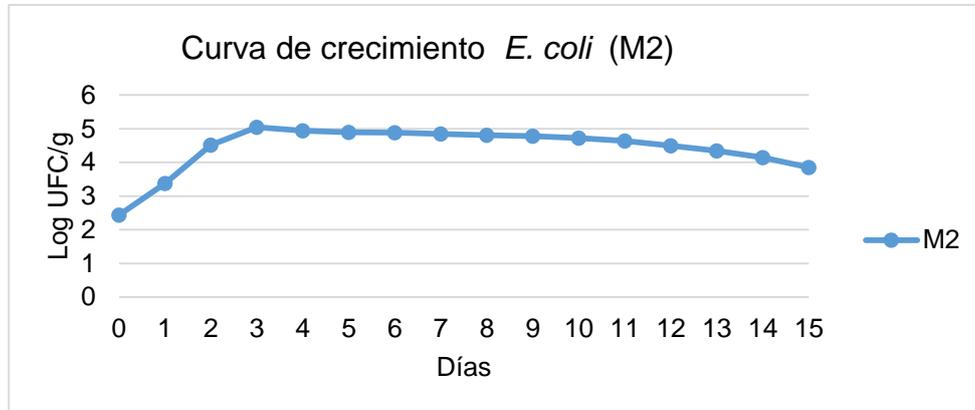
Figura 3. Curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 1 de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante 15 días a temperatura 8 ± 2 °C.



En la figura 4 se muestra la curva de crecimiento de la población 10^3 UFC/ml de *E. coli* en queso mantecoso a la cual se le agregó una población de 10^3 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población promedio final de 1.38×10^5 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 3 ciclos logarítmicos desde su población inicial de 2.67×10^2 UFC/g.

3.4. Comportamiento de *Escherichia coli* en muestra 2 (M2)

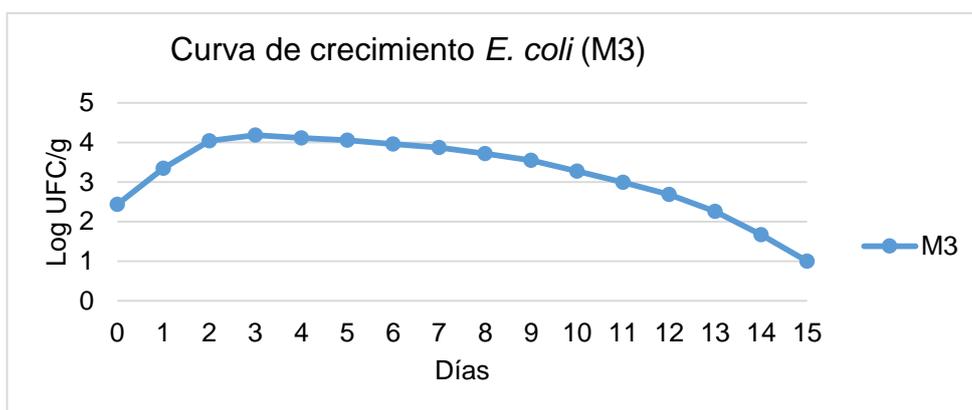
Figura 4. Curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 2 de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante 15 días a temperatura 8 ± 2 °C.



En la figura 5 se muestra la curva de crecimiento de la población 10^3 UFC/ml de *E. coli* en queso mantecoso a la cual se le agregó una población de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población promedio final de 7.1×10^3 UCF/g, aumentando hasta 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial 2.73×10^2 UFC/g.

3.6. Comportamiento de *Escherichia coli* en muestra 3 (M3)

Figura 5. Curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 3 de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante 15 días a temperatura 8 ± 2 °C.

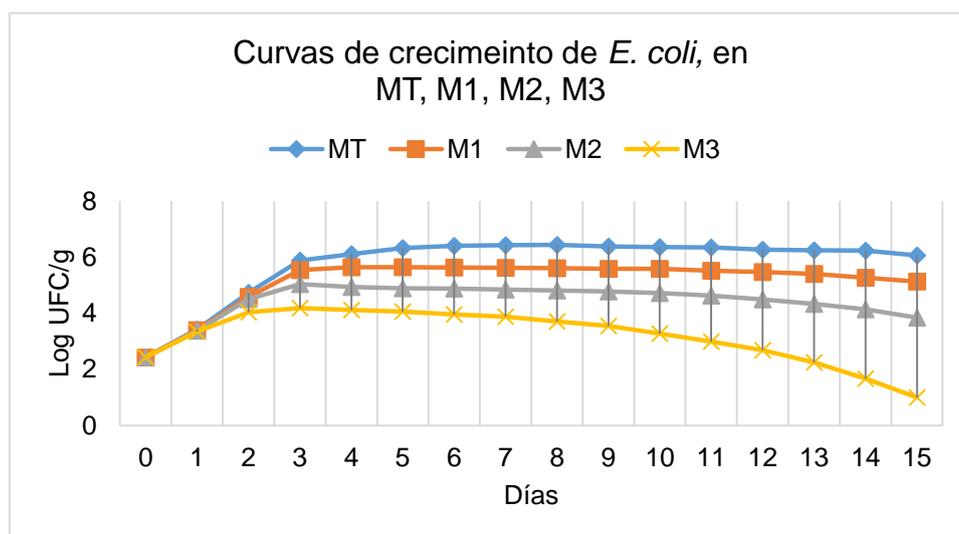


En la figura 6 se muestra la curva de crecimiento de la población 10^3 UFC/ml de *E. coli* en queso mantecoso a la cual se le agregó una población de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población

promedio final de 10 UCF/g, reduciendo hasta 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial 2.73×10^2 UFC/g.

3.7. Comportamiento de *Escherichia coli* en muestra 1, 2 Y 3, incluido la muestra testigo.

Figura 6. Curvas de crecimiento de *E. coli* inoculado en MT, M1, M2 y M3 de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante 15 días a temperatura 8 ± 2 °C.



En la figura 7 se muestran las curvas de crecimiento de las poblaciones de *E. coli* en los diferentes tratamientos y en la muestra testigo de queso mantecoso, donde *E. coli* en la muestra testigo alcanzó una población máxima de 1.16×10^6 UCF/g, aumentando aproximadamente 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial 2.73×10^2 UFC/g. así como una población mínima de 10 UCF/g en la muestra 3, reduciendo hasta 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial de 2.73×10^2 UFC/g.

3.8 Evaluación estadística.

3.8.1. Análisis de la varianza de un factor (anova)

Se formulan las siguientes hipótesis:

- H0: Las medias de las 4 muestras son iguales (no existe diferencia significativa), con un 95% de confiabilidad.
- H1: Por lo menos el promedio de una de las muestras difiere de las demás en cuanto a su valor esperado, con un 95% de confiabilidad.

Tabla 9 Análisis de varianza aplicada a los resultados de la muestra testigo y de los diferentes tratamientos utilizados

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	57.859	3	19.286	21.103	0.000
Intra-grupos	54.836	60	.914		
Total	112.695	63			

Tal como se observa en la tabla 4, el valor de la significancia es $p=0.000$ ($p<0.05$) esto indica que por lo menos el promedio de una de las muestras difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 con un nivel de significancia de 5 %.

3.8.2. Pruebas post hoc HSD de Tukey

Tabla 10. Prueba de rango post hoc de comparaciones múltiples

(I) T		Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
MT	M1	0.259	-.2663	1.5200
	M2	0.001	.4443	2.2307
	M3	0.000	1.6662	3.4525
M1	MT	0.259	-1.5200	.2663
	M2	0.164	-.1825	1.6038
	M3	0.000	1.0393	2.8257
M2	MT	0.001	-2.2307	-.4443
	M1	0.164	-1.6038	.1825
	M3	0.003	.3287	2.1150
M3	MT	0.000	-3.4525	-1.6662
	M1	0.000	-2.8257	-1.0393
	M2	0.003	-2.1150	-.3287

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tal como se observa en la tabla 5, la prueba de rango post hoc de comparaciones múltiples, el promedio de la muestra testigo (MT) y el promedio de la muestra 3 (M3) estadísticamente son las que presentan mayor diferencia significativa ($p=0.00$), con un nivel de significancia de 5 %.

3.8.3. Sub conjuntos homogéneos HSD de Tukey

Tabla 11. Subconjuntos homogéneos HSD de Tukey

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
M3	16	3.1988		
M2	16		4.4206	
M1	16		5.1313	5.1313
MT	16			5.7581
Sig.		1.000	0.164	0.259

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16,000.

Se ofrece una clasificación de los grupos basada en el grado de parecido existente entre sus medias. Así en el subconjunto 3 están incluidos 2 grupos (MT y M1) cuyas medias no difieren significativamente (Significancia = 0.259), de igual modo en el subconjunto 2 están incluidos 2 grupos (M1 y M2) cuyas medias no difieren significativamente (Significancia = 0.164), y en el subconjunto 1 está incluido un solo grupo (M3) que difiere de los anteriores y que obviamente no difiere de sí mismo (Significancia = 1.00), demostrándose estadísticamente que en la muestra 3 (M3) se utilizó el mejor tratamiento.

IV. DISCUSIONES

En el presente trabajo de investigación se seleccionó y utilizó a *Lactobacillus* var. *Rhamnosus* debido que ha sido estudiado extensamente y se ha encontrado que posee efecto antagónico contra la *E. coli* O157:H7 resistente a antibióticos. Arias, *et al* (2013).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* in vitro; así como una actividad anti-*Listeria* cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne en embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración (Calderón *et al* 2007).

Álvarez, (2011) demostró los efectos bacteriostáticos y bactericidas de *Lactobacillus casei* sobre *E. coli* ATCC 25922 en queso fresco a los cuales sometió a temperatura de refrigeración 8 ± 2 °C y los evaluó en función del tiempo por 10 días, en donde se apreció que *Lactobacillus casei* llegó a su fase estacionaria aproximadamente a los 5 días de ser inoculado, manteniéndose en función del tiempo para luego tener una lenta y no muy significativa muerte hasta los 10 días que duró dicha investigación. Demostrándose que

Lactobacillus casei soporta y se adecua a la temperatura de refrigeración 8 ± 2 °C, no afectando considerablemente su crecimiento.

Esto se plasma en los resultados obtenidos en la presente investigación donde las muestras de queso mantecoso estuvieron sometidas a temperatura de refrigeración 8 ± 2 °C, demostrándose que *Lactobacillus Rhamnosus* siendo una bacteria termófila, se adapta a la temperatura 8 ± 2 °C durante los 15 días que duró la investigación en la cual se comprobó el efecto bactericida que tiene *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre *E. coli*

Los posibles beneficios de consumir queso mantecoso con *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* en poblaciones que puedan causar beneficios al ser humano 10^7 UFC/mL (FAO/OMS, 2003) se basa en que la mayoría de información disponible sobre los efectos de *Lactobacillus Rhamnosus* HN001 en humanos se refiere a su capacidad de reforzar las defensas del individuo, más particularmente en sujetos con inmunosupresión leve. En efecto, varios ensayos clínicos realizados en adultos mayores han mostrado en forma reiterada que el consumo de productos con DR20 estimula la actividad citotóxica de las células NK (Natural-Killer), las cuales están involucradas en la defensa del organismo frente a tumores e infecciones virales, y la actividad fagocítica de los monocitos y neutrófilos provenientes de la sangre periférica; dicho efecto es aún mayor en los sujetos de más de 70 años, es decir, en aquellos con mayor grado de inmunosupresión. (Gill H, et al 2001; Sheih, et al 2001., citado por Cáceres R, Paola y Gotteland R, Martín, 2010).

En la figura 3 se reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra Testigo (MT) en la cual una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, para conocer con qué facilidad se reproduce dicha bacteria y tomarlo como patrón de referencia al momento de comparar los recuentos y tratamientos. Álvarez (2011) realizó un estudio sobre los efectos de *Lactobacillus casei* sobre *E coli* en queso fresco sometido a temperatura 8 ± 2 °C durante 10 días de evaluación, para tal sentido elaboró queso fresco al que denomino grupo control al cual le agrego 10^3 UFC/mL de *E coli*, en la cual dicha bacteria alcanzó una población máxima aprox. de 5.7 log UFC/g hasta el día 10 que duró su investigación, mientras que en la presente investigación *E. coli* hasta el día 10 alcanzó una población aprox. de 6.3 log UFC/g, siendo la diferencia menos de 1 logaritmo, a pesar de utilizar distintos tipos de quesos y utilizar *E. coli* ATCC 25922 en ambas investigaciones, aparentemente *E. coli* se desarrolla y crece mejor en el queso mantecoso.

E. coli alcanzó una población promedio final (día 15) de 1.16×10^6 UFC/g, aumentando aproximadamente hasta en 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.67×10^2 UFC/g. demostrándose que *E. coli* se reproduce con facilidad en el queso mantecoso, esto se debería a que el queso mantecoso no estuvo expuesto a conservantes o inhibidores de crecimiento bacteriano y que es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos indicadores de higiene, debido a su alto contenido en agua, pH óptimo y la gran variedad de nutrientes que éste posee (Mataix *et al.*, (1994); citado por Gil (2010). Al respecto Cristóbal y Maurtua (2003), analizaron quesos frescos artesanales comercializados a nivel ambulatorio donde encontraron la presencia de *Lactobacillus sp.*, comerciales (10^6 UFC/g) la cual no favoreció a la reducción de bacterias coliformes ni patógenas como el *Escherichia coli*.

Determinándose en la presente investigación que el queso mantecoso, libre de conservantes o inhibidores de crecimiento bacteriano fue una buena fuente de crecimiento y reproducción para *E. coli* y que las bacterias ácido lácticas comerciales utilizadas en la elaboración de queso mantecoso no causan ningún efecto que inhiba el crecimiento de *E. coli* o se encuentran en poblaciones reducidas.

En la figura 4 reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 1 (M1) en la cual una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^3 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15) de 1.38×10^5 UFC/g, aumentando aproximadamente hasta en 3 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.67×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 1 (M1) estadísticamente no se encontró diferencia significativa (significancia=0.259; $P > 0.05$), no demostrándose ningún efecto inhibitorio considerable. Esto se debería a la poca población de *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* agregada y por la acumulación de desechos metabólicos de las propias bacterias. La producción de ácidos orgánicos, H_2O_2 , bacteriocinas y otros compuestos por parte de *Lactobacillus casei*, Madrid (1996); citado por Álvarez (2011).

En la figura 5 se reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 2 (M2) en la cual una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó

una población promedio final (día 15) de 7.1×10^3 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.73×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 1 (M2) estadísticamente si se encontró diferencia significativa (significancia=0.001; $P < 0.05$), obteniéndose un efecto bacteriostático leve. Esto se debería a que la población agregada de *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* fue duplicada y agregada al queso mantecoso, al respecto Mejía *et al* (2007), indican que aparentemente, a bajas concentraciones el efecto es bacteriostático afectando tan sólo un cierto número de células.

En la figura 6 se reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 3 (M3) en la cual una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C , a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15) de 10 UCF/g, disminuyendo hasta en 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.73×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 3 (M3) estadísticamente se encontró la mayor diferencia significativa (significancia=0.000; $P < 0.05$), demostrándose así un efecto bactericida considerable. Esto se debe a que las bacteriocinas por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos, citado por; González *et al*, (2003).

En la figura 7 se muestran las curvas comparativas de crecimiento de *E. coli* que fueron agregadas al queso mantecoso en poblaciones de 10^3 UFC/mL frente a las 3 poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* (10^3 , 10^6 y 10^7 UFC/mL), y la muestra testigo a la cual no se le adicionó ninguna población de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus*.

La población agregada al queso mantecoso 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* en la muestra 3 logró que *E. coli* tenga un recuento final en placa (día 15) de 10 UFC/g. Mientras que en la muestra testigo que no tuvo ninguna población de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus*, *E. coli* alcanza una población final (día 15) de 1.16×10^6 UFC/g, de acuerdo con Yue *et al.*, (2013). *Lactobacillus rhamnosus* CCPI 20975 produce una bacteriocina 6502-Da, llamado bacteriocina RC 20975, El principal modo de acción de bacteriocina 20.975 RC parece ser la formación de poros , como se indica por K^+ flujo de

salida de las células metabólicamente activas de *A. acidoterrestris*. Contrastando con Kaktcham Pierre Marie, (2011) *Lactobacillus rhamnosus* 1K, produce una bacteriocina activa contra deterioro de los alimentos y las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas patógenas incluyendo *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Shigella flexneri*.

V.- CONCLUSIONES

- Por medio del método de recuento de supervivencia bacteriana en placa se determinó que *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* causa efecto bactericida sobre *Escherichia coli* presente en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio almacenado a 8 °C.
- Se determinó que es necesario la inoculación de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* en poblaciones de 10⁹ UFC/mL por cada 100 g. de masa de queso mantecoso para causar efecto bactericida sobre *Escherichia coli*.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre el efecto bactericida de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* frente a otras bacterias responsables de enfermedades de transmisión alimentaria presentes en el queso mantecoso.
- Comparar los efectos de *Lactobacillus Rhamnosus* con otras cepas que causen efectos bactericidas sobre *E coli* para conocer cual género y variedad es la que tiene mayor efecto bactericida sobre *E. coli*.
- Obtener el sobrenadante libre de células (SLC) de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* para purificarlo, aislarlo y caracterizar las posibles bacteriocinas presentes en el SLC. Utilizarlo como antimicrobiano en concentración mínima bactericida (CMB) sobre diferentes bacterias responsables de enfermedades de transmisión alimentaria y del deterioro de los alimentos.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACEVEDO, Iría.; GARCÍA, Oscar.; VARGAS, Daniela. Evaluación de la Calidad Bacteriológica por Método Rida Counten Quesos Tipo Mozzarella de Búfala Artesanal. Estado Lara, Venezuela. [en línea]. Diciembre 2013, vol. 6, no. 2. Revista del colegio de medico veterinarios del estado de Lara [fecha de consulta: 20 Abril 2015].

Disponible en: <http://revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-6/queso-mozzarella/> ISSN: 2244 – 7733.

ALVAREZ Yanamango, E. Efectos del *Lactobacillus casei* ATCC 393TM sobre el *Escherichia coli* durante la vida comercial del queso fresco. Trabajo de titulación (Ingeniero de Alimentos). Lima, Perú: Universidad Nacional del Callao, Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos, 2011. p. 153

AMOROCHO Cruz.; Claudia Milena. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Tesis (Tesis Doctoral). Valencia, España: universidad politécnica de Valencia, escuela técnica superior de ingeniería agronómica y del medio natural, departamento de biotecnología, 2011. p. 253

Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: *Salmonella Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 resistant to antibiotics. Por Arias O, A. Berenice [et al]. Revista digital científica y tecnológica [en línea]. Septiembre 2013, vol. no. 11. [Fecha de consulta: 17 Octubre 2015].

Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/730/73029399005.pdf> ISSN: 1665-5745.

Baterías lácticas: importancia en los alimentos y sus efectos en la salud por José Ramírez Ramírez [et al]. Revista Fuente [en línea]. Junio 2011, no. 7. [fecha de consulta: 10 Mayo 2015].

Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

ISSN: 2007-0713

Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitorio de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012 por Kelly Fernández Villa [et al]. Revista Biosalud [en línea]. Junio 2014, vol. 13, no. 1. [fecha de consulta: 27 Abril 2015].

Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502014000100006

ISSN 1657-9550

CÁCERES R, Paola y GOTTELAND R, Martín. Alimentos probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables? [En línea]. Marzo 2010, vol. 37, no. 1. Revista chilena de nutrición [fecha de consulta: 23 Abril 2015].

Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775182010000100010&script=sci_arttext.

ISSN 0717-7518

Camargo Peralta, sabelle, Gómez Bertel, Sandra y Salazar Montoya, Vivian Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. Revista TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA, Vol. 4, No. 2, Diciembre 2009. Centro de Investigación y Desarrollo. CID / Fundación Universitaria de Área Andina.

HUANQUILEF Arriagada, Claudia Natalia. "Purificación a homogeneidad de la sustancia tipo bacteriocina de la cepa BALB considerando como parámetro la actividad inhibitoria frente *Listeria monocytogenes*". Tesis (Licenciado en Bioquímica). Valdivia, Chile: universidad austral de Chile, facultad de ciencias, departamento de bioquímica, 2010. 98p.

CUEVAS Roberto. Transporte rural de productos alimenticios en América Latina y el Caribe. Roma: Servicio de Tecnologías de ingeniería agrícola y alimentaria - boletín de servicios agrícola de la FAO, 2004. ISBN: 92-5-305220-1.

CRISTÓBAL, Ruth; MAURTUA, Dora. "Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus sp.*". Revista Panamericana de Salud Pública. Vol. 14, Nº 3, 2003. p. 158-164

DEL CAMPO, Martin., GÓMEZ, Héctor y ALANÍS, Ricardo. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. Revista digital científica y tecnológica [en línea]. Enero 2008, vol. 6, no. 5. [fecha de consulta: 23 Abril 2015].

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005> ISSN: 1665-5745

DIGESA Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano. NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V0.1.LIMA-PERÚ, 2008.

Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Por Calderón Oscar [et al]. Revista ALAN [en línea]. Marzo 2007, vol. 57, no. 1. [fecha de consulta: 15 Mayo 2015].

Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222007000100007&script=sci_arttext

ISSN 0004-0622.

Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagónica de cepas de *lactobacilos* comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. Por Marlene Durán Lengua [et al]. Revista Científica [en línea]. Junio 2010, no. 3. [Fecha de consulta: 20 Abril 2015].

Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300014 ISSN 0798 – 2259.

Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Por María Liliana Roldán [et al]. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [en línea]. Junio 2011, vol. 31, no. 1. [Fecha de consulta: 23 Abril 2015].

Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008 ISSN 1315-2556.

FAO/WHO. Codex Alimentarius. Norma de grupo del codex para el queso no madurado, incluido el queso fresco. Codex stan 221-2001.

Fundación universitaria Iberoamericana. Composición nutricional del Queso mantecoso [en línea]. Copyright 2005 – 2012. [fecha de consulta: 10 Marzo 2015].

Disponible en:

<http://composicionnutricional.com/alimentos/QUESO-MANTECOSO-4>

FAO Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos [en línea]. [fecha de consulta: 10 Mayo 2015].

Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/e-coli0/es/>

GUERRERO, Dániza,; ARIAS, Gladys. Detección de la toxina termolábil de *Escherichia coli* en Quesos frescos artesanales mediante PCR. [En línea]. Revista ciencia e investigación 2008, vol. 11, no. 1. [Fecha de consulta: 20 Abril 2015].

Disponible en:

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/4896/4080>

ISSN 1561-0861

GUTIÉRREZ, Luz y ACOSTA, Elly. Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli* [en línea]. Revista Lasallista de Investigación. Diciembre 2008, vol. 5, no. 2. [fecha de consulta: 27 Abril 2015].

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69550209>

ISSN: 1794-4449

GIL, Ángel. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos [en línea]. Madrid: Médica Panamericana, D.L. 2010 [fecha de consulta: 05 Marzo 2015].

Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pg=PT49&lpg=PT49&dq=Composici%C3%B3n+Nutricional+de+algunas+variedades+de+queso&source=bl&ots=6HBZKhm8Xq&sig=9lQn7WsSqYLZwzr4KhrB37IUQho&hl=es&sa=X&ei=F25uVfKODO78sATOG4I4&ved=OCBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Composici%C3%B3n%20Nutricional%20de%20algunas%20variedades%20de%20queso&f=false> ISBN 978-84-9835-347-1

González Martínez,; Blanca et al (2003). Bacteriocinas de probióticos [en línea]. Revista Salud Pública y Nutrición. Junio 2003, vol. 4, no. 2. [Fecha de consulta: 27 Abril 2015].

Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

INDECOPI. Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos. NTP 202.001:2003. 4ta Edición. Lima-Perú, 2003.

INGRAHAM, John y INGRAHAM, Catherine. Introducción a la microbiología [en línea]. Barcelona: Editorial reverté, SA, 1998 [fecha de consulta: 20 Marzo 2015].

Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=dUEZSXaz2UC&pg=PA563&lpg=PA563&dq=Las+cepas+enteropat%C3%B3genas+causan+diarreas+en+reci%C3%A9n+nacidos,+y+origi+nan+a+veces+brotos+epid%C3%A9micos+en+las+salas+de+maternidad.+Este+tipo+de+cepas+pat%C3%B3genas+de+E.+coli+son+menos+conocidas+que+las+otras+dos,+aun+que+probablemente+produzcan+una+toxina+que+destruye+las+microvellosidades+de+l+epitelio+intestinal+%28peque%C3%B1as+proyecciones+que+aumentan+la+superfici+e+disponible+para+la+absorci%C3%B3n+de+nutrientes&source=bl&ots=TZwfJZQHi1&sig=Zr2hjsv9O-bWhi4nj6Txftpe2xc&hl=es&sa=X&ei=bY5uVa3lFgy1sATK7oKQBA&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>

ITDG Soluciones Prácticas. Perú 2013. Ficha Técnica Elaboración de queso mantecoso.

KAKTCHAM, Pierre Marie *et al* (2011). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1K isolated from traditionally fermented milk in the western highlands region of Cameroon. New York Science Journal [en línea]. Agosto 2011. [fecha de consulta: 06 Diciembre 2015].

Disponible en:

http://www.researchgate.net/publication/258240318_Characterization_of_bacteriocin_produced_by_Lactobacillus_rhamnosus_1K_isolated_from_traditionally_fermented_milk_in_the_western_highlands_region_of_Cameroon

ISSN: 1554-0200)

JUSTINIANO Mejía, Mónica y MEJÍA Delgado, Elva (2013) Efecto probiótico in vitro de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino, imipenem y vancomicina sobre *Escherichia coli*, *pseudomonasa eruginosa* y *staphylococcus aureus*. Revista pueblo continente vol. 24, No. 31: pp. 187-202, 2013.

LARREA, Hernani., FLÓREZ, Martha y HUAPAYA, José. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I [en línea]. Revista Horizonte médico, vol. 7, no. 1. Junio 2007 [fecha de consulta: 27 Abril 2015].

Disponible en:

http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2007_I/Art2_Vol7_N1.pdf

MINAGRI/SIEA. 2012. Producción de queso mantecoso por mes, según ubicación de las plantas. [En línea]

Disponible en: <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=estadistica-agroindustrial>

MENDEZ Marroquin, William. Presencia de *Escherichia coli*, como indicador de contaminación fecal en coronas de acero utilizadas por los estudiantes de quinto año, durante su práctica clínica de odontopediatría. Trabajo de titulación (Cirujano Dentista). Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de odontología, 2005. 68p.

MEJÍA R., et al. "Obtención de cepas de *Lactobacillus*: Caracterización IN-VITRO como potencial probióticas". *Revista Científica*. Vol. 17, Nº 2, 2007. p. 178-185. ISSN 0798-2259.

MICHANIE, Silvia. *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que dispara el haccp en la industria de la carne. *Rev. Ganado y Carne*, vol. 4. no17: pp 40-42. 2003.

Organización mundial de la salud (OMS). La inocuidad de los alimentos: una prioridad de salud pública. [en línea]. 2014, Perú [fecha de consulta: 20 Marzo 2015].

Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

PARRA Huertas, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional nos alimentos [en línea]. Junio 2010, vol. 8, no. 1. [Fecha de consulta: 10 Mayo 2015].

Disponible en:

<http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/129> ISSN 1692-3561

SÁNCHEZ, J (2012). Predicción de la vida de anaquel de queso mantecoso de Cajamarca por efecto de la temperatura de almacenamiento refrigerado y tiempo de maduración usando redes neuronales. Tesis para optar el grado de maestro en ciencias. Escuela de postgrado. Universidad Nacional de Trujillo.

WGO, Probiotics and prebiotics [en línea] Octubre 2011. “[fecha de consulta: 15 Mayo 2015].

Disponible en:

<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-english-2011.pdf>

Yue T, Pei J.; Yuan Y, (2013). Purification and characterization of anti-Alicyclobacillus bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus*. Department of Food Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, People's Republic of China [en línea]. Septiembre 2013. [Fecha de consulta: 06 Diciembre 2015].

Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992502>

ISSN: 1575-81 PMID: 23992502

ANEXOS

Anexo 1

Determinación del porcentaje de grasa por la técnica Gerber (NTP 202.028:1998).

- Se transfirió con una pipeta $10 \pm 0,2$ mL de ácido sulfúrico enfriado entre $15,5$ y $21,1$ °C (densidad: 1.813 g/ml – 1.817 g/mL) a cada butirómetro de Gerber.
- Se adicionó 11 mL de leche a una temperatura no mayor a 24 ± 0.1 °C y 1 mL a 1.1 mL de alcohol isoamilico (densidad: $0,810$ g/ml – $0,812$ g/mL).
- Se insertaron los tapones y sujetaron los butirómetros por los extremos agitando la mezcla de los líquidos. Cuando la cuajada estuvo disuelta por completo se continuó la agitación por 10 a 15 .
- Se invirtieron los butirómetros varias veces y luego se colocaron en la centrífuga a 1000 rpm por cinco minutos, y se realizó la lectura del porcentaje de grasa del butirómetro.
- El resultado obtenido fue: Materia grasa (g/100g) = 3.4 , encontrándose dentro de los requisitos de buena calidad físico-químico que estipula la norma.

Anexo 2

Determinación de la densidad por el Método de Lactodensímetro (NTP: 202.028:1998)

- Se tomó una muestra de 200 ± 5 mL de leche fresca y se vertió en una probeta transparente de 250 ml.
- se introdujo el lactodensímetro de la forma que la leche reosó la probeta y se realizó la lectura del lactodensímetro.
- Se utilizó el lactodensímetro Quevenne, calibrado para leer la densidad directamente a 15 °C
- Se realizó una corrección sumándole o restándole el factor $0,0002$ a la densidad leída, por cada grado de temperatura respectivamente mayor o menor a 15 °C.
- El resultado obtenido fue: Densidad a 15 °C (g/mL) = 1.031 , encontrándose dentro de los requisitos de buena calidad físico-químico que estipula la norma.

Anexo 3

Determinación de la acidez por el Método volumétrico

(NTP: 202. 116: 2000)

- Se tomó 9 mL de leche fresca utilizando una pipeta aforada de 10 mL y se colocó en un matraz de 100 mL.
- Se agregó 3 gotas de fenolftaleína (al 1% p/p) y se agitó para homogenizar la mezcla.
- Se realizó la valoración agregando gota a gota el NaOH estándar (0.1N) estándar a la muestra de leche en estudio hasta que la muestra se tornó de color Grosella.
- Luego se realizó la lectura del gasto de NaOH, y se calculó la acidez titulable.
- El resultado obtenido fue: Acidez expresada en g. de ácido láctico (g/100g) = 0.16, encontrándose dentro de los requisitos de buena calidad físico-químico que estipula la norma.

Anexo 4

Prueba de la reductasa con azul de metileno

(NTP: 202. 014: 1998)

- Se tomó 10 mL de la muestra de leche fresca en estudio y se colocó en un tubo de ensayo previamente esterilizado.
- Se agregó 1 mL de azul de metileno (1 tableta con 8,8 mg de tiocianato de azul de metileno) en 200 mL de agua destilada estéril dentro de cada tubo, e incubó en Baño María a $37 \pm 0,5$ °C.
- Se controló el tiempo a partir del momento en el que se dejó en el tubo con la muestra de leche en Baño María y se realizó observaciones a intervalos regulares (cada media hora).
- Después se comparó el color resultante con una escala cuyos colores tendrán los siguientes valores comparativos:
 - ✓ N A° I, de color azul; calificación: muy buena = tiempo de decoloración: 5 horas o más.
 - ✓ N A° II, de color azul-violeta; calificación: buena = tiempo de decoloración: 2 a 5 horas.

- ✓ N A° III, de color rojo-violeta; calificación: suficiente = tiempo de decoloración: 20 minutos a 2 horas.
- ✓ N A° IV, de color rojo; calificación: insuficiente = tiempo de decoloración: hasta 20 minutos.
- ✓ N A° V, incolora: calificación; mala = tiempo de decoloración: menos de 20 minutos.

Anexo 5

Tabla 12. Recuento de *Escherichia coli* (UFC/g) queso mantecoso durante 15 días de almacenamiento a temperatura de 8 ± 2 °C.

Queso mantecoso	Valor estadístico	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
10 ³ UFC/mL de <i>E. coli</i>	MEDIA	2.73E+02	2.67E+03	5.37E+04	7.70E+05	1.30E+06	2.13E+06	2.57E+06	2.67E+06	2.75E+06	2.44E+06	2.33E+06	2.26E+06	1.84E+06	1.77E+06	1.72E+06	1.16E+06
	D.E	1.53E+01	5.77E+01	3.21E+03	1.00E+04	0.00E+00	1.53E+05	1.15E+05	5.77E+04	5.00E+04	1.22E+05	1.53E+05	2.08E+05	4.04E+04	6.43E+04	2.89E+04	8.59E+05
10 ³ UFC/ml de <i>E. coli</i> + 10 ³ UFC/mL <i>L. Rhamnosus</i>	MEDIA	2.67E+02	2.57E+03	3.83E+04	3.50E+05	4.40E+05	4.47E+05	4.27E+05	4.22E+05	4.03E+05	3.87E+05	3.87E+05	3.31E+05	3.00E+05	2.52E+05	1.87E+05	1.38E+05
	D.E	1.53E+01	5.77E+01	1.15E+03	1.00E+04	1.73E+04	5.77E+03	1.53E+04	2.89E+03	1.53E+04	1.50E+04	6.08E+03	7.77E+03	1.00E+04	1.06E+04	5.77E+03	6.81E+03
10 ³ UFC/ml de <i>E. coli</i> + 10 ⁶ UFC/ml <i>L. Rhamnosus</i>	MEDIA	2.73E+02	2.40E+03	3.23E+04	1.11E+05	8.67E+04	7.87E+04	7.70E+04	7.07E+04	6.47E+04	6.00E+04	5.30E+04	4.33E+04	3.12E+04	2.19E+04	1.39E+04	7.10E+03
	D.E	5.77E+00	1.00E+02	2.52E+03	1.00E+03	5.77E+03	5.77E+02	1.00E+03	5.77E+02	1.53E+03	1.00E+03	1.05E+03	1.53E+03	1.06E+03	1.01E+03	1.73E+02	1.00E+02
10 ³ UFC/ml de <i>E. coli</i> + 10 ⁹ UFC/ml <i>L. Rhamnosus</i>	MEDIA	2.73E+02	2.23E+03	1.10E+04	1.55E+04	1.31E+04	1.15E+04	9.20E+03	7.53E+03	5.20E+03	3.53E+03	1.88E+03	9.77E+02	4.83E+02	1.80E+02	4.67E+01	1.00E+01
	D.E	5.77E+00	2.52E+02	1.00E+03	5.00E+02	1.15E+02	4.36E+02	2.00E+02	5.77E+01	1.00E+02	5.77E+01	6.81E+01	1.15E+01	5.77E+00	1.00E+01	5.77E+00	0.00E+00

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 6

Escala nefelométrica de Mc Farland



ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MC FARLAND

NEFELOBAC

Indicações:

A escala nefelométrica de Mc Farland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos.

Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura.

Característica dos componentes:

O NEFELOBAC é preparado de acordo com a fórmula nefelométrica de Mc Farland. Consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0,5 a 10, com diferentes quantidades de cloreto de bário e ácido sulfúrico para se obter diferentes concentrações de sulfato de bário, que correspondem a diferentes contagens bacteriana. A equivalência destas contagens está expressa na tabela abaixo:

Tubo nº	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº aprox. bac (x 10 ⁶)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Assim o tubo nº 5 corresponde a 150 milhões de bactérias por mL de meio e o tubo nº 10 corresponde a 3 bilhões de bactérias por mL de meio.

Procedimento:

Comparar a olho nu os tubos de NEFELOBAC com o tubo de cultura bacteriana. Antes, agitar vigorosamente os tubos do NEFELOBAC, pois em repouso o sulfato de bário tende a precipitar. Também homogeneizar o tubo com a cultura bacteriana, para ter uma suspensão (turvação) uniforme.

Recomendamos fazer as leituras comparativas dos tubos, colocando-os contra um texto impresso, de forma que a maior ou menor claridade das letras vistas através dos tubos indique maior ou menor turvação.

Observação: Não romper o lacre, abrir o frasco ou transferir para outro recipiente, pois tal prática não assegura transferência e manutenção da correta concentração de sulfato de bário.

Precauções: Após a validade deve ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Apresentação: Caixa com 11 frascos.

Conservação: Manter o produto em temperatura ambiente (10°C-30°C).

Validade: 12 meses.

Referências Bibliográficas:

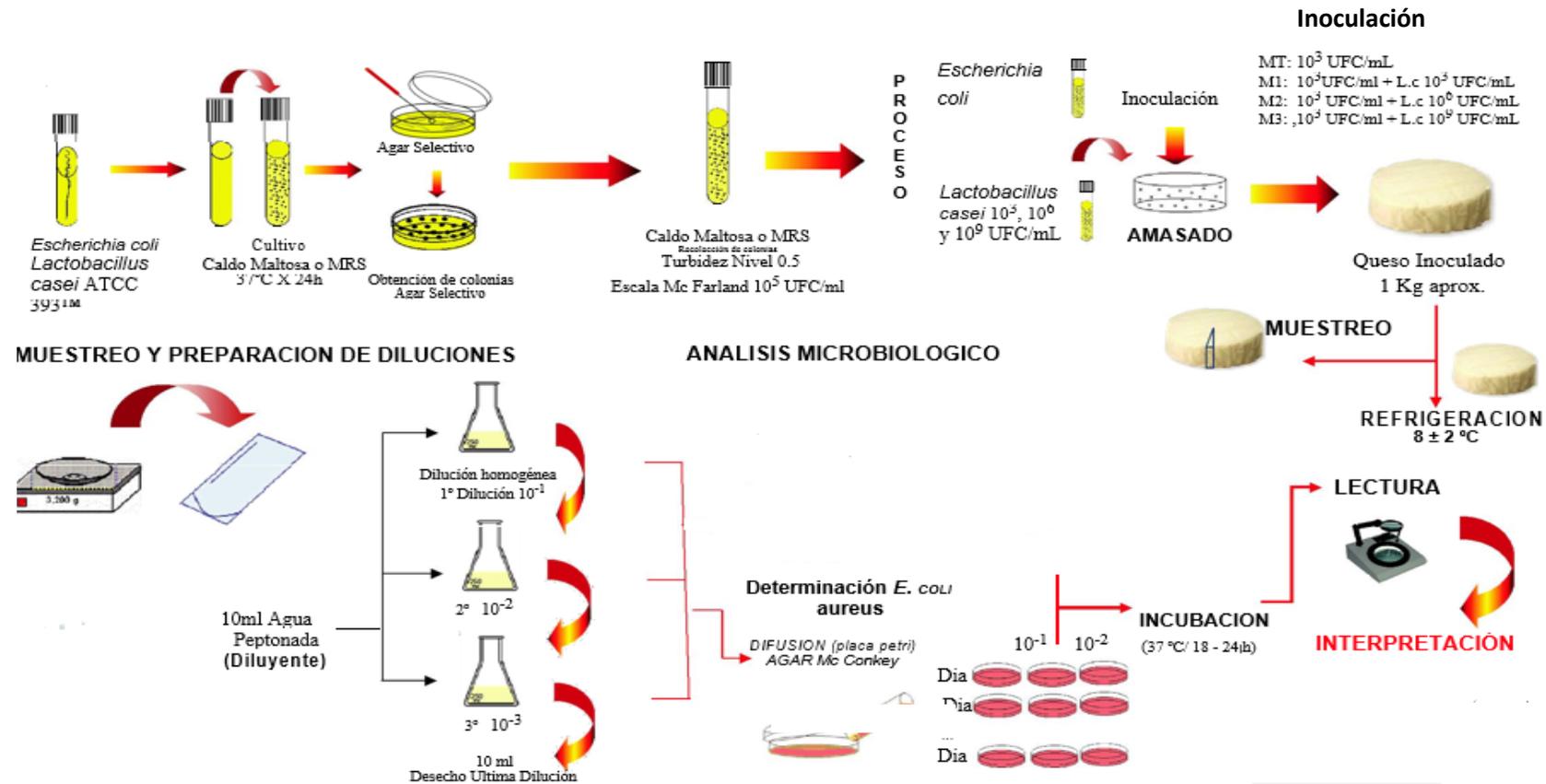
1. Lennette, EH; Balows, A.; Hausler, WJ; Shadomy, HJ – Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.:01

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Sta.Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111
Site: www.probacbrasil.com E-mail: probac@probac.com.br

Anexo 7

Figura 7. Diagrama referencial para el desarrollo de la investigación



Fuente: Fangio *et al*, 2007; utilizado por Álvarez, 2011

Anexo 8

Imágenes del desarrollo de la investigación



